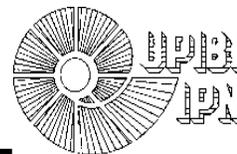




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

*Optimización de la producción de ácido giberélico por
Gibberella fujikuroi NRRL-2278*

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de:

Ingeniero Biotecnólogo

Presenta:

Sonia Michel González Baños

Director: Dr. Enrique Durán Páramo
Depto. Bioprocesos
UPIBI-IPN

México, D.F., Mayo del 2007.



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
SUBDIRECTOR ACADÉMICO DE LA UPIBI-IPN
Presente.

*ASUNTO: Aval de Calidad
Académica de trabajo de Tesis*

Los abajo firmantes, designados por la Subdirección Académica como miembros del Jurado Calificador del trabajo de tesis titulado "Optimización de la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi*", que presenta la C. SONIA MICHEL GONZALEZ BAÑOS, egresada y pasante de la carrera de Ingeniería Biotecnológica, boleta número 2000620011, informamos que después de haber revisado cuidadosamente el informe escrito, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título mencionado.

Por lo anterior, otorgamos nuestro aval para que continúen los trámites de titulación y se proceda a programar el examen profesional correspondiente, de acuerdo al artículo 39 del Reglamento de Titulación Profesional vigente en nuestro instituto.

NOMBRE	FIRMA
DR. SERGIO GARCÍA SALAS PRESIDENTE	
DR. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO SECRETARIO	
M. EN C. LEOBARDO ORDAZ CONTRERAS PRIMER VOCAL	
M. EN C. CARLOS OROZCO ÁLVAREZ SEGUNDO VOCAL	
M. EN C. JOSÉ MANUEL MUÑOZ AGUILAR TERCER VOCAL	

Se extiende el presente a los 08 días del mes de Febrero del año 2007

Dedicado con mucho cariño y admiración.

A mis padres:

*Merced Arturo González
Ma. Patricia Baños Miranda*

A mis hermanos:

*Vanessa Elizabeth González Baños
Edgar Arturo González Ramírez*

A mi abuelita:

Ma. Reyna Susana Baños Miranda

A mi prometido:

Eduardo Rodríguez Cuevas... Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme fuerzas y paciencia para culminar con este compromiso.

A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente, por sus enormes esfuerzos para que yo saliera adelante, por darme palabras de aliento, por su confianza y paciencia, por todo lo que me han dado y por enseñarme a ser una persona que lucha por alcanzar y cumplir sus objetivos.

A mi abuelita, que sin duda siempre ha estado a mi lado para escucharme y darme sus consejos.

A mis hermanos porque creyeron en mí, por los buenos y malos momentos y por apoyar mis decisiones.

A mi prometido Eduardo Rodríguez Cuevas, gracias por estar conmigo, por tu apoyo, por tus consejos, por las alegrías y tristezas, por ser a veces mi fuerza, por tus palabras de aliento, por caminar junto a mí, por ayudarme a seguir adelante con mi tesis a pesar de que muchas veces no quería continuar; tú estabas ahí para decirme que podía seguir adelante y que no me diera por vencida, por eso y más muchas gracias... te amo.

Al Dr. Enrique Durán Páramo, por su confianza, por su apoyo, por todas las oportunidades que me ha dado, por su paciencia, por sus observaciones que me han ayudado a ser una mejor profesionalista y sobretodo por creer en mí. Gracias Dr. Durán.

Al Ing. Jesús Granados por su ayuda y tiempo en la interpretación de las superficies de repuesta.

Al M. en C. Leobardo Ordaz Contreras, por su tiempo, sus consejos, sus palabras de aliento y la revisión de la tesis para la mejora de la misma.

A Elsa Mariana Aguilera Espejel, por sus consejos, por escucharme, por la revisión de la tesis y por ser mi amiga a pesar del poco tiempo de conocernos.

A Carmen Calixto Mosqueda, por escucharme, por sus observaciones y por sus consejos para la corrección de mi tesis.

Gracias a Héctor Molina, Verónica Chávez, Karen Moreno y a todos aquellos que no haya mencionado y que seguramente habrán puesto en mí un granito de arena para cumplir con este objetivo.

ÍNDICE

1	RESUMEN	8
2	INTRODUCCIÓN	9
3	ANTECEDENTES	11
3.1	Importación y exportación de ácido giberélico	17
3.2	Metodología de superficie de respuesta y construcción de diseños	21
3.3	Aproximación de una superficie de respuesta por polinomios.	22
3.4	Diseño de primer orden	23
3.5	Diseño de segundo orden	23
3.6	Construcción de diseños compuestos centrales	24
4	JUSTIFICACIÓN	25
5	OBJETIVOS	26
5.1	GENERAL	26
5.2	ESPECÍFICOS	26
6	MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1	Microorganismo	28
6.2	Selección de medio sintético	28
6.3	Desarrollo del modelo de superficie de respuesta	31
6.4	Fermentaciones en matraz	32
6.5	Fermentaciones en biorreactor	32
6.6	Determinación de Biomasa.	34
6.7	Determinación de azúcares reductores.	34
6.8	Determinación de amonio residual.	36
6.9	Determinación de ácido giberélico por electroforesis capilar (CE).	36
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1	Modelo de superficie de respuesta para las fermentaciones en matraz y en biorreactor.	38
7.2	Fermentaciones en matraz	50
7.3	Fermentaciones en biorreactor.	59
7.4	Productividad de las fermentaciones en matraz y biorreactor.	66
8	CONCLUSIONES.	67
9	BIBLIOGRAFÍA	69
10	ANEXOS	72
10.1	FERMENTACIONES EN MATRAZ	72
11	ANEXO 2	76
11.1	FERMENTACIONES EN BIORREACTOR	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las giberelinas y el ácido giberélico.	13
Figura 2. Importación en México de ácido giberélico (Costo en dólares).	17
Figura 3. Importación en México de ácido giberélico (volumen-toneladas).	18
Figura 4. Curva tipo de Azúcares reductores.	35
Figura 5. Gráfica del tiempo de retención (7.2-8.9 min.) para el ácido giberélico.	37
Figura 6. Representación del modelo de primer orden para las fermentaciones en matraz.	41
Figura 7. Representación del modelo de segundo orden para las fermentaciones en matraz.	42
Figura 8. Representación del modelo de primer orden para las fermentaciones en biorreactor.	47
Figura 9. Representación del modelo de segundo orden para las fermentaciones en biorreactor.	48
Figura 10. Superficie de respuesta (Fermentaciones en matraz) ,a) superficie de respuesta fermentación en matraz, variables codificadas, b) superficie de respuesta en variables reales en z.	51
Figura 11. Superficie de respuesta (Fermentaciones en matraz)	51
Figura 12. Cinética de la producción de ácido giberélico (Fermentación 8 en matraz).	57
Figura 13. Superficie de respuesta para las fermentaciones en biorreactor. a) superficie de respuesta fermentación en biorreactor, variables codificadas, b) superficie de respuesta en variables reales en z.	59
Figura 14. Superficie de respuesta para las fermentaciones en biorreactor	60
Figura 15. Cinética de la producción de ácido giberélico (Fermentación 3 en biorreactor).	64
Figura 16. Producción de ácido giberélico (Fermentación 1 en matraz).	72
Figura 17. Producción de ácido giberélico (Fermentación 2 en matraz).	72
Figura 18. Producción de ácido giberélico (Fermentación 3 en matraz).	72
Figura 19. Producción de ácido giberélico (Fermentación 4 en matraz).	73
Figura 20. Producción de ácido giberélico (Fermentación 5 en matraz).	73
Figura 21. Producción de ácido giberélico (Fermentación 6 en matraz).	73
Figura 22. Producción de ácido giberélico (Fermentación 7 en matraz).	74
Figura 23. Producción de ácido giberélico (Fermentación 8 en matraz).	74
Figura 24. Producción de ácido giberélico (Fermentación 9 en matraz).	74
Figura 25. Producción de ácido giberélico (Fermentación 10 en matraz).	75
Figura 26. Producción de ácido giberélico (Fermentación 11 en matraz).	75
Figura 27. Producción de ácido giberélico (Fermentación 12 en matraz).	75
Figura 28. Producción de ácido giberélico (Fermentación 1 en biorreactor).	76
Figura 29. Producción de ácido giberélico (Fermentación 2 en biorreactor).	76
Figura 30. Producción de ácido giberélico (Fermentación 3 en biorreactor).	76
Figura 31. Producción de ácido giberélico (Fermentación 4 en biorreactor).	77
Figura 32. Producción de ácido giberélico (Fermentación 5 en biorreactor).	77
Figura 33. Producción de ácido giberélico (Fermentación 6 en biorreactor).	77
Figura 34. Producción de ácido giberélico (Fermentación 7 en biorreactor).	78
Figura 35. Producción de ácido giberélico (Fermentación 8 en biorreactor).	78
Figura 36. Producción de ácido giberélico (Fermentación 9 en biorreactor).	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Exportación mexicana de ácido giberélico Abr-Dic 2002.	18
Tabla 2. Exportación mexicana de ácido giberélico en el año 2005.	19
Tabla 3. Importación de ácido giberélico a México en el periodo Ene-Mar 2002.	19
Tabla 4. Empresas de México que comercializan reguladores de crecimiento para plantas ornamentales.	20
Tabla 5. Medio de cultivo base	29
Tabla 6. Medio utilizado para la producción de ácido giberélico en matraz con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2278.	30
Tabla 7. Medio utilizado para la producción de ácido giberélico en biorreactor con <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2278.	33
Tabla 8. Resultados de las 12 fermentaciones en matraz.	53
Tabla 9. Resultados de las 9 fermentaciones en biorreactor.	61

1 RESUMEN

Las giberelinas representan una familia de fitohormonas diterpénicas, ampliamente distribuidas en plantas y presentes en algunos hongos. Estas fitohormonas regulan el crecimiento y desarrollo vegetal de semillas y frutos y se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas constituyendo un complejo y creciente grupo de productos naturales.

Las giberelinas se obtienen por fermentación utilizando el hongo filamentoso *Gibberella fujikuroi*, microorganismo que se caracteriza por la producción de giberelinas a niveles de concentración mucho mayores a los encontrados en plantas.

En el presente proyecto de investigación se utilizó *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278 para la producción de ácido giberélico en cultivo sumergido. Se optimizaron las condiciones de cultivo (fuente de nitrógeno, glucosa para las fermentaciones en matraz) para la producción de ácido giberélico. Se utilizó un medio base para realizar 12 fermentaciones en matraz. Nueve fermentaciones se realizaron en biorreactor variando las condiciones de agitación, concentración glucosa y nitrógeno. Para cada fermentación se realizaron determinaciones de pH, concentración de glucosa, de amonio, de ácido giberélico (GA₃) y de biomasa. Se utilizó el método de superficie de respuesta como método de análisis estadístico. Se obtuvo una concentración de ácido giberélico de 0.02 gL⁻¹ en la fermentación en matraz se seleccionaron a partir de estas las condiciones para las fermentaciones en biorreactor obteniéndose hasta una concentración de 0.6 gL⁻¹ de ácido giberélico.

2 INTRODUCCIÓN

Las plantas no sólo necesitan para desarrollarse agua, nutrientes del suelo, luz solar y bióxido de carbono atmosférico. Como otros seres vivos, las plantas necesitan hormonas para lograr un crecimiento armónico, esto es, pequeñas cantidades de sustancias que se desplazan a través de sus fluidos regulando su crecimiento.

Las hormonas vegetales son aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo del vegetal. El término "sustancias reguladoras del crecimiento" es más general y abarca a las sustancias tanto de origen natural como sintéticas que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo en la planta.

Las giberelinas son una familia de fitohormonas diterpénicas, ampliamente distribuidas en plantas y presentes en algunos hongos. Estas fitohormonas regulan el crecimiento y desarrollo vegetal de semillas y frutos y se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas, constituyendo un complejo y creciente grupo de productos naturales. Debido al papel fundamental como reguladores del desarrollo vegetal, las giberelinas presentan interés en aplicaciones agronómicas. Las giberelinas se obtienen a niveles de concentración mucho mayores por *Gibberella fujikuroi* (6). Las funciones que llevan a cabo las giberelinas en la planta, se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Incrementan el crecimiento en los tallos.
2. Interrumpen el período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizan o transforman las reservas en azúcares.
3. Promueven el desarrollo de los frutos.
4. Regulan la transición entre la fase juvenil y la adulta.
5. Inducen la floración y la determinación sexual de la flor.

La metodología de superficie de respuesta, o MSR, es un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas en el estudio de la relación entre una o más respuestas y un conjunto de factores o variables independientes, donde el objetivo es optimizar ésta respuesta. Dicha metodología se realiza mediante una experimentación secuencial, esto es la aproximación a la región de interés y se realizará de forma iterativa utilizando cada vez más complejos que se obtienen de la información de cada etapa. Es útil para el modelado y análisis en aplicaciones.

En este trabajo se utilizó la MSR para evaluar el efecto de la relación de la fuente de carbono entre el nutriente complejo (agua de cocimiento de maíz) de cultivos en matraz y en biorreactor.

3 ANTECEDENTES

Las giberelinas regulan el crecimiento y desarrollo vegetal de semillas y frutos y se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas constituyendo un complejo y creciente grupo de productos naturales.

Cuando la planta germina, comienzan a actuar algunas sustancias hormonales que regulan su crecimiento desde esa temprana fase. Las giberelinas son las que gobiernan varios aspectos de la germinación; cuando la planta surge a la superficie, se forman las hormonas llamadas auxinas, las que aceleran su crecimiento vertical, y, posteriormente, comienzan a aparecer las citocininas, encargadas de la multiplicación de las células y que a su vez ayudan a la ramificación de la planta.

Las fitohormonas pertenecen a cinco grupos, de los cuales cada uno exhibe propiedades de regulación del crecimiento en plantas (0.001 a 10 mg por Kg de peso fresco), siendo activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta:

Auxinas: Las auxinas son sustancias que estimulan el crecimiento de las plantas, especialmente aquellas que pertenecen a un grupo de ácidos orgánicos no saturados y solubles en éter, como GA₄ (C₁₈H₃₂O₅). La auxina mejor conocida es el ácido indolacético, el cual promueve el crecimiento de la planta, la diferenciación celular, favorece la maduración del fruto, la floración y el geotropismo, retarda la caída de las hojas, flores y frutos jóvenes.

Giberelinas: Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en las puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Éstas determinan el crecimiento excesivo del tallo e inducen la germinación de la semilla.

Citocininas: Son hormonas vegetales naturales que incrementan el ritmo de crecimiento celular y transforman unas células vegetales en otras. Son producidas en las zonas de crecimiento, como en el meristemo de la punta de las raíces. Las mayores concentraciones de citocininas pueden facilitar su habilidad de actuar como fuente demandante de nutrientes.

Ácido Abscísico: El ácido abscísico es un inhibidor del crecimiento natural presente en plantas, propicia la caída de las hojas, detiene el crecimiento del tallo e inhibe la germinación de la semilla.

Por otra parte existen más de 100 giberelinas (GAs) en plantas superiores, pero sólo algunas tienen actividad biológica y el resto son precursores inactivos. Las más activas son el ácido giberélico (GA₃), GA₄ y GA₁ siendo ésta la más común en plantas.

Todas las giberelinas tienen el esqueleto de ent-giberelane y están divididas en dos grupos considerando si tienen 19 o 20 átomos de carbono. Sin embargo, la estructura básica de carbonos y la enumeración es similar para todas las giberelinas (16).

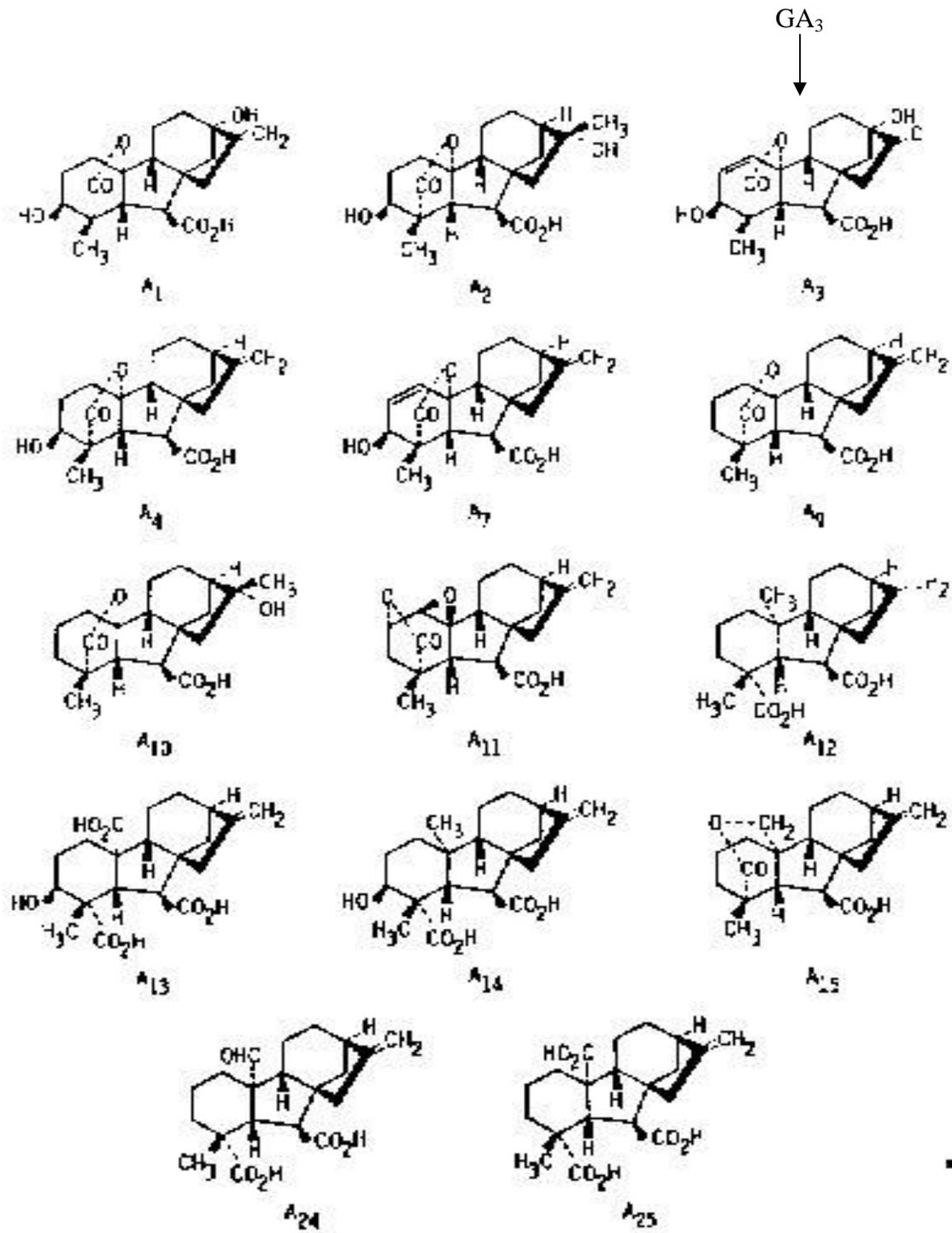


Figura 1. Estructura de las giberelinas y el ácido giberélico.

El ácido giberélico (GA₃), tiene una fórmula empírica C₁₉H₂₂O₆ es químicamente caracterizado como un ácido tetracarbo-cíclico dihidroxi- γ -lactónico conteniendo dos enlaces etilenos y un grupo de ácido carboxílico libre (16).

El ácido giberélico puro es un sólido cristalino blanco, soluble en agua hasta 5.0 gL⁻¹, y también es fácilmente soluble en disolventes orgánicos tales como etanol, metanol, acetato de etilo, de butilo y acetona. El ácido giberélico es estable al secado pero inestable en disoluciones acuosas. La vida del ácido giberélico en las disoluciones acuosas es del orden de los 14 días a 20 °C y de 2 h a 50 °C. En disoluciones acuosas, el GA₃ tiene un pH de 3 a 4.

En 1898 Hori descubrió el bakanae, enfermedad de la planta del arroz en el oriente, especialmente en Japón, y descubrió el agente causante que más tarde se identificó como un hongo imperfecto que recibió el nombre de *Gibberella fujikuroi* (1).

Gibberella fujikuroi es un hongo que presenta colonias inicialmente blancas, cubiertas por un micelio aéreo plumoso bien desarrollado. Al madurar produce un pigmento de delicado color lavanda a rojo púrpura en la parte superior e inferior del hongo (1).

En 1961 y 1964 Kurosawa demostró la relación del hongo con el bakanae al inducir los síntomas típicos del bakanae en plantas de arroz con cultivos estériles filtrados después de extraerlos de los hongos y nombró al principio activo “toxina”.

En 1961 y 1964 Borrow y colaboradores demostraron que el efecto del ión amonio en el medio de cultivo resultaba negativo en la biosíntesis de giberelinas por *G. Fujikuroi* (4), es decir, la producción de ácido giberélico comienza poco después, cuando la fuente de nitrógeno se agota y la cantidad producida de ácido giberélico es proporcional a la cantidad inicial de nitrógeno proveída.

En 1991 Bruckner y Blechschmidt reportaron que la producción del ácido giberélico inicia antes de que finalice la fase de crecimiento celular, independientemente del agotamiento de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. También observaron que el efecto del amonio es negativo en la síntesis de las giberelinas ya que induce la inhibición y represión de las enzimas que intervienen en la ruta de la biosíntesis de las giberelinas, principalmente de la 1,2-GA₄-deshidrogenasa.

En el 2000 Rodríguez Damián y Escamilla Silva demostraron que el aceite de ajonjolí es una buena fuente de carbono para la producción de giberelinas, sin embargo los rendimientos obtenidos sólo son un poco mayores a los obtenidos con glucosa como fuente de carbono, mientras que en su estudio la agitación resultó ser el factor de mayor importancia, ya que facilitó la transferencia de masa adecuada al sistema micelial.

En otras investigaciones, se han evaluado diversas fuentes de nitrógeno tales como nitratos y sales de amonio orgánicas e inorgánicas en la producción de GAs, sin embargo, en procesos industriales dichas fuentes, por economía, son sustituidas por fuentes de nitrógeno tales como el agua de cocimiento de maíz. Ejemplo de ello fue la sustitución del nitrato de amonio que en concentraciones de 1.0-4.0 gL⁻¹ a nivel laboratorio mostró ser el más adecuado para la producción de GA₃, por el agua de cocimiento de maíz en un proceso industrial obteniéndose mejores rendimientos con menores costos (15).

En el 2000 Licea De Anda y Escamilla Silva reportaron que el uso de micelio inmovilizado en biorreactor de lecho fluidizado favoreció las velocidades de transferencia de masa en gas y líquido. Los experimentos realizados en reactor lograron alcanzar el estado continuo, prolongando hasta el doble de tiempo de producción de GA₃, en comparación con los cultivos en batch. Los factores que influyeron en la producción de ácido giberélico en sistema continuo fueron la velocidad de alimentación del medio y la relación C/N, mientras que en matraz los factores que más influenciaron en la producción de GA₃ fueron pH, Glucosa y NH₄Cl.

En el 2003 Durán Páramo y Molina Jiménez reportaron la producción de ácido giberélico con células libres e inmovilizadas en diferentes sistemas. En los sistemas con células inmovilizadas no hubo diferencias significativas en la producción de ácido giberélico debido a la limitación difusional del soporte. Sin embargo la producción de ácido giberélico en los sistemas con células libres fue mayor en matraz agitado que en biorreactor.

En un proceso de producción a nivel industrial de GA₃ se deben de tomar en consideración algunos aspectos industriales y económicamente importantes como son, entre otros, los siguientes:

- 1) El costo de producción.
- 2) Rendimientos de producción.
 - 2.1) El proceso de Fermentación semisólida (SmF), es insignificante para la mejora del rendimiento y la economía del proceso para la producción de ácido giberélico.
 - 2.2) Se obtienen rendimientos más bajos con el uso de células inmovilizadas.
- 3) Existen dificultades prácticas a escala industrial en cultivos continuos.
- 4) La Fermentación en estado sólido (SSF) es aparentemente la mejor y favorece la economía del proceso y la producción de GA₃.

En los cultivos por lote alimentado en procesos de SSF, los componentes del medio minimizan los costos de producción y elevan la concentración de GA₃ en comparación con los procesos de SmF (16).

3.1 Importación y exportación de ácido giberélico

La Secretaría de Fomento y Comercio Industrial (SECOFI) de México realizó un estudio de la importación de ácido giberélico a México, como se puede observar en la figura 1 y 2. En el año de 1996 se obtuvo la mayor importación siendo de 600 toneladas de ácido giberélico alcanzando un valor de \$ 4,491.061 dólares.

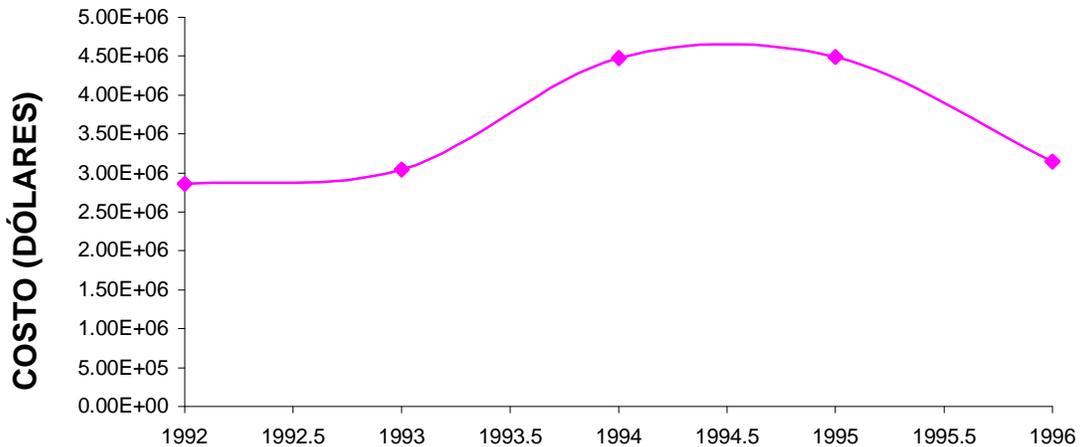


Figura 2. Importación en México de ácido giberélico (Costo en dólares).

Fuente: Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI).

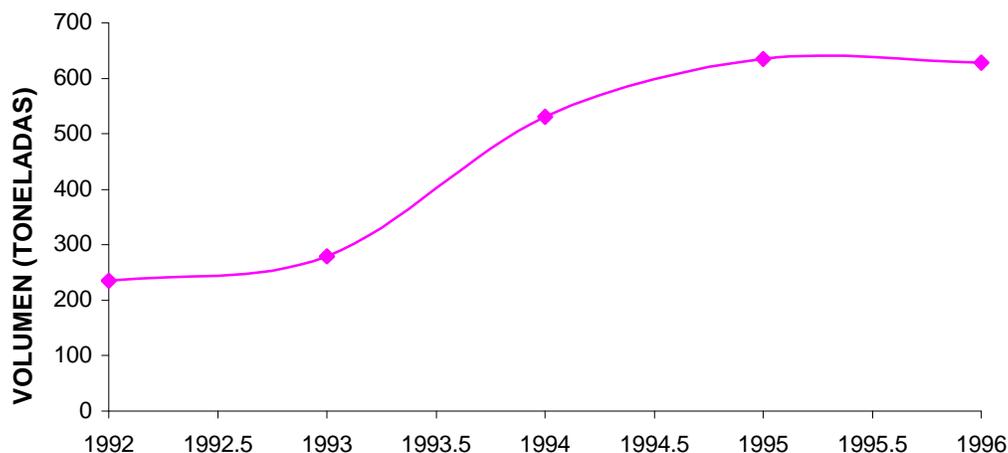


Figura 3. Importación en México de ácido giberélico (volumen-toneladas).

Fuente: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI).

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI) reportó datos de importación y exportación en los años 2002 y 2005, como se muestran en las tablas 1 a 3.

Tabla 1. Exportación mexicana de ácido giberélico Abr-Dic 2002.

PAÍS / PRODUCTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD			VALOR EN MILES DE PESOS		
		RESTO	MAQUILA	TOTAL	RESTO	MAQUILA	TOTAL
ALEMANIA	Kg	518	---	518	173	---	173
REPÚBLICA DOMINICANA		300	---	300	65	---	65
Ácido giberélico		818	---	818	238	---	238

Fuente: Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2005. Periodo (ARB-DIC 2002). Edición 2003.

Tabla 2. Exportación mexicana de ácido giberélico en el año 2005.

PAÍS / PRODUCTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD			VALOR EN DÓLARES		
		RESTO / MAQUILA / TOTAL			RESTO/ MAQUILA/ TOTAL		
IRAN	Kg	4	---	4	1890	---	1890
URUGUAY		414	---	414	14754	---	14754
Ácido giberélico		418	---	418	16644	---	16644

Fuente: Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2005.

Tabla 3. Importación de ácido giberélico a México en el periodo Ene-Mar 2002.

PAÍS / PRODUCTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD			VALOR EN MILES DE DÓLARES		
		RESTO/ MAQUILA / TOTAL			RESTO/ MAQUILA / TOTAL		
CHINA (Republica Popular)	Kg	596	---	596	118	---	118
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		2980	---	2980	23	---	23
Ácido giberélico		3576	---	3576	141	---	141

Fuente: Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2005. Periodo (ENE-MAR 2002). Edición 2003.

Actualmente existen empresas en México que comercializan reguladores de crecimiento para plantas ornamentales. En la tabla 4 aparecen algunas empresas y el nombre comercial del producto.

Tabla 4. Empresas de México que comercializan reguladores de crecimiento para plantas ornamentales.

EMPRESA NACIONAL	PRODUCTO COMERCIAL
Agricultura Nacional, S.A. de C.V.	Zoom
Agro – Grow de México, S.A. de C.V.	Gibiotin
Corporación Bioquímica de México, S.A. de C.V.	Cyto – Gib
Gapol de México	Gapol
Grupo Bioquímico Mexicano, S.A. de C.V	Biozyme pp (polvo)
EMPRESA EXTRANJERA	PRODUCTO COMERCIAL
Compañía Colombiana de inversiones Agrícolas, S.A. COLINAGRO	Acibig
Aquitecno (Industria-Colombia)	Ácido Giberélico 4+7; GA4+7, Ácido Giberélico 3; GA ₃ ,
Comisa	Ácido giberélico
Valno	Ácido giberélico
Fertichem S.A. de C.V. y/o MYCSA AG Inc.	Ácido giberélico
Grupo Pujol	Ácido giberélico
Prest	Ácido giberélico

3.3 Aproximación de una superficie de respuesta por polinomios.

La aproximación de una relación funcional desconocida f , se puede hacer de la manera más simple por el modelo lineal de primer orden:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon; \varepsilon \sim N(0, \sigma^2).$$

el cual representa la ecuación de un plano.

En el caso de que el modelo de primer orden no sea adecuado, el siguiente modelo de segundo orden se puede utilizar:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon; (i, j = 1, \dots, k; i < j); \varepsilon \sim N(0, \sigma^2).$$

La superficie de respuesta del segundo orden dado por $E(Y)$ puede ser una parábola, hipérbola, elipse o sus generalizaciones correspondientes en el caso k -dimensional.

Así también en el caso de que fuera necesario, superficies polinomiales de orden superior a dos, se pueden utilizar.

Una superficie polinomial de esta naturaleza, se debe considerar solo como una aproximación de la verdadera relación funcional ϕ en el interior de una región considerada en el experimento. Una extrapolación que intenta hacer predicciones fuera de la región experimental puede ser arriesgada y no confiable.

3.4 Diseño de primer orden

Los diseños de primer orden son aquellos que permiten la estimación de parámetros de un modelo polinomial de grado uno.

- ✓ Experimentos factoriales de la serie 2^k
- ✓ Repetición fraccionada $1/2^p$ del factorial 2^k

Estos diseños son muy convenientes en trabajos exploratorios para obtener el ajuste de una relación lineal entre la respuesta como variable dependiente y las variables independientes.

Estos diseños también se pueden utilizar en las etapas iniciales de un programa de experimentación secuencial en la búsqueda de la respuesta óptima.

3.5 Diseño de segundo orden

Los diseños de segundo orden permiten la estimación de parámetros de un modelo polinomial de grado dos. Ejemplos simples de este tipo de diseños son las series de 3^k factorial.

La desventaja de la serie 3^k es que con $k > 3$, el número de puntos experimentales que se requieren para conducir el experimento, llega a ser muy alto. Además los parámetros b_{11}, \dots, b_{kk} ; en general se estiman con precisión relativamente baja.

En 1951 Box y Wilson han desarrollado una familia de diseños llamados diseños compuestos que son más convenientes para este propósito y se presentan a continuación:

3.6 Construcción de diseños compuestos centrales

El empleo de un diseño central compuesto (DCC) para ajustar un modelo de superficie de respuesta de segundo orden (26).

Estos diseños se emplean mucho en la práctica por que son relativamente eficientes con respecto al número de corridas que requieren. En general, un DCC en K factores requiere 2^k corridas factoriales, $2k$ corridas axiales y al menos un punto central (lo común es emplear de tres a cinco puntos).

El diseño central compuesto se hace rotatable mediante una elección apropiada del espaciamiento axial α . Si el diseño es rotatable, la desviación estándar de la respuesta predicha \bar{y} es constante en todos los puntos que están a la misma distancia del centro del diseño. Para rotabilidad, elíjase $\alpha=(F)^{1/4}$, donde F es el número de puntos en la parte factorial del diseño (usualmente $F=2^k$). Para el caso donde $K=2$ factores, $\alpha= (2^2)^{1/4}=1.414$.

Los puntos experimentales de este diseño consisten en:

- ✓ Puntos del factorial 2^k o su fracción, ampliado por : $2k$ puntos axiales sobre los ejes de las variables independientes, denotados:
 $(-\alpha, 0, \dots, 0); (\alpha, 0, \dots, 0); (0, -\alpha, \dots, 0); (0, \alpha, \dots, 0); \dots ; (0, 0, \dots, -\alpha); (0, 0, \dots, \alpha)$
- ✓ Punto(s) sobre el centro del diseño.

El valor de α se puede elegir para:

- ✓ Dar la propiedad de ortogonalidad al diseño o
- ✓ Minimizar el sesgo que surge si el modelo planteado en una investigación es de grado dos pero el modelo verdadero tiene grado superior a dos o
- ✓ Dar la propiedad de rotabilidad al diseño

4 JUSTIFICACIÓN

Debido a que actualmente se tiene una alta demanda de hormonas vegetales para el crecimiento de plantas, se vió la necesidad de buscar nuevas alternativas de producir una hormona de origen natural (ácido giberélico) por *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278. El ácido giberélico no presenta un efecto negativo en el suelo ni en los frutos; por el contrario, reduce el tiempo de germinación y acorta el período de desarrollo de plantas, mejora la calidad del producto e incrementa la fijación del fruto. Por otro lado, el ácido giberélico también beneficia a los vegetales con mejores rendimientos y se obtiene una comercialización más temprana, por ello el interés de este proyecto consistió en la optimización del proceso de producción de ácido giberélico por fermentación sumergida con *Gibberella fujikuroi*, lo que permitirá en un futuro satisfacer la demanda nacional de ácido giberélico.

5 OBJETIVOS

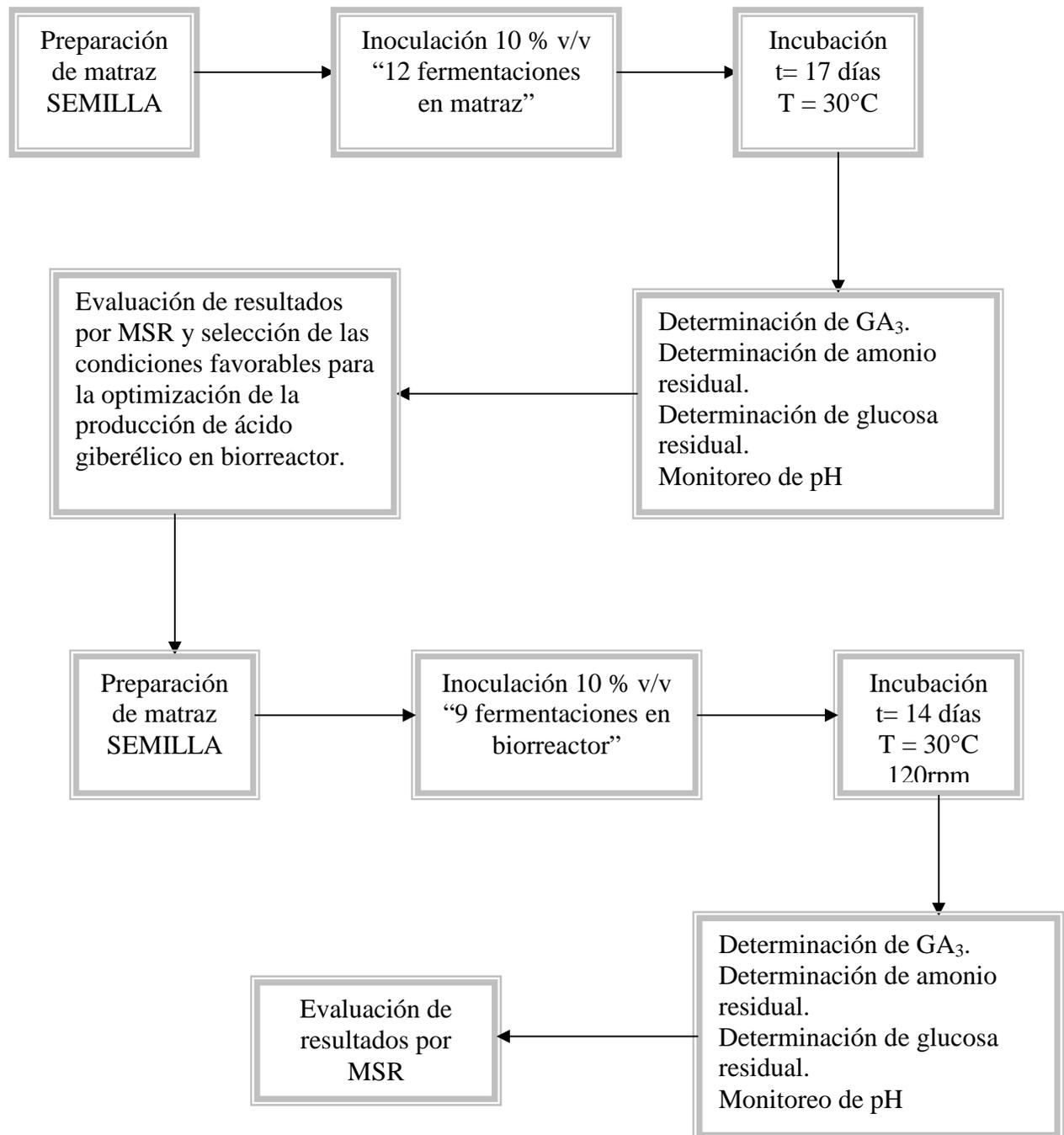
5.1 GENERAL

- Optimizar la producción de ácido giberélico (GA₃) con *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278.

5.2 ESPECÍFICOS

- Seleccionar las condiciones de máxima producción en matraz para la cepa *G. fujikuroi* NRRL-2278.
- Determinar el efecto de la concentración de la fuente de nitrógeno sobre la producción de GA₃ en cultivos en matraz y en el biorreactor de 2 litros para la cepa *G. fujikuroi* NRRL- 2278.
- Desarrollar un modelo estadístico de superficie de respuesta para la producción de ácido giberélico con *G. fujikuroi* NRRL- 2278 para los cultivos en matraz y en biorreactor.

6 MATERIALES Y MÉTODOS



Esquema 1. Diagrama de flujo para la optimización de la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278.

6.1 Microorganismo

La cepa *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278 que se utilizó proviene del Departamento de los Estados Unidos la cual se encontraba conservada en refrigeración a 4°C en agar papa dextrosa (PDA), se activó en caldo nutritivo, enriquecido con el 2% de glucosa; ésto se llevó a cabo por períodos de 2 meses.

6.2 Selección de medio sintético

Se realizaron doce fermentaciones en matraz con un volumen de 200 mL. del medio de cultivo cada una, variando las concentraciones de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, con la finalidad de seleccionar el medio de cultivo que favoreciera la producción de GA₃. La duración de la fermentación fue de 17 días en los cuales se tomaron muestras de 10 mL., primero cada 12 horas y la quinta muestra (60 h aprox.) cada 24 horas. En cada muestra se determinó glucosa residual, amonio residual, biomasa, pH y GA₃. El medio se ajustó a un pH inicial de 5.

Se empleó un cultivo base durante las fermentaciones, que fueron llevadas a cabo durante la realización de este proyecto. El medio de cultivo base que se empleó fue reportado por Álvarez y Molina (1), cuya composición es la siguiente:

Tabla 5. Medio de cultivo base

Componente	Concentración (gL ⁻¹)
Glucosa	25
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄	1
NH ₄ NO ₃	0.3

A partir del medio de cultivo base se variaron las concentraciones de glucosa, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄, con la finalidad de seleccionar el medio de cultivo que favoreciera la producción de GA₃. Las composiciones de los medios se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Medio utilizado para la producción de ácido giberélico en matraz con *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278.

Conc. (gL ⁻¹) Componente	Fer. Matraz 1	Fer. Matraz 2	Fer. Matraz 3	Fer. Matraz 4	Fer. Matraz 5	Fer. Matraz 6	Fer. Matraz 7	Fer. Matraz 8	Fer. Matraz* 9	Fer. Matraz* 10	Fer. Matraz* 11	Fer. Matraz* 12
Glucosa	24.4	24.4	45.6	45.6	35	34	20	50	35	35	35	35
Sulfato de amonio	2.8	1.09	2.8	1.05	4	1	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66
Agua de cocimiento de maíz	1.8	2.95	1.8	2.95	1	3	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56	2.56
Fosfato de potasio	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sulfato de magnesio	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

* Cuatro medios de cultivo conservaron la misma composición ya que se requirieron para el desarrollo del modelo de superficie de respuesta.

El pH inicial de todos los medios fue ajustado a 5.

Temperatura 30°C, Agitación 120 rpm.

Fuente de carbono: Glucosa, para las fermentaciones en matraz y biorreactor.

Fuente de Nitrógeno: Agua de cocimiento de maíz + sulfato de amonio, para las fermentaciones en matraz y biorreactor.

6.3 Desarrollo del modelo de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta, o MSR, es un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para el modelado y análisis en aplicaciones donde la respuesta de interés está influenciada por diferentes variables y el objetivo es optimizar la respuesta.

La MSR es un procedimiento secuencial, el análisis de una superficie de respuesta puede considerarse como la “subida a una Colina”, donde la cima representa el punto en que la respuesta es máxima. Si el óptimo verdadero es un punto de respuesta mínima, entonces el proceso puede concebirse como un “descenso al valle”.

El objetivo del MSR es determinar las condiciones de operación óptimas para el sistema (20).

En este proyecto de investigación se utilizó el MSR para evaluar el efecto combinado del pH inicial y la relación entre el nutriente complejo (agua de cocimiento de maíz) y fuente de carbono de cultivos en matraz y en biorreactor.

6.4 Fermentaciones en matraz

Se realizaron doce fermentaciones en matraz, los cuales contuvieron 200 mL del medio de cultivo. El medio de cultivo se ajustó a un pH inicial de 5 y se esterilizó a 121°C por 15 min. En la tabla 6 se muestra la formulación de los medios de cultivo de las doce fermentaciones en matraz. Las fermentaciones en matraz se llevaron a cabo en un periodo de 17 días. Se determinó glucosa residual, amonio residual, biomasa, pH y GA₃. Las doce fermentaciones en matraz se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: agitación: 120 rpm; temperatura: 30°C.

6.5 Fermentaciones en biorreactor

Para llevar a cabo las fermentaciones en biorreactor se partió de las fermentaciones en matraz. Se determinó la formulación para los medios de cultivo a partir del resultado de la superficie de respuesta basándose en la fermentación que dio mayor producción de GA₃. En las fermentaciones en biorreactor, además de evaluar el efecto combinado del nutriente complejo (agua de cocimiento de maíz) y la fuente de carbono, también se evaluó el efecto de la agitación para determinar si éste afecta o no la producción de ácido giberélico. La formulación para las 9 fermentaciones en biorreactor se muestran en la tabla 7, las cuales se llevaron a cabo a una temperatura de 30°C, aireación constante de 1.5 vvm, con agitación variable.

Tabla 7. Medio utilizado para la producción de ácido giberélico en biorreactor con *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278.

Conc. (g1.8L ⁻¹) Componente	Fer. biorreactor 1	Fer. biorreactor 2	Fer. biorreactor 3	Fer. biorreactor 4	Fer. biorreactor 5	Fer. biorreactor 6	Fer. biorreactor 7	Fer. biorreactor 8	Fer. biorreactor 9
Glucosa	88	70.08	96	70.08	88	96	70.08	96	88
Sulfato de amonio	1.2	2.6	0.6	2.6	1.2	0.60	2.6	0.6	1.2
Agua de cocimiento de maíz	1.96	4.17	0.97	4.17	1.96	0.97	4.17	0.97	1.96
Fosfato de potasio	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Sulfato de magnesio	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Extracto de Levadura	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Solución de nutrientes mLL⁻¹	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Agitación (rpm)	450	300	300	150	150	450	450	150	300

6.6 Determinación de Biomasa.

La determinación de la Biomasa se realizó de la siguiente manera: del cultivo en fermentación, se tomó una muestra de 10 mL, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por una hora; enseguida se separó el precipitado del sobrenadante. El precipitado se colocó en una micro charola de aluminio previamente pesada, finalmente se introdujo a una estufa a 65°C hasta obtener peso constante y por diferencia de peso se cuantificó la biomasa producida durante la fermentación.

6.7 Determinación de azúcares reductores.

La cuantificación de glucosa residual se realizó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores. El método DNS cuantifica los grupos reductores en hemiacetal. La cantidad de ácido dinitrosalicílico formada es estimada colorimétricamente a 540 nm y corresponde a la cantidad de azúcares reductores formados (1).

El reactivo DNS se preparó de la siguiente manera:

Para preparar 100 mL de reactivo DNS, primero se peso 1 g de DNS, 1.6 g de Hidróxido de sodio y 30 g de Tartrato de sodio y potasio, se oforó 100 mL de agua destilada los cuales se utilizaron para disolver primero el tartrato de sodio y potasio, enseguida se adicionó el hidróxido de sodio previamente ya disuelto y por ultimo se adicionó el Ac.3,5-DNS ya disuelto y finalmente se aforó a 100 mL con agua destilada y se conservó al abrigo de la luz (11).

En la figura 4 se muestra la curva tipo de azúcares reductores.

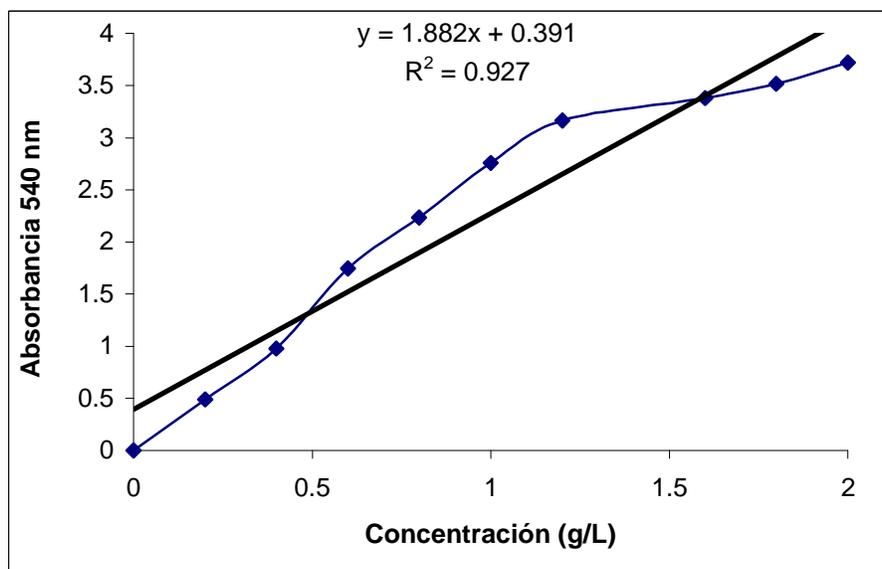


Figura 4. Curva tipo de Azúcares reductores.

Posteriormente se llevó a cabo para cada fermentación la determinación de azúcares reductores, la cual se realizó de la siguiente manera: de cada uno de los sobrenadantes se realizó una toma de muestra de 0.1 mL., enseguida se adicionan 0.9 mL de agua destilada y finalmente 1 mL de reactivo DNS. Se homogeniza y se somete a un baño maría a ebullición durante 5 min. después se enfría, posteriormente se adicionan 10 mL de agua destilada y finalmente se lee a una absorbancia de 540 nm ajustando con el blanco.

6.8 Determinación de amonio residual.

La determinación de amonio residual se midió por medio del electrodo de amonio pH ya que es de fácil uso, por que éste mide directamente el amonio residual en partes por millón (ppm) contenido en el sobrenadante por medio de una membrana que está contenida en el instrumento, la cual envía una señal al potenciómetro, de tal manera que muestra el valor del amonio residual contenido en el caldo. El equipo debe estar previamente calibrado con soluciones de amonio de concentraciones conocidas.

6.9 Determinación de ácido giberélico por electroforesis capilar (CE).

La electroforesis capilar es muy similar a la cromatografía líquida de alta resolución, salvo en el fundamento de separación de los componentes de las muestras.

La muestra es introducida por el sistema de inyección en el capilar neutro lleno de buffer de boratos que se mueven en condiciones de presión o voltaje.

Tras la inyección de la muestra se inicia la electroforesis aplicando un voltaje muy alto al sistema, que hace que las diferentes partículas de la muestra migren diferencialmente de forma muy rápida hacia el sistema de análisis (espectrofotómetro uv-visible), el cual analiza las diferentes fracciones que van pasando por el equipo.

Este método permite determinar la presencia de ácido giberélico. La muestra es inyectada en el capilar manteniendo un voltaje de 15 Kv. Los componentes migran diferencialmente por el capilar en un tiempo determinado. El tiempo en el que se observa la presencia de ácido giberélico va de 7.2 a 8.9 min. (Figura 5). Se determina la concentración GA₃ por medio de la curva tipo de ácido giberélico que se realizó previamente. Los resultados obtenidos fueron empleados para construir superficies de respuesta. Posteriormente se llevaron a cabo fermentaciones en biorreactor, manteniendo pH constante y variando la velocidad de agitación y la relación de la fuente de nitrógeno (agua de cocimiento de maíz) (Tabla 7). En estas fermentaciones se contó con un control de pH, agitación, medición de oxígeno disuelto y aireación constante (1.5 vvm).

Las fermentaciones en biorreactor tuvieron la misma duración y se realizaron las mismas determinaciones que en las fermentaciones en matraz.

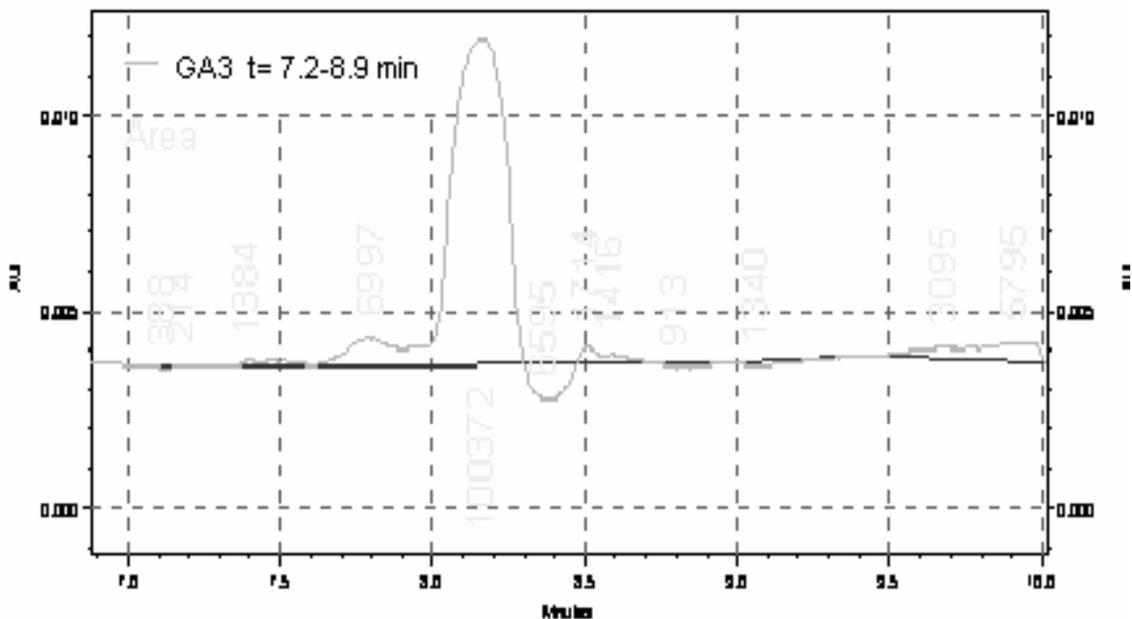


Figura 5. Gráfica del tiempo de retención (7.2-8.9 min.) para el ácido giberélico.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Modelo de superficie de respuesta para las fermentaciones en matraz y en biorreactor.

El objetivo eventual de la MSR es determinar las condiciones de operación óptimas para el sistema o determinar una región del espacio de factores en la que se satisfacen las especificaciones de operación.

El modelo de superficie de respuesta tiene importantes aplicaciones en el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos.

❖ Modelo de superficie de respuesta para las fermentaciones en matraz.

Para evaluar la optimización de la producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, se requirió establecer las siguientes variables para el desarrollo del modelo de superficie de respuesta.

n : Es el número de experimentos, es decir, 12 fermentaciones en matraz.

$$n := 12$$

k : Es el número total de variables. La fuente de carbono y la de nitrógeno.

$$k := 2$$

p = Es un contador.

$$p := k + 1$$

Y : Es el valor que representa la cantidad de producción de ácido giberélico que se obtenga en las fermentaciones en matraz (vector).

$$Y := \begin{pmatrix} 0.0092 \\ 0.0159 \\ 0.0248 \\ 0.0211 \\ 0.0141 \\ 0.0152 \\ 0.0114 \\ 0.0266 \\ 0.0250 \\ 0.0063 \\ 0.0062 \\ 0.0158 \end{pmatrix}$$

X : Es la matriz donde se establecen las variables codificadas.

$$X := \begin{pmatrix} 1 & -4.4 & -1 & 19.36 & 1 & 4.4 \\ 1 & -4.96 & -1 & 24.60 & 1 & 4.96 \\ 1 & -4.4 & 0.65 & 19.36 & 0.43 & -2.88 \\ 1 & -5 & 0.65 & 25 & 0.43 & -3.28 \\ 1 & -4 & -0.17 & 16 & 0.029 & 0.687 \\ 1 & -5 & -0.25 & 25 & 0.062 & 1.25 \\ 1 & -4.78 & -1.34 & 22.84 & 1.805 & 6.423 \\ 1 & -4.78 & 1 & 22.84 & 1 & -4.78 \\ 1 & -4.78 & -0.17 & 22.84 & 0.0295 & 0.821 \\ 1 & -4.78 & -0.17 & 22.84 & 0.0295 & 0.821 \\ 1 & -4.78 & -0.17 & 22.84 & 0.0295 & 0.821 \\ 1 & -4.78 & -0.17 & 22.84 & 0.0295 & 0.821 \end{pmatrix}$$

a: Es el producto de la matriz transpuesta y la matriz de datos

$$a := X^T \cdot X$$

$$a = \begin{pmatrix} 12 & -56.44 & -2.14 & 266.36 & 5.874 & 10.064 \\ -56.44 & 266.412 & 10.056 & -1.261 \times 10^3 & -27.8 & -47.439 \\ -2.14 & 10.056 & 5.848 & -47.393 & -2.9 & -27.738 \\ 266.36 & -1.261 \times 10^3 & -47.393 & 5.991 \times 10^3 & 131.81 & 224.218 \\ 5.874 & -27.8 & -2.9 & 131.81 & 6.636 & 13.719 \\ 10.064 & -47.439 & -27.738 & 224.218 & 13.719 & 131.848 \end{pmatrix}$$

b: Es el producto de la matriz inversa del producto de matrices y la matriz de respuesta.

$$b(X, Y) := (X^T \cdot X)^{-1} \cdot (X^T \cdot Y)$$

$$b(X, Y) = \begin{pmatrix} 0.186 \\ 0.075 \\ 0.056 \\ 8.208 \times 10^{-3} \\ 4.533 \times 10^{-3} \\ 0.01 \end{pmatrix}$$

G: Son los límites de glucosa

$$G := -1.414, -1.35.. 1.414|$$

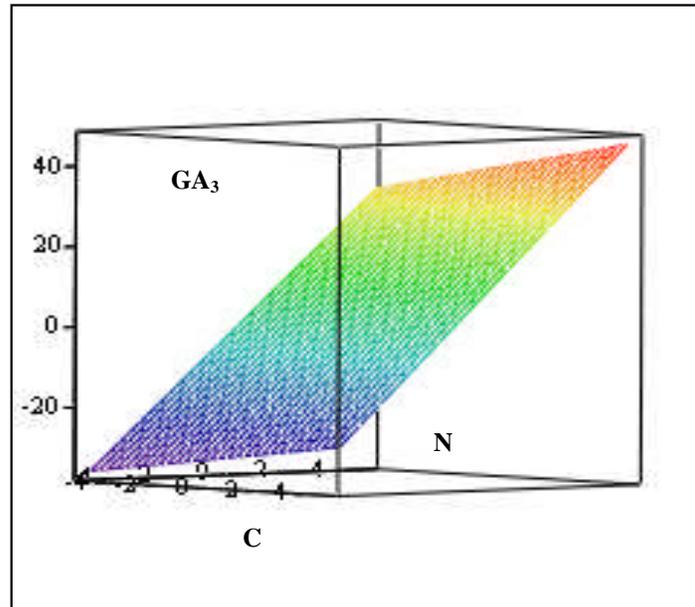
RN = Relación de nitrógeno

$$RN := -1.414, -1.35.. 1.414|$$

y(RN,G): Es la ecuación que representa el modelo de segundo orden.

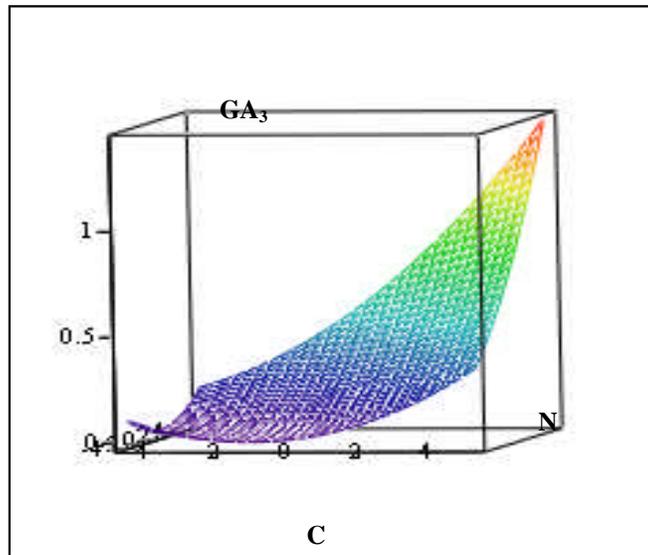
$$y(RN, G) := b(X, Y)_0 + (b(X, Y)_1 \cdot RN) + (b(X, Y)_2 \cdot G) + (b(X, Y)_3 \cdot RN^2) + (b(X, Y)_4 \cdot G^2) + (b(X, Y)_5 \cdot G \cdot RN)|$$

En las siguientes figuras se representa el modelo de primer orden y segundo orden para las fermentaciones en matraz.



First_order

Figura 6. Representación del modelo de primer orden para las fermentaciones en matraz.



Second_order

Figura 7. Representación del modelo de segundo orden para las fermentaciones en matraz.

Estimación de los mínimos cuadrados (Análisis de Varianza)

$$\begin{aligned}
 SSE &:= (Y^T \cdot Y) - (b(X, Y)^T \cdot X^T \cdot Y) & SSE &= (2.508 \times 10^{-4}) & (Y^T \cdot Y) &= (3.618 \times 10^{-3}) \\
 SSR &:= (b(X, Y)^T \cdot X^T \cdot Y) - \frac{\left(\sum_{i=0}^{n-1} Y_i \right)^2}{n} & SSR &= (3.078 \times 10^{-4}) & (b(X, Y)^T \cdot X^T \cdot Y) &= (3.367 \times 10^{-3}) \\
 SYY &:= (Y^T \cdot Y) - \frac{\left(\sum_{i=0}^{n-1} Y_i \right)^2}{n} & SYY &= (5.586 \times 10^{-4}) \\
 MSR &:= \frac{SSR}{k} & MSR &= (1.539 \times 10^{-4}) \\
 MSE &:= \frac{SSE}{(n - k - 1)} & MSE &= (2.787 \times 10^{-5}) \\
 Fo &:= \frac{1.539 \times 10^{-4}}{MSE}
 \end{aligned}$$

$$Fo = (5.522)$$

SSE: Es la suma residual de los mínimos cuadrados (error).

SRR: Es la regresión de la suma de los mínimos cuadrados.

SYY: Es el total de la suma de los mínimos cuadrados.

❖ **Modelo de superficie de respuesta para la fermentación en biorreactor.**

n: Es el número de experimentos, es decir, se llevaron a cabo 9 fermentaciones en biorreactor; por lo tanto $n = 9$.

$$n := 9$$

k: Es el número total de variables. Las variables que se manejaron para la producción de ácido giberélico, la relación carbono/nitrógeno y la agitación (rpm); por lo tanto $k = 2$.

$$k := 2$$

p = Es un contador.

$$p := k + 1$$

Y: Es el valor que representa la cantidad de producción de ácido giberélico en las fermentaciones en matraz (vector).

$$Y := \begin{pmatrix} 0.254 \\ 0.005 \\ 0.624 \\ 0.200 \\ 0.158 \\ 0.239 \\ 0.743 \\ 0.155 \\ 0.175 \end{pmatrix}$$

X: Es la matriz donde se establecen las variables codificadas.

$$X := \begin{pmatrix} 1 & 8.5 & -1 & 72.25 & 1 & -8.5 \\ 1 & 8.5 & 0 & 72.25 & 0 & 0 \\ 1 & 8.5 & 1 & 72.25 & 1 & 8.5 \\ 1 & 28.5 & -1 & 812.25 & 1 & -28.5 \\ 1 & 28.5 & 0 & 812.25 & 0 & 0 \\ 1 & 28.5 & 1 & 812.25 & 1 & 28.5 \\ 1 & 48.5 & -1 & 2352.25 & 1 & -48.5 \\ 1 & 48.5 & 0 & 2352.25 & 0 & 0 \\ 1 & 48.5 & 1 & 2352.25 & 1 & 48.5 \end{pmatrix}$$

a: Es el producto de la matriz transpuesta y la matriz de datos

$$a := X^T \cdot X = \begin{pmatrix} 9 & 256.5 & 0 & 9.71 \times 10^3 & 6 & 0 \\ 256.5 & 9.71 \times 10^3 & 0 & 4.135 \times 10^5 & 171 & 0 \\ 0 & 0 & 6 & 0 & 0 & 171 \\ 9.71 \times 10^3 & 4.135 \times 10^5 & 0 & 1.859 \times 10^7 & 6.473 \times 10^3 & 0 \\ 6 & 171 & 0 & 6.473 \times 10^3 & 6 & 0 \\ 0 & 0 & 171 & 0 & 0 & 6.473 \times 10^3 \end{pmatrix}$$

b: Es el producto de la matriz inversa del producto de matrices y la matriz de respuesta.

$$b(X, Y) := (X^T \cdot X)^{-1} \cdot (X^T \cdot Y)$$

$$b(X, Y) = \begin{pmatrix} 0.234 \\ -0.017 \\ 0.308 \\ 3.175 \times 10^{-4} \\ 0.267 \\ -0.012 \end{pmatrix}$$

C/N: Son los límites de la relación carbono-nitrógeno

$$C/N := -1.0, -0.9 .. 1.0$$

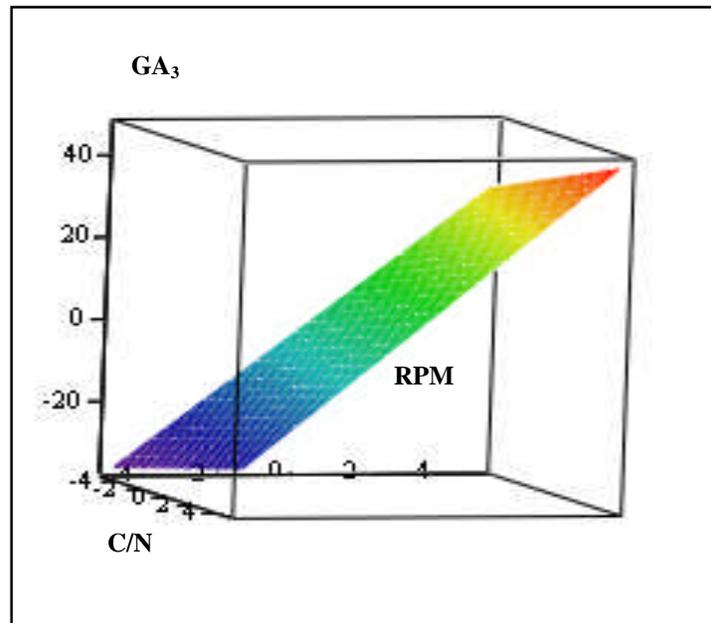
RPM = Agitación variable

$$RPM := -1.0, -0.9 .. 1.0$$

y(RPM, C/N) : Es la ecuación que representa el modelo de segundo orden.

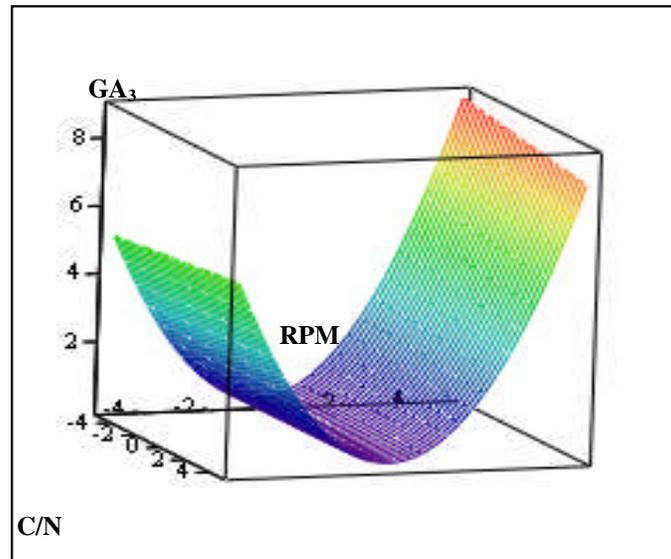
$$y(RN, G) := b(X, Y)_0 + (b(X, Y)_1 \cdot RN) + (b(X, Y)_2 \cdot G) + (b(X, Y)_3 \cdot RN^2) + (b(X, Y)_4 \cdot G^2) + (b(X, Y)_5 \cdot G \cdot RN)$$

En las siguientes figuras se representa el modelo de primer orden y segundo orden, para las fermentaciones en biorreactor.



First_order

Figura 8. Representación del modelo de primer orden para las fermentaciones en biorreactor.



Second_order

Figura 9. Representación del modelo de segundo orden para las fermentaciones en biorreactor.

Estimación de los mínimos cuadrados (Análisis de Varianza)

$$SSE := (Y^T \cdot Y) - (b(X, Y)^T \cdot X^T \cdot Y)$$

$$SSE = (0.054)$$

$$SSR := (b(X, Y)^T \cdot X^T \cdot Y) - \frac{\left(\sum_{i=0}^{n-1} Y_i \right)^2}{n}$$

$$SSR = (0.404)$$

$$SYY := (Y^T \cdot Y) - \frac{\left(\sum_{i=0}^{n-1} Y_i \right)^2}{n}$$

$$SYY = (0.459)$$

$$MSR := \frac{SSR}{k}$$

$$MSR = (0.202)$$

$$MSE := \frac{SSE}{(n - k - 1)}$$

$$MSE = (9.001 \times 10^{-3})$$

$$F_o := \frac{0.202}{MSE}$$

$$F_o = (22.442)$$

SSE: Es la suma residual de los mínimos cuadrados (error).

SRR: Es la regresión de la suma de los mínimos cuadrados.

SYY: Es el total de la suma de los mínimos cuadrados.

Nota: Las variables G y RN para este modelo son C/N y RPM respectivamente.

7.2 Fermentaciones en matraz

Se diseñó el modelo de superficie de respuesta para doce y nueve fermentaciones en matraz y biorreactor respectivamente, el cual consistió en variar la composición del medio, (como se mostró en la tabla 6 y 7), con la finalidad de seleccionar aquél que favoreciera la mayor producción de GA₃.

$$\check{Y}=0.186+0.075x_1+0.056x_2+8.208*10^{-3}x_1^2+4.533*10^{-3}x_2^2+0.01x_1x_2$$

Modelo de superficie de respuesta para las fermentaciones en matraz.

Se consideraron los puntos más altos de concentración de ácido giberélico obtenidos, para diseñar el modelo de superficie de respuesta.

Se observa en la figura 10 las condiciones óptimas para alcanzar una mayor producción de GA₃, es decir, para las doce fermentaciones en matraz se logró sólo un experimento (matraz 8), obteniéndose hasta una concentración de 0.026 gL⁻¹ de GA₃, trabajando bajo las condiciones iniciales de 50 gL⁻¹ de fuente de carbono y 4.22 gL⁻¹ de fuente de nitrógeno.

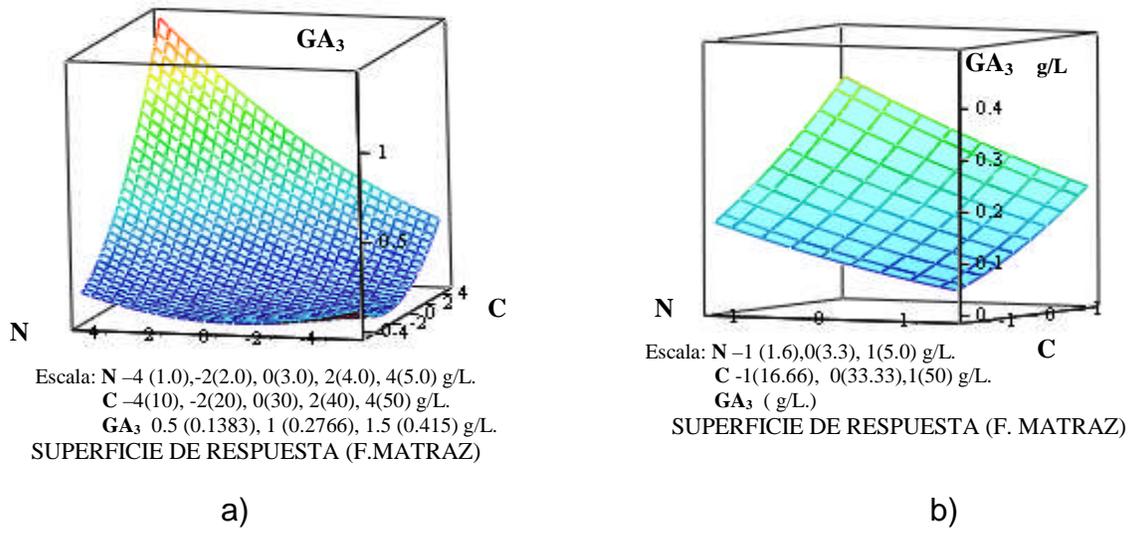


Figura 10. Superficie de respuesta (Fermentaciones en matraz), a) superficie de respuesta fermentación en matraz, variables codificadas, b) superficie de respuesta en variables reales en z.

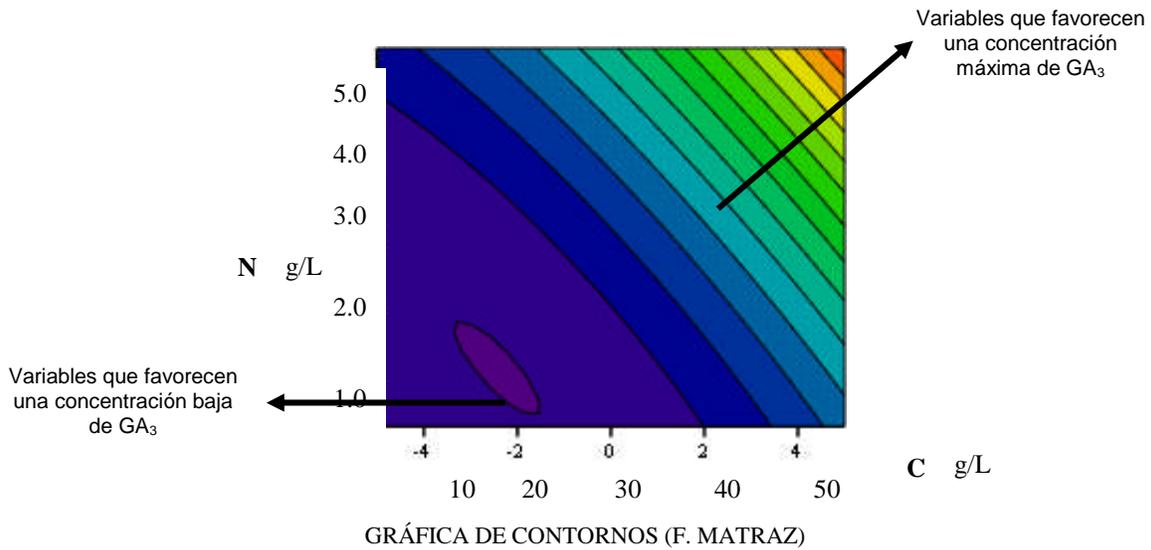


Figura 11. Superficie de respuesta (Fermentaciones en matraz)

La figura 11 presenta la gráfica de contornos. En ésta se puede visualizar de mejor manera el área donde se encuentran las condiciones favorables para la producción de ácido giberélico con las que se partió posteriormente para formular los medios de las fermentaciones en biorreactor.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de las 12 fermentaciones en matraz.

Tabla 8. Resultados de las 12 fermentaciones en matraz.

Matraz	pH↓	Amonio gL ⁻¹	Glucosa* gL ⁻¹	Biomasa** gL ⁻¹	Ácido giberélico gL ⁻¹	Productividad g/Lh
1	2.70 24 h	Agotado 24 h	2.502 48 h	11.7 72 h	0.009 48 h	1.919*10 ⁻⁴
2	2.72 24 h	Agotado 24 h	2.206 48 h	13.93 24 h	0.015 288 h	5.535*10 ⁻⁵
3	2.76 36 h	Agotado 36 h	3.306 93 h	26.19 36 h	0.024 144 h	1.722*10 ⁻⁴
4	2.79 24 h	Agotado 24 h	2.96 192 h	19.29 24 h	0.021 72 h	2.937*10 ⁻⁴
5	2.58 24 h	Agotado 24 h	5.0 72 h	27.9 24 h	0.014 96 h	1.478*10 ⁻⁴
6	2.80 37 h	Agotado 36 h	2.2 192 h	19.02 37 h	0.015 96 h	1.539*10 ⁻⁴
7	2.70 96 h	Agotado 46 h	0.15 58 h	11.89 102 h	0.011 192 h	5.954*10 ⁻⁵
8	2.78 24 h	Agotado 24 h	2.37 96 h	19.71 24 h	0.026 336 h	7.032*10 ⁻⁵
9	2.75 24 h	Agotado 24 h	2.602 24 h	16.22 24 h	0.025 96 h	2.606*10 ⁻⁴
10	2.57 24 h	Agotado 24 h	2.56 24 h	19.49 24 h	0.006 288 h	2.204*10 ⁻⁵
11	2.52 24 h	Agotado 24 h	2.91 24 h	14.42 24 h	0.006 192 h	3.279*10 ⁻⁵
12	2.78 24 h	Agotado 24 h	2.56 24 h	21.05 24 h	0.015 72 h	2.200*10 ⁻⁴

(8)

Matraz donde se obtuvo la mayor producción de ácido giberélico.

↓ Descenso de pH

*Agotamiento de glucosa

**Crecimiento máximo de biomasa.

Durante la fase de crecimiento o de balance, la cual se llevó a cabo en el período de las 24 h, el pH pudo ser afectado, obteniéndose valores de 3.0-2.8, al mismo tiempo que la biomasa comienza a producirse y alcanzar su punto máximo de crecimiento. Como se observa en la tabla 8, en las 12 fermentaciones en matraz se presenta dicho comportamiento.

El ácido giberélico es un producto del metabolismo secundario de los hongos y su producción resulta inhibida por la presencia de una fuente de nitrógeno; sin embargo, ésta es necesaria para el crecimiento de la biomasa. Por otra parte se puede observar en las 12 cinéticas en matraz que en el lapso de las 24 h el amonio es totalmente consumido, esto sucede cuando la biomasa toma la fuente de nitrógeno para crecer y alcanzar su punto máximo de crecimiento.

Trabajos realizados anteriormente mencionan que en la fase de almacenamiento o ausencia de nitrógeno, el crecimiento exponencial cesa cuando la fuente de nitrógeno se agota en el medio (6). El catabolismo del resto de la glucosa y fuerte producción de GA₃ se inicia con el agotamiento de nitrógeno. La fase de almacenamiento puede continuar hasta que la glucosa externa se agote, en tanto que las reservas internas de grasa son ocupadas. Si la glucosa se agota después del nitrógeno la producción de giberelinas puede continuar este período (1).

Algunos de los resultados importantes sobre la producción de GA₃ se obtuvieron utilizando agua de cocimiento de maíz (5), la cual fue empleada en estos experimentos a diferentes concentraciones.

Como se puede observar en la tabla 8, la fuente de carbono (Glucosa) es totalmente agotada a intervalos diferentes en cada cinética, ya que existe una concentración inicial diferente para cada una. El período de agotamiento de la glucosa se llama fase de mantenimiento, contenido nulo de glucosa o lenta acumulación de GA₃ en diferentes intervalos de tiempo, lo cual depende de la cantidad de reserva de grasa disponible, y se agota hasta el nivel presente de micelio (1). Se observa a detalle en las gráficas de las fermentaciones en matraz (ver Anexo 1), que la glucosa empieza a ser consumida al mismo tiempo que la biomasa se empieza a reproducir, lo cual significa que ésta es indispensable para el crecimiento de la biomasa.

En las últimas cinéticas en matraz (9 – 12) la misma concentración inicial de fuente de carbono y se observó un consumo total de glucosa en el período de las 144 h aproximadamente.

La tasa de crecimiento se ve limitada cuando la fuente de nitrógeno es agotada en el medio, esto sucede en el período de las 24 h; sin embargo la producción de GA₃ comienza después del agotamiento de la fuente de nitrógeno y su producción continua en la presencia de suficiente substrato (fuente de carbón) disponible. De ahí la importancia en este trabajo de la relación de C/N en la producción de GA₃.

En el medio debe existir una cantidad considerable de sustrato para poder continuar la producción de GA₃. En los experimentos en matraz 1, 2, 5, 6, 7, 10, 11, 12, la cantidad de glucosa se agotó antes de que comenzará a haber producción de GA₃. Las concentraciones que se obtuvieron fueron alrededor de 0.006-0.01gL⁻¹ de ácido giberélico; sólo se consideró la fermentación en matraz 8, en la cual se obtuvo mayor producción de GA₃.

Ahora bien, en los experimentos 3, 4, 8, 9, la glucosa se agotó completamente en el momento que se alcanzó la concentración máxima de GA₃, por lo que podemos suponer que la fuente de carbono fue suficiente para obtener una producción de 0.021 – 0.026 gL⁻¹. A pesar de que en estos cuatro puntos se obtuvo la mayor producción de GA₃ sólo se consideró el punto que proporcionó las condiciones óptimas para obtener un rendimiento alto de GA₃. A partir de los resultados obtenidos se formularon los siguientes medios de producción de GA₃ para las fermentaciones en biorreactor.

En la figura 12 se muestra la cinética de crecimiento y producción de ácido giberélico del matraz 8, en la cual se obtuvo la mayor producción de GA₃.

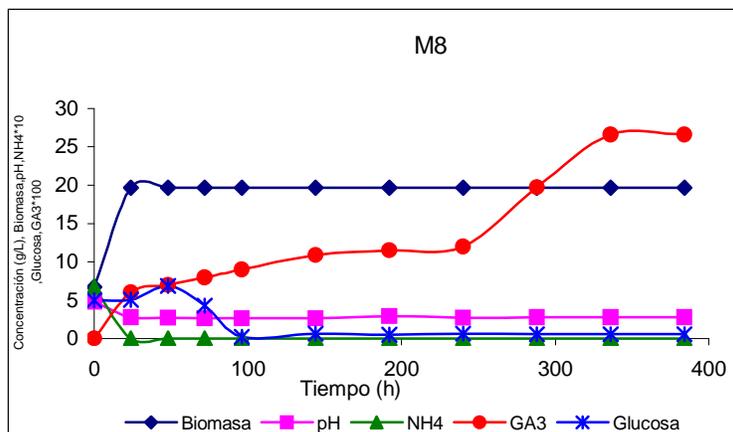


Figura 12. Cinética de la producción de ácido giberélico (Fermentación 8 en matraz).

Como se puede observar, en el período de las 24 h el pH descendió, manteniéndose constante en el resto de la fermentación. En el mismo período se observó el crecimiento máximo de biomasa (19.71 gL^{-1}), mientras que la fuente de nitrógeno fue totalmente consumida por ésta para poder crecer, y se obtuvo la mayor producción de 0.026 gL^{-1} de GA_3 durante la fase estacionaria.

A partir de los resultados obtenidos con el modelo de superficie de respuesta de las fermentaciones en matraz, se llevaron a cabo 9 fermentaciones en biorreactor de 2 L. Tomando como punto de partida la fermentación en matraz donde se obtuvo la máxima producción de GA_3 .

Como se muestra en la tabla 8, en la fermentación 8 en matraz se obtuvo la mayor producción de GA_3 .

Por consiguiente, en la figura 10 a. se muestra el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de GA₃ en cultivos en matraz donde los resultados obtenidos sugieren que para obtener una alta producción de ácido giberélico (0.415 gL⁻¹ de GA₃) es necesario utilizar concentraciones altas de nitrógeno y glucosa. Sin embargo, es posible usar una concentración menor de fuente de nitrógeno (de 1.44 gL⁻¹ a 3.0 gL⁻¹) y obtener una concentración de aproximadamente 0.359 gL⁻¹ de ácido giberélico sin la necesidad de utilizar una cantidad alta de glucosa. Así, con 50 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de la relación nitrógeno se obtiene la mayor producción de ácido giberélico de 0.415 gL⁻¹, (ver zona roja de la gráfica). No se recomienda utilizar concentraciones por debajo de 20 gL⁻¹ de fuente de carbono y 1.0 gL⁻¹ de la fuente de nitrógeno.

Por otra parte en la figura 11 se muestra el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de GA₃ en cultivos en matraz, en la cual se puede observar que el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de GA₃ es aproximadamente un 30% mayor que el efecto de la fuente de carbono. Dicho resultado se obtuvo con la matriz resultante del análisis de varianza donde el total de datos representa el 100% (841 datos) y sólo en el 30% se observa la mayor concentración de ácido giberélico.

En la gráfica 8b. se aprecia también que el efecto más notable de la fuente de nitrógeno sobre la producción de ácido giberélico se encuentra en el intervalo de variables codificadas de -0.1 a 1.4, es decir, entre 2.41 gL⁻¹ y 5 gL⁻¹ de la fuente de nitrógeno. Por otra parte, el efecto más favorable de la fuente de carbono sobre la producción de GA₃ se puede ubicar en el intervalo de variables codificadas de 0.3 a 1.4, es decir, entre 31 gL⁻¹ y 50 gL⁻¹ de glucosa.

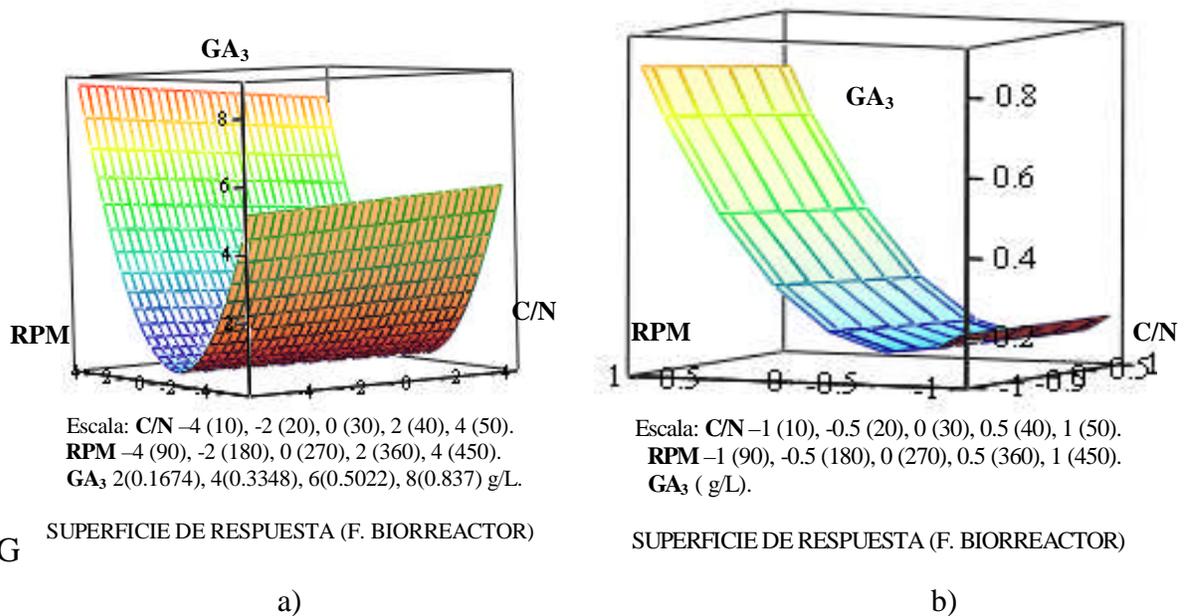
7.3 Fermentaciones en biorreactor.

En la fermentación 3 en biorreactor fue donde se obtuvo la mayor producción de GA₃. Con el modelo de superficie de respuesta podemos ir cerrando los intervalos de tal manera que podamos obtener aquellas condiciones óptimas que favorezcan la producción de GA₃.

$$\check{Y}=0.234-0.017x_1+0.0308x_2+3.175*10^{-4}x_1^2+0.267x_2^2-0.012x_1x_2$$

Modelo se superficie de respuesta para las fermentaciones en biorreactor.

Con los resultados obtenidos del modelo de superficie de respuesta de las fermentaciones en matraz, seleccionamos las condiciones óptimas de la fermentación 8 en matraz y partimos de ésta para llevar a cabo las fermentaciones en biorreactor y el desarrollo del modelo de superficie de respuesta, como se muestra en la figura 13.



SUPERFICIE DE RESPUESTA (F. BIORREACTOR)

SUPERFICIE DE RESPUESTA (F. BIORREACTOR)

Figura 13. Superficie de respuesta para las fermentaciones en biorreactor. a) superficie de respuesta fermentación en biorreactor, variables codificadas, b) superficie de respuesta en variables reales en z.

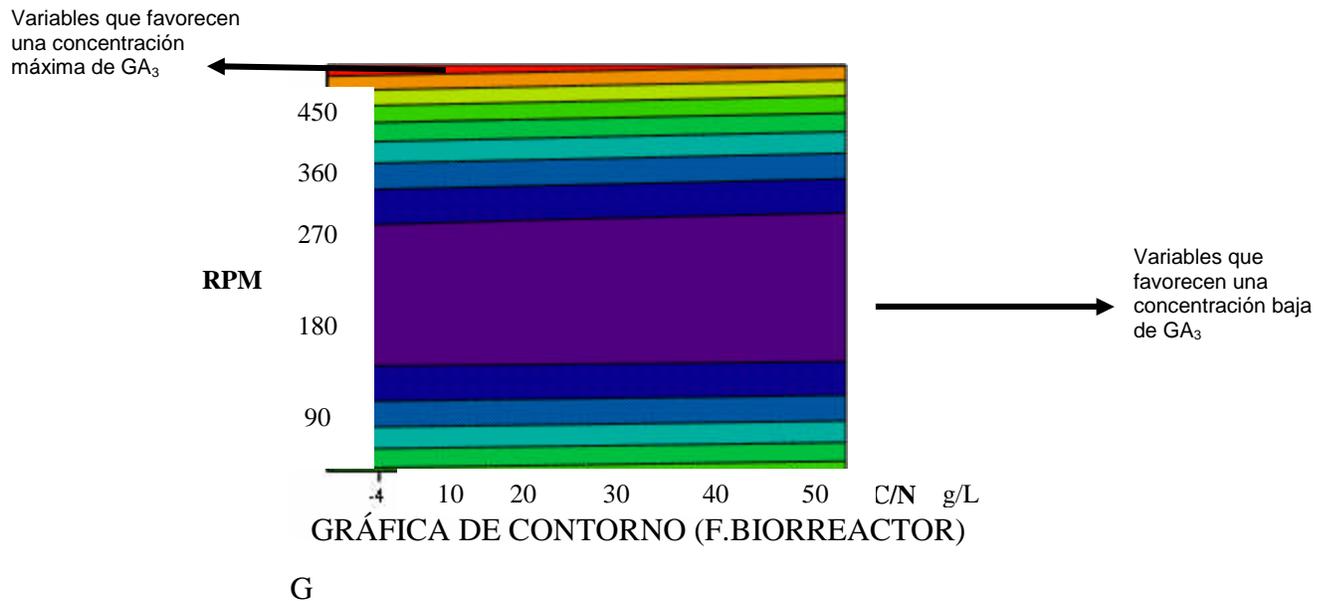


Figura 14. Superficie de respuesta para las fermentaciones en biorreactor

Para las 9 fermentaciones en matraz se obtuvo un solo punto (Fermentación 3 en biorreactor) en el que se obtuvo una producción de 0.62 gL^{-1} de GA₃, trabajando bajo las condiciones iniciales de 96 gL^{-1} de glucosa y 1.56 gL^{-1} de fuente de nitrógeno, a 300 rpm.

La figura 14 representa la gráfica de contornos. En ésta se puede visualizar de mejor manera el área donde se encuentran las condiciones óptimas antes mencionadas.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de las 9 fermentaciones en biorreactor.

Tabla 9. Resultados de las 9 fermentaciones en biorreactor.

Matraz	pH↓	Amonio gL ⁻¹	Glucosa* gL ⁻¹	Biomasa** gL ⁻¹	Ácido giberélico gL ⁻¹	Productividad g/Lh
1	1.88 24 h	Agotado 48 h	6.03 72 h	9.74 48 h	0.254 24 h	1.060*10 ⁻²
2	4.6 24 h	Agotado 24 h	48.7 24 h	20.46 24 h	0.005 24 h	2.407*10 ⁻⁴
3	4.31 24 h	Agotado 48 h	11.09 48 h	16.41 96 h	0.624 192 h	3.252*10 ⁻³
4	2.19 24 h	Agotado 24 h	47.31 48 h	12.94 24 h	0.020 24 h	8.357*10 ⁻³
5	2.16 24 h	Agotado 48 h	3.48 48 h	21.27 24 h	0.126 24 h	5.287*10 ⁻³
6	2.54 24 h	Agotado 24 h	44.16 72 h	24.99 144 h	0.122 192 h	6.364*10 ⁻⁴
7	2.05 24 h	Agotado 24 h	12.99 24 h	22.05 24 h	0.093 96 h	9.736*10 ⁻⁴
8	2.79 24 h	Agotado 48 h	18.15 72 h	16.99 24 h	0.155 24 h	9.736*10 ⁻⁴
9	2.46 24 h	Agotado 48 h	26.36 48 h	29.18 24 h	0.088 144 h	6.133*10 ⁻⁴

(2)

Matraz donde no se obtuvo producción de ácido giberélico.

(3)

Matraz donde se obtuvo la mayor producción de ácido giberélico.

↓ Descenso de pH

*Agotamiento de glucosa

**Crecimiento máximo de biomasa.

El aumento de pH es probable que suceda porque se encuentra en la fase terminal, lisis y aumento de pH, que se caracteriza por la ruptura de la hifas, el decremento del peso seco y la liberación de componentes miceliares, fosfato y amonía hacia el medio (1). Sin embargo, Borrow mostró que la producción de giberelinas se encuentra en el rango de pH 3.5 - 6.5 (5), ésto sucede (como se puede observar en las gráficas del Anexo 2 en todas las fermentaciones en biorreactor y en especial en la fermentación 3 en biorreactor, donde alcanza un pH de 6.5, produciéndose 0.62 gL^{-1} de ácido giberélico, punto donde se alcanzó mayor producción de GA_3 de las 9 fermentaciones. En la tabla 9 se observan dichos resultados.

La fuente de nitrógeno es consumida en el período de las 48 h por la biomasa para lograr su máximo crecimiento; sin embargo, en algunas fermentaciones el nitrógeno fue agotado antes de que la biomasa alcanzara su máximo crecimiento, mientras que la glucosa fue consumida en un periodo posterior al mismo tiempo que se observó la máxima producción de GA_3 . En los experimentos 3, 6, 7, se obtuvo la máxima producción de GA_3 ; sin embargo, de estos tres puntos sólo la fermentación 3 en biorreactor alcanzó una mayor producción respecto a las dos restantes.

Se puede observar que en los experimentos 1, 2, 4, 5, 8 se obtiene una producción máxima de GA_3 en el período de las 24 h; para este período la fuente de nitrógeno fue casi consumida.

En las fermentaciones en biorreactor se adicionó una solución de nutrientes, la cual contenía 200 mgL^{-1} $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mgL^{-1} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mgL^{-1} $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20 mgL^{-1} $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mgL^{-1} $\text{CaC}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mgL^{-1} $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Algunas trazas como el Fe, Cu, Mn, Mo, Zn, B, Al y Ca son requeridas en la fermentación para la producción de GAs, además de aumentar los rendimientos en la producción de ácido giberélico. Si realizamos una comparación de las fermentaciones en matraz respecto a las fermentaciones en biorreactor, podemos notar que al adicionarle la solución de nutrientes, en algunas fermentaciones se obtuvo la mayor producción de GA_3 . Se puede comparar la fermentación 8 en matraz y la fermentación 3 en biorreactor, por lo que pudo verse ésta favorecida por la solución de nutrientes; sin embargo, también pudo verse afectada por la agitación, ya que ésta no fue constante para todas las fermentaciones en biorreactor.

En la fermentación 3 en biorreactor se trabajó con una agitación 300 rpm, se emplearon agitaciones de 150 rpm a 450 rpm. Se pudo observar que en la fermentación en biorreactor se vió favorecida la producción de GA_3 a 300 rpm comparada con el resto.

En la figura 15 se puede observar el comportamiento de la cinética de la fermentación 3 en biorreactor.

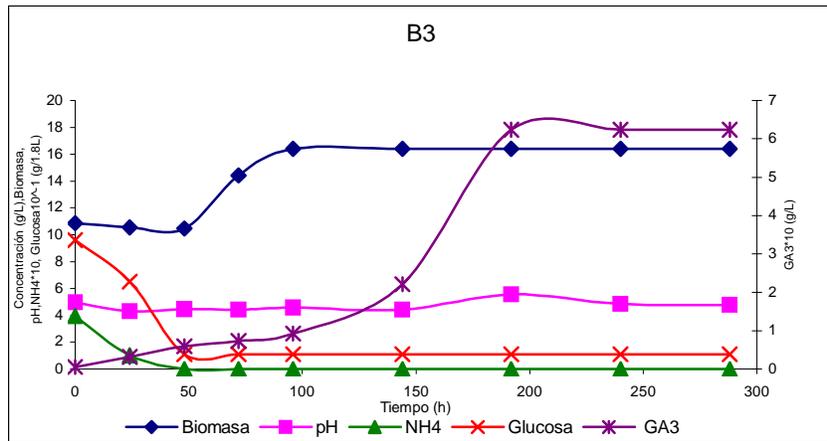


Figura 15. Cinética de la producción de ácido giberélico (Fermentación 3 en biorreactor).

Como se puede observar, en el período de las 24 h se obtuvo un descenso de pH, manteniéndose constante hasta el final de la fermentación. El crecimiento máximo de biomasa fue de 16.41 gL^{-1} , y se observó en el período de las 96 h. Por otro lado, la fuente de nitrógeno fue totalmente consumida por ésta para producirse y la glucosa fue totalmente agotada en el mismo período en el que se obtuvo la mayor producción de 0.624 gL^{-1} de GA_3 .

Por consiguiente en la figura 14. se muestra el efecto de la relación C/N y la agitación sobre la producción de GA_3 en cultivos en biorreactor. En dicha gráfica se puede observar que el efecto de la relación C/N sobre la producción de GA_3 no afecta la producción de ácido giberélico. Sin embargo, el efecto de la agitación sobre la producción de ácido giberélico sí afecta directamente la producción de ácido giberélico en el intervalo de las variables codificadas de 0.7 a 1.0.

Por otra parte el efecto más favorable de la relación C/N se puede observar en el intervalo de variables codificadas de -1 a 1 (10-50) sin importar en que intervalo se utilice ya que ésta no afecta significativamente la producción de ácido giberélico.

Los resultados sugieren entonces que es necesario situarse en un intervalo bajo de la relación C/N y con una alta agitación, es decir, que con una relación C/N de 10 y con agitación de 450 rpm se puede obtener 0.837 gL^{-1} de ácido giberélico, lo anterior se puede observar en la zona roja de la gráfica de superficie de respuesta (Figura 14).

7.4 Productividad de las fermentaciones en matraz y biorreactor.

Como se mencionó anteriormente en las fermentaciones en matraz, en el experimento 8 se obtuvo la mayor concentración siendo ésta de 0.026 g/L de GA₃; sin embargo, la productividad de este experimento fue de 0.00068 g/Lh, mientras que en el experimento 4 se obtuvo una productividad de 0.0029 g/Lh y una concentración de 0.00029 g/L de GA₃.

Para las fermentaciones en biorreactor en el experimento 3 se alcanzó la mayor concentración de GA₃; sin embargo, la productividad fue de 0.0032 g/Lh, mientras que en el experimento 1 se obtuvo una productividad mas alta siendo ésta de 0.0106 g/Lh y la concentración de GA₃ fue de 0.254g/L.

La productividad para los experimentos 8 y 3 en matraz y biorreactor, fueron bajas a pesar que en éstos se obtuvo la mayor concentración de GA₃ debido a que el tiempo en el que se alcanzó la máxima producción de ácido giberélico fue de 336h para las fermentación en matraz y 192 h para la de biorreactor, mientras que en donde se obtuvieron productividades altas, la máxima concentración de GA₃ se alcanzó en 72 h en matraz y 24 h en biorreactor.

Resulta necesario precisar que independientemente de que se calcularon las productividades en las fermentaciones realizadas, el tiempo no fue una variable de estudio en este trabajo, por lo que no se tomó en cuenta la productividad para el desarrollo de la superficie y formulación de los medios en biorreactor.

8 CONCLUSIONES.

Se seleccionaron las condiciones óptimas de 30°C, 120 rpm, 50 gL⁻¹ de fuente de carbono y 4.22 gL⁻¹ de fuente de nitrógeno, para obtener una producción de ácido giberélico de 0.026 gL⁻¹ en matraz para la cepa de *G. fujikuroi* NRRL 2278.

Los resultados obtenidos relacionados con el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la producción de GA₃ en cultivos en matraz sugieren que para obtener una producción de ácido giberélico de 0.415 gL⁻¹ es necesario utilizar concentraciones altas de nitrógeno y glucosa, es decir, que con 50 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de la fuente de nitrógeno se obtiene la mayor producción de ácido giberélico. Se recomienda no utilizar concentraciones por debajo de 20 gL⁻¹ de fuente de carbono y 1.0 gL⁻¹ de la fuente de nitrógeno.

Se optimizó la producción de ácido giberélico con *G. fujikuroi* NRRL-2278 en biorreactor donde se obtuvo una producción de 0.624 gL⁻¹ de GA₃, a 30 °C, 300 rpm, aireación constante de 1.5 vvm, con una concentración inicial de glucosa de 96 gL⁻¹ y fuente de nitrógeno de 1.56 gL⁻¹.

Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos en la superficie de repuesta, se sugiere que es necesario situarse en un intervalo bajo de la relación C/N y con una alta agitación, es decir, que con una relación C/N de 10 y con agitación de 450 rpm se puede obtener 0.837 gL⁻¹ de ácido giberélico.

A pesar de que la producción de ácido giberélico fue pequeña, de acuerdo con los resultados reportados por Álvarez y Molina, se obtuvo una producción de 0.2 gL⁻¹ mayor a la reportada utilizando células libres en biorreactor.

Con los resultados obtenidos del modelo de superficie de respuesta de las fermentaciones en matraz, se obtuvieron las condiciones óptimas de la fermentación 8 en matraz y se tomaron como base para llevar a cabo las fermentaciones en biorreactor y el desarrollo del modelo de superficie de respuesta.

La productividad de las fermentaciones en matraz (experimento 4) y en biorreactor (experimento 1) fueron de 0.0029 g/Lh y 0.0106 g/Lh de ácido giberélico respectivamente.

Se comprobaron los resultados con el análisis de varianza para las fermentaciones en matraz, en el cual el valor de la probabilidad de la zona de rechazo fue menor de 0.05, es decir, que se obtuvo el 95% de aceptación del modelo. Para las fermentaciones en biorreactor también se comprobaron los resultados con el análisis de varianza en el cual el valor de la probabilidad de la zona de rechazo fue mayor de 0.001, es decir, que se obtuvo el 99.99% de aceptación del modelo.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. **Álvarez Lucio, Maximino y Molina Jiménez, Héctor.**, “Producción de ácido giberélico con células inmovilizadas de *Gibberella fujikuroi*”, Informe de proyecto terminal III, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México DF, 2002.
2. **Andrés Corona a, Doris Sáez b, Eduardo Agosin***, “Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions” ,Elsevier,1-4, 2004.
3. **Barendse, G, Van de Werken and Takahashi, N.**, “High-performance liquid chromatography of gibberellins”, *Journal of Chromatography.*, 198, 449-455, 1980.
4. **Borrow, A , Brown, Sheila, Jefferys, E.G., Kessell, R.H.J., Lloyd, Eithne C., Lloyd, P.B., Rothwell, B. y J. C. Swait.**, “The Kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture”, *Canadian Journal of Microbiology*, 10,407-444, 1964.
5. **Borrow, A , Brown, Sheila, Jefferys, E.G., Kessell, R.H.J., Lloyd, Eithne C., Lloyd, P.B., Rothwell, B. y J. C. Swait.**, “The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture”, *Canadian Journal of Microbiology*, 10,445, 1964.
6. **Borrow, A. Rothwell, B. y J.C. Swait.**, “The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture”, *Canadian Journal of Microbiology.*, 7,227-275 1961.
7. **Brückner, Bettina and Blechschmidt, Dieter.**, “The Gibberellin fermentation”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(2),163-192, 1991.
8. **C. Gelmi, R. Pérez-Correa *, M. González, E. Agosin**, “Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support”, Elsevier,1-7,2001
9. **Claudio Gelmi, Ricardo Pérez-Correa *, Eduardo Agosin** ,”Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA3 production in solid-state fermentation” ,Elsevier, 1-8, 2001.

10. **Durán Páramo ,Enrique., Molina Jiménez, Héctor,** “Gibberelic Acid Production by free and immobilized Cells in Different Culture Systems”, Applied Biochemistry and Biotechnology, 113,381-388, 2004.
11. **Durán Parámo, Enrique., Muñoz Aguilar, José Manuel.,** “Manual de prácticas del Laboratorio de Biotecnología Alimentaria” ,2003.
12. **Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI),** “Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2005”, Periodo (ARB-DIC 2002), Edición 2003.
13. **Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI),** “Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2005”.
14. **Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI)** “Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2005”. Periodo (ENE-MAR 2002). Edición 2003.
15. **Jefferys, E.G.,** “The Gibberellin fermentation”, Advances Applied Microbiology, 13, 283-316,1971.
16. **Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K.,** “Microbial production of Gibberellins: State of the Art”, Advances in Applied Microbiology, 34,31-81, 1989.
17. **Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K.,** “Microbial production of Gibberellins: Economic considerations”, Advances in Applied Microbiology, 34,117-139, 1989.
18. **Licea De Anda, Ana Laura y Escamilla Silva Eleazar.,** “Proceso continuo para la producción de ácido giberélico mediante micelio inmovilizado de *Gibberella fujikuroi* en reactor de lecho fluidizado”, Memorias- Simposium Internacional de Biotecnología, 56,2000.
19. **Miha Humar, Franc Pohleven,** “Influence of a nitrogen supplement on the growth of wood decay fungi and decay of wood” ,Elsevier,1-6,2005.
20. **Raymond, H. and Douglas C. Montgomery.,** “Probabilidad y estadística aplicada a la Ingeniería”, Mc Graw Hill, 728-801,1996.

21. **Raymond, H. and Douglas C. Montgomery.**, “Response Surface Methology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments”, Jonh Wiley and Sons, inc., 1-685, 1995.
22. **Riley M. John.**, “Gibberellic Acid for Fruit set and Seed Germination”, Journal, 19, 10-12, 1987.
23. **Rodríguez Damián, Gabriela y Escamilla Silva Eleazar M.**, “Factores que afectan la producción de giberelinas mediante fermentación en cultivo sumergido con *Gibberella fujikuroi* empleando como fuente de carbono aceite de ajonjolí”, Memorias-Simposium Internacional de Biotecnología, 53, 2000.
24. **Ruchi Shukla, Subhash Chand, Ashok K. Srivastava.**, “Batch kinetics and modeling of gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi*”, Elsevier, 1-6, 2004.
25. **Ruchi Shukla, Subhash Chand, Ashok Kumar Srivastava***, “Improvement of gibberellic acid production using a model based fed-batch cultivation of *Gibberella fujikuroi*”, Elsevier, 1-6, 2004.
26. **S.P. Sinha**, “Curso Introductorio de: Diseño y Análisis de Superficie de Respuesta”, I.E.A.C., Faces, U.L.A. Mérida-Venezuela.
27. **Sanchez-Fernández*, Javier Avalos, Enrique Cerdaè-Olmedo**, “Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*”, 1-5, 1997.
28. **Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI)**, “Estadísticas de importación de reguladores de crecimiento 1992-1996”.

10 ANEXOS

10.1 FERMENTACIONES EN MATRAZ

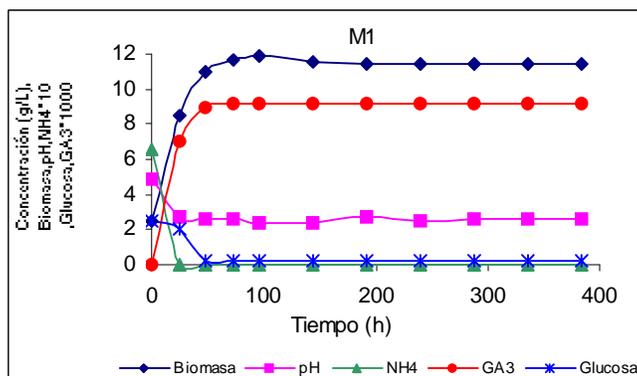


Figura 16. Producción de ácido giberélico (Fermentación 1 en matraz).

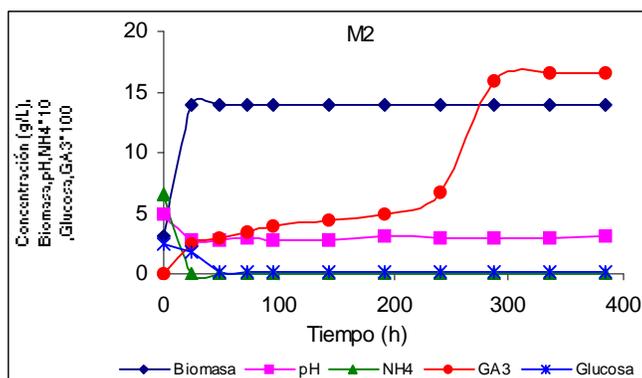


Figura 17. Producción de ácido giberélico (Fermentación 2 en matraz).

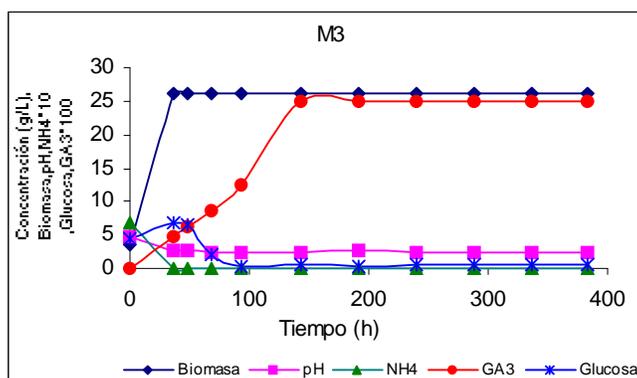


Figura 18. Producción de ácido giberélico (Fermentación 3 en matraz).

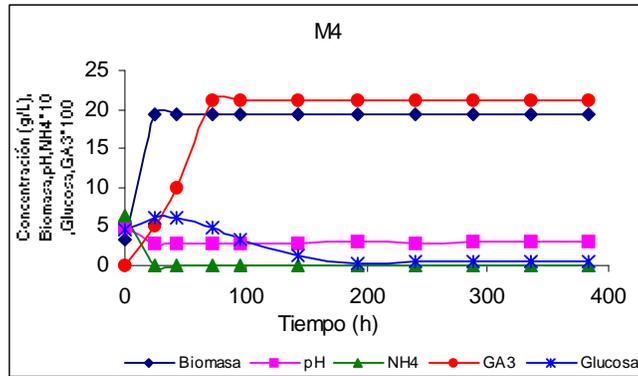


Figura 19. Producción de ácido giberélico (Fermentación 4 en matraz).

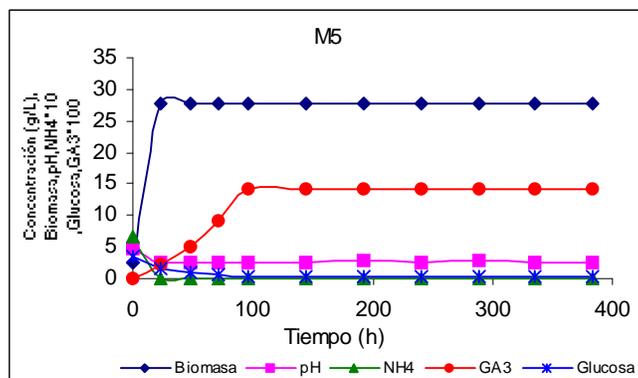


Figura 20. Producción de ácido giberélico (Fermentación 5 en matraz).

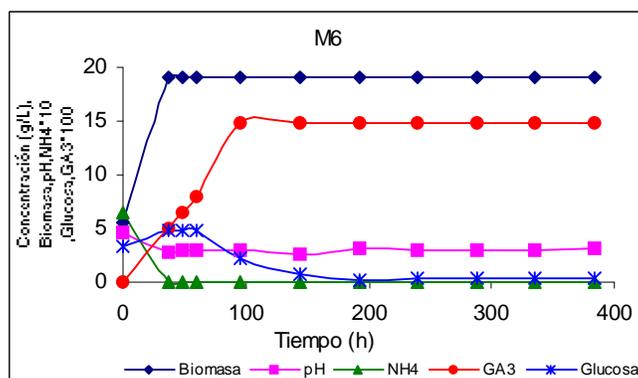


Figura 21. Producción de ácido giberélico (Fermentación 6 en matraz).

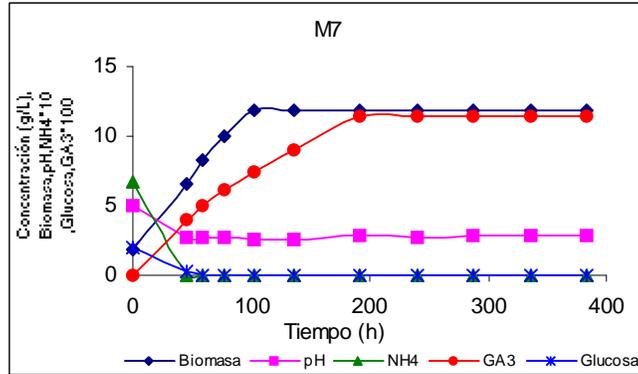


Figura 22. Producción de ácido giberélico (Fermentación 7 en matraz).

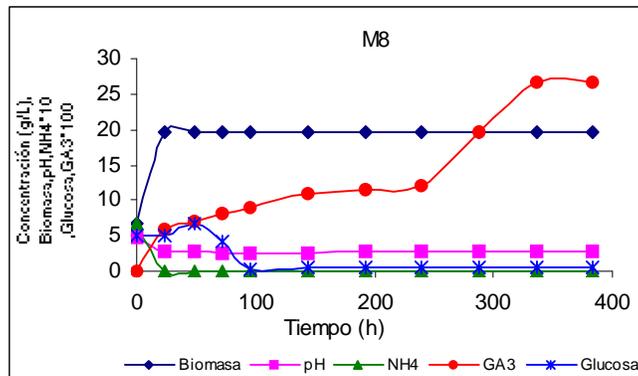


Figura 23. Producción de ácido giberélico (Fermentación 8 en matraz).

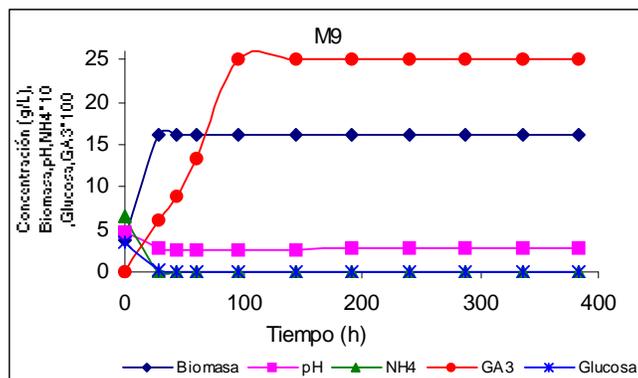


Figura 24. Producción de ácido giberélico (Fermentación 9 en matraz).

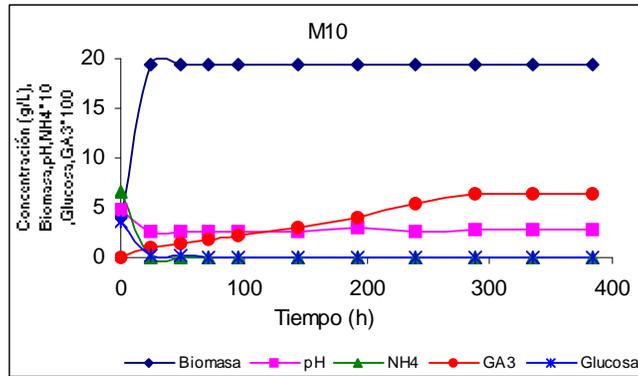


Figura 25. Producción de ácido giberélico (Fermentación 10 en matraz).

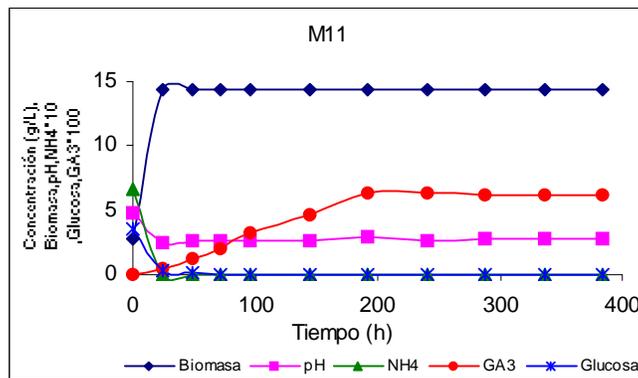


Figura 26. Producción de ácido giberélico (Fermentación 11 en matraz).

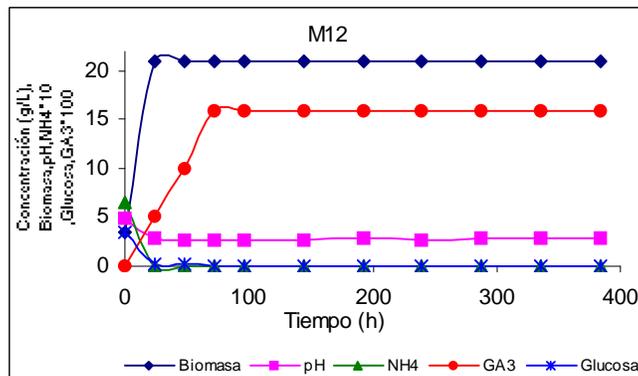


Figura 27. Producción de ácido giberélico (Fermentación 12 en matraz).

11 ANEXO 2

11.1 FERMENTACIONES EN BIORREACTOR

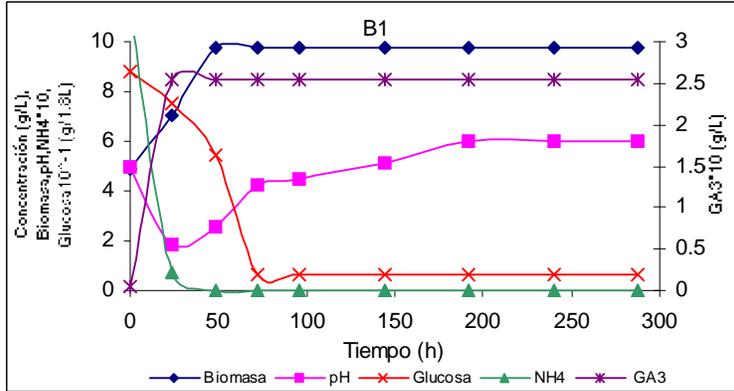


Figura 28. Producción de ácido giberélico (Fermentación 1 en biorreactor).

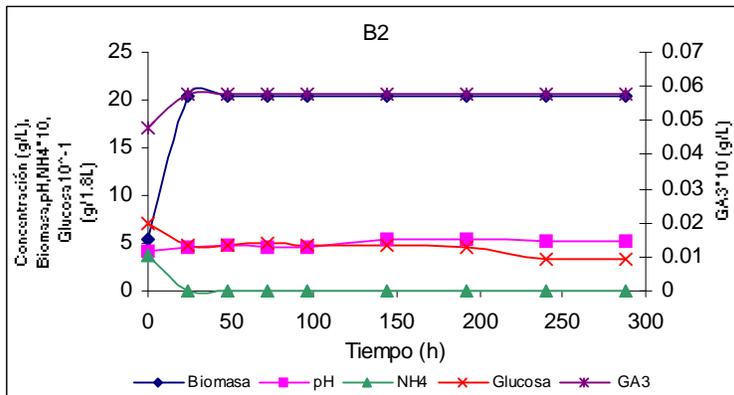


Figura 29. Producción de ácido giberélico (Fermentación 2 en biorreactor).

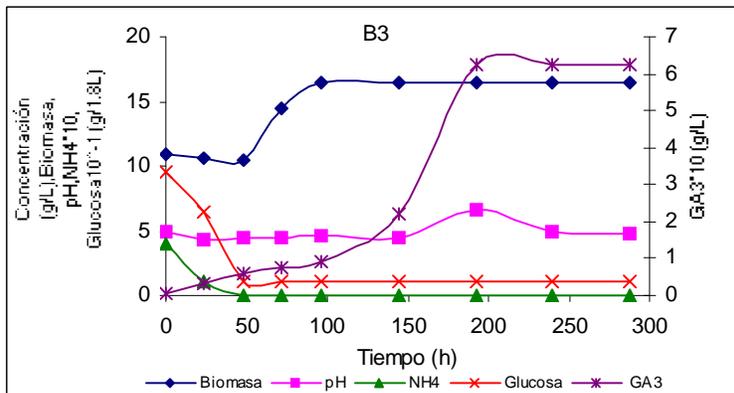


Figura 30. Producción de ácido giberélico (Fermentación 3 en biorreactor).

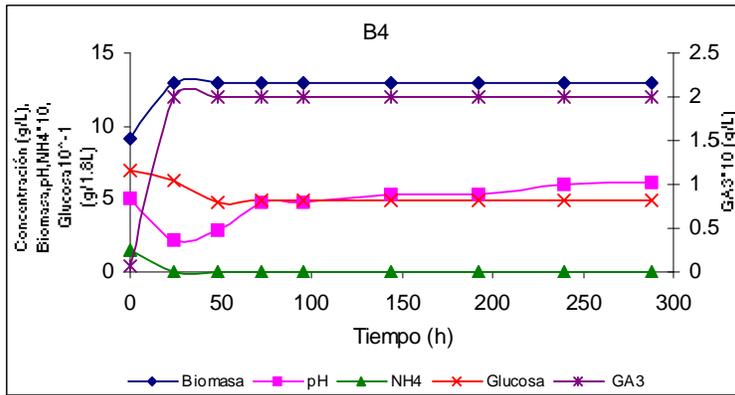


Figura 31. Producción de ácido giberélico (Fermentación 4 en biorreactor).

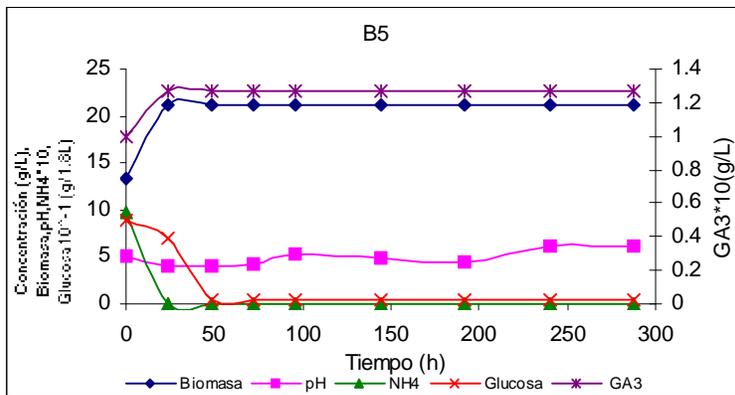


Figura 32. Producción de ácido giberélico (Fermentación 5 en biorreactor).

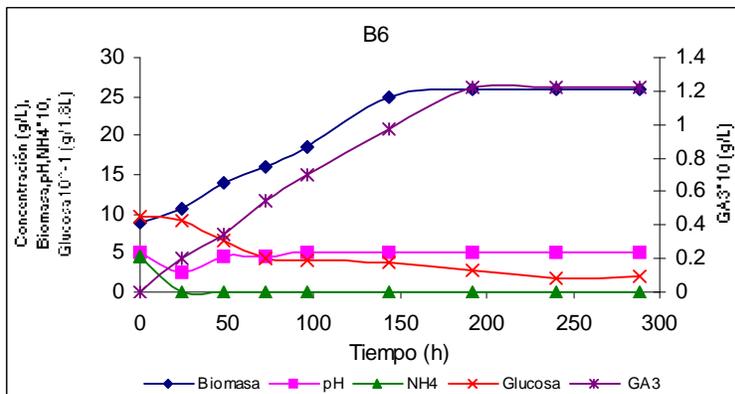


Figura 33. Producción de ácido giberélico (Fermentación 6 en biorreactor).

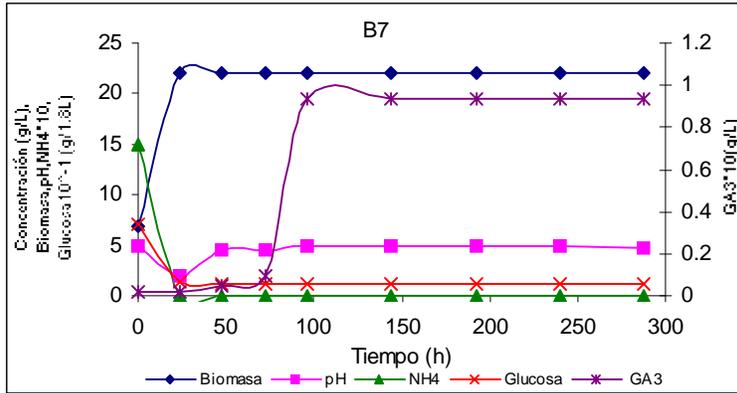


Figura 34. Producción de ácido giberélico (Fermentación 7 en biorreactor).

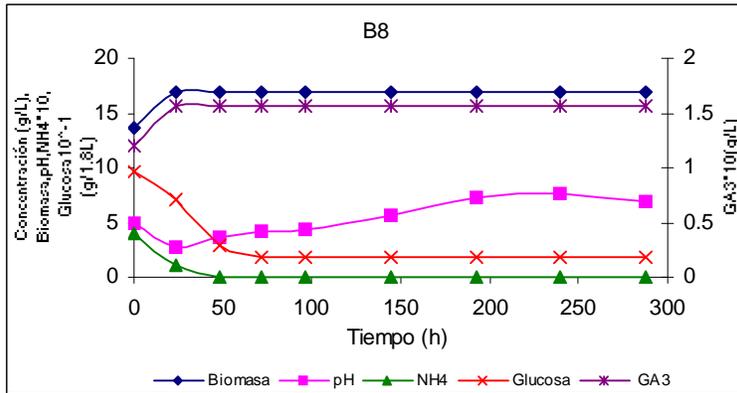


Figura 35. Producción de ácido giberélico (Fermentación 8 en biorreactor).

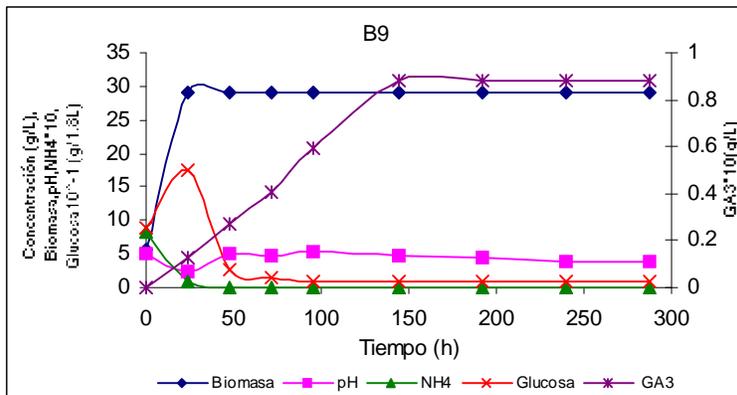


Figura 36. Producción de ácido giberélico (Fermentación 9 en biorreactor).