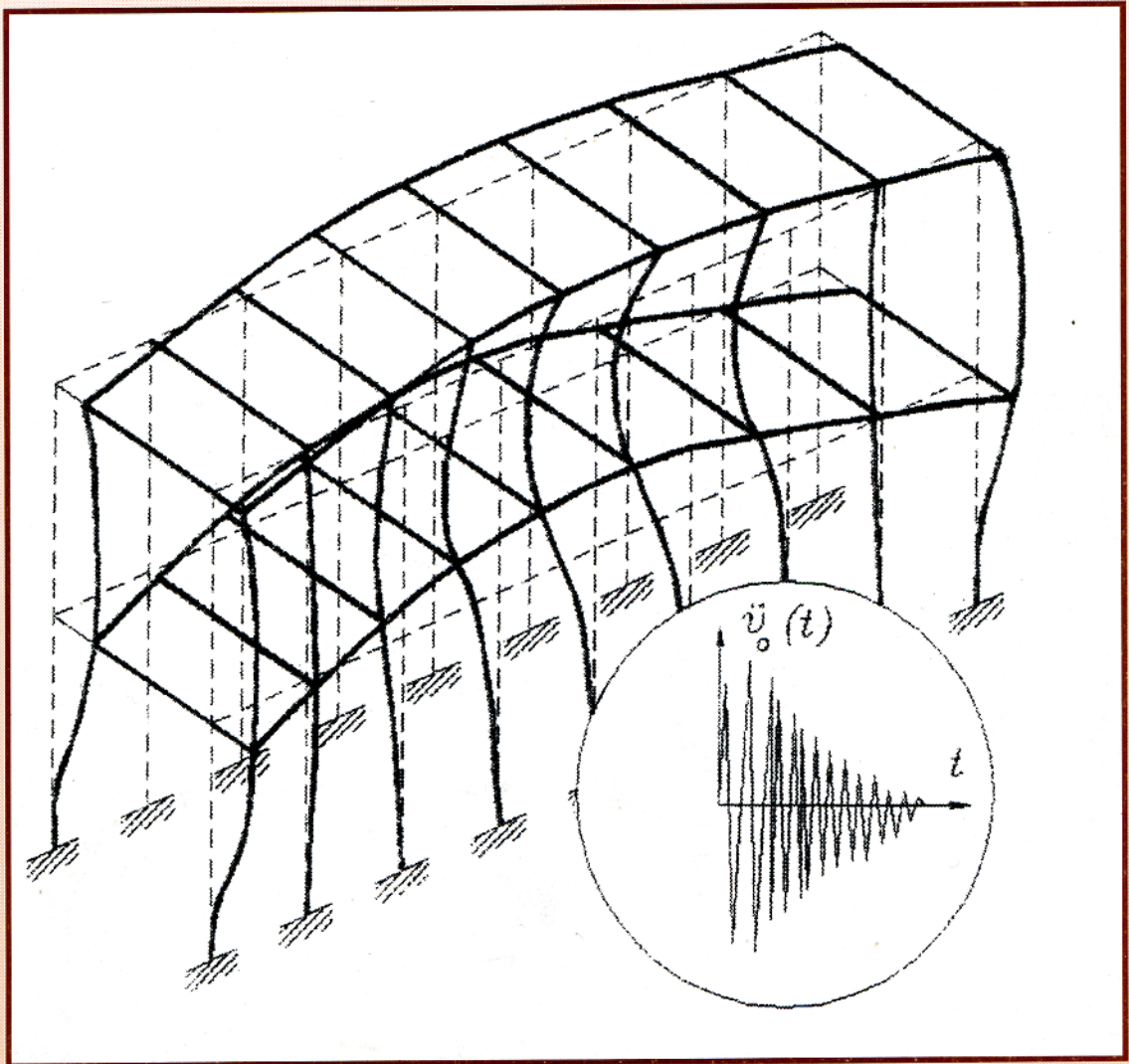


Ingeniería

Revista de la Universidad de Costa Rica
Julio/Diciembre 1997 VOLUMEN 7 Nº 2



INGENIERIA

Revista Semestral de la Universidad de Costa Rica
Volumen 7, Julio/Diciembre 1997 Número 2

DIRECTOR

Rodolfo Herrera J.

CONSEJO EDITORIAL

Víctor Hugo Chacón P.

Ismael Mazón G.

Domingo Riggioni C.

CORRESPONDENCIA Y SUSCRIPCIONES

Editorial de la Universidad de Costa Rica
Apartado Postal 75
2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica

CANJES

Universidad de Costa Rica
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información
Unidad de Selección y Aquisiciones-CANJE
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica

Suscripción anual:

Costa Rica: ₡ 1 000,00

Otros países: US \$ 25,00

Número suelto:

Costa Rica: ₡ 750,00

Otros países: \$ 15,00



ESTUDIO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO UTILIZANDO EL HONGO *GIBBERELLA FUJIKUROI*

Manuel E. Molina

Resumen

Se dio seguimiento cinético a fermentaciones para determinar el comportamiento en la producción del ácido Giberélico (P), biomasa (X), azúcares (S) y pH respecto al tiempo. Las fermentaciones se realizaron en procesos por lotes utilizando la *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 y a un pH inicial de 5. Las concentraciones máximas obtenidas fueron de 492 y 209 mg/L de ácido Giberélico al cabo de 144 h de fermentación, utilizando glucosa y melaza respectivamente y las velocidades específicas de crecimiento (μ) fueron de 0,034 y 0,032 h⁻¹ para los mismos sustratos.

Summary

A kinetic-fermentation follow up was made in order to determine the behavior of the production of gibberellic acid (P), dry biomass (X), sugars (S) and pH with respect to time. The fermentations were carried out in batch processes using the *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 and an initial pH-value of 5. The maximum concentrations obtained were 492 and 209 mg/L of gibberellic acid at the end of 144 hours of fermentation utilizing glucose and molasses respectively. The growth specific velocities (μ) were of 0.034 and 0.032 h⁻¹ for the same substrates.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grupos más importantes de sustancias reguladoras de crecimiento es el constituido por las *giberelinas*.

Las giberelinas pueden definirse como reguladores de crecimiento, son sustancias orgánicas sintetizadas en el interior de las plantas por la célula (o células) no diferenciada (meristemática) o poco diferenciada (parenquimática) y que en bajas concentraciones puede modificar cualitativa o cuantitativamente el crecimiento, ejerciendo esta acción normalmente en un lugar remoto al de su origen o incluso en el mismo sitio de síntesis [7].

Las giberelinas naturales se encuentran en tres formas químicas o estados, dos de los cuales están químicamente definidos y un tercero hipotético: giberelinas libres, giberelinas conjugadas y giberelinas enlazadas [10].

Existen en la actualidad más de 70 sustancias químicas clasificadas como giberelinas libres, las cuales han sido bien caracterizadas y sus estructuras pueden ser organizadas dentro de dos grupos principales: aquellas que poseen el complemento completo de átomos de carbono diterpenoides, con un total de 20 átomos de carbono y aquellas, en las que, el carbono angular 20, ha sido perdido y poseen un total de 19 átomos de carbono.

Algunas de las giberelinas con 19 átomos de carbono como la GA₁ son ácidos monocarboxilados e incluyen compuestos con actividad fisiológica.

Generalmente, el efecto de las giberelinas es más eficiente promoviendo la iniciación de la división celular que acelerando la división en células mitóticamente activas.

Las giberelinas permiten:

- (a) Promover la formación de plantas más altas que el promedio; al estimular el crecimiento de tallos, aunque en algunos casos, también promueven la formación de hojas más largas. Este fenómeno se debe principalmente al aumento en el número de divisiones celulares y tamaño de las células.
- (b) Intervenir en la floración al modificar el efecto de condiciones críticas de temperatura y luz solar, frecuentemente necesaria para la floración en diferentes especies de plantas. Intervienen además en las respuestas a la fotoperiodicidad.
- (c) Inducir la germinación de semillas al generar un aumento en los niveles de la enzima alfa-amilasa internos.
- (d) Romper el período de dormancia innata o adquirida que presentan algunas semillas, las cuales al ser tratadas con estas sustancias germinan en un tiempo mucho menor que el promedio.
- (e) Promover el fenómeno de dominancia apical, al generar zonas de inhibición del desarrollo de órganos vegetativos en las regiones próximas al ápice.

La producción del ácido giberélico en la actualidad se realiza mediante fermentación, utilizando cepas de microorganismos especializados.

Luego de la inoculación de un cultivo de microorganismos dentro de un medio nutritivo se presentan una serie de etapas durante el crecimiento. Inicialmente, hay un período durante el cual no se aprecia crecimiento alguno, este período es conocido como fase de ajuste o fase *lag*. Posteriormente se presenta un período durante el cual, la velocidad de crecimiento de las células se incrementa exponencialmente, a este período se le conoce

como fase exponencial y es cuando se producen los metabolitos primarios. Eventualmente el crecimiento cesa gradualmente y las células entran en la llamada fase estacionaria. Luego de un período adicional de tiempo el número de células empieza a declinar y el cultivo entra en la fase de muerte.

Durante la fase estacionaria algunos cultivos de microorganismos sintetizan compuestos que no son producidos en la fase exponencial, este tipo de compuestos son conocidos como metabolitos secundarios.

Aunque la gran mayoría de los microorganismos siguen las rutas del metabolito primario, cada metabolito secundario es producido únicamente por unas pocas especies de microorganismos. Un ejemplo de lo anterior, se tiene con el ácido giberélico, metabolito secundario producido por el hongo *Gibberella fujikuroi*.

Los cultivos por lotes son sistemas de cultivo cerrados los cuales tienen una cantidad inicial y limitada de nutrientes. El cultivo luego de inocularse pasa a través de las diferentes fases de crecimiento.

La fase de ajuste debe ser reducida lo más posible; lo anterior puede lograrse utilizando una cantidad adecuada de inóculo, por lo general un 10% del volumen útil del fermentador y que se encuentre en la fase exponencial.

La fase exponencial o logarítmica se caracteriza porque las células incrementan gradualmente su velocidad de reproducción. Esta fase puede ser descrita mediante la ecuación siguiente:

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

donde:

x_0 = Concentración inicial de biomasa, $t = 0$.

x_t = Concentración de biomasa, al tiempo t .

μ = velocidad específica de crecimiento, h^{-1}

Aplicando logaritmos a ambos lados de la ecuación (1), ésta se puede presentar como:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (2)$$

La ecuación anterior indica que una gráfica de concentración de biomasa contra tiempo origina una pendiente que constituye la velocidad específica de crecimiento máximo, μ_{\max} .

En cultivos por lotes la fase estacionaria es el punto donde la velocidad neta de crecimiento es cero.

La fase de muerte se presenta cuando el sustrato limitante es agotado. Esta puede describirse por la ecuación [1] salvo que origina una pendiente negativa.

La disminución de la velocidad de crecimiento, debido al agotamiento del sustrato presente en el medio, puede ser descrito por la relación de la velocidad específica de crecimiento (μ) y la cantidad residual del sustrato limitante. Esto se muestra, mediante la expresión desarrollada por Monod en 1942:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (3)$$

donde:

S = concentración residual de sustrato,

K_s = Constante de utilización de sustrato, numéricamente igual a la concentración de sustrato cuando μ es la mitad de μ_{\max} y es

una medida de la afinidad del organismo por ese sustrato.

La respuesta del microorganismo puede describirse mediante algunos parámetros, entre ellos están:

A - El rendimiento de crecimiento del microorganismo (y):

$$y = \frac{x_m - x_0}{S_0 - S_m} \quad (4)$$

donde:

S_0 = concentración de sustrato al tiempo t_0

S_m = concentración de sustrato al tiempo t_m

B - El coeficiente metabólico (q):

$$q = \mu / y \quad (5)$$

El ácido giberélico es solamente sintetizado hacia el final de la fase de almacenamiento, momento en que disminuye la proliferación micelial como resultado del agotamiento del nitrógeno y durante la fase de mantenimiento, o período de la idiofase, el cual se produce la síntesis de metabolitos secundarios.

La fermentación de ácido giberélico por fermentación sumergida, fue estudiada ampliamente a fines de la década de los 50 y principio de los 60. Existen diversas publicaciones en que se tratan aspectos tales como: metabolismo [3], cinética de crecimiento y producción [2], efecto de condiciones ambientales [1], regulaciones en la biosíntesis [4,5] y métodos de cultivos continuos [6].

Barrow y sus coautores [4], informaron, en

1955, de producciones del orden de 180 mg/L de ácido giberélico en una fermentación con *Fusarium moniliforme*, (Wollenweber) ACC 917.

El medio de cultivo contenía:

Glucosa	40.0 g/L
Tartrato de amonio	9.5 g/L
Fosfato monopotásico	2.0 g/L
Sulfato de potasio	0.6 g/L
Sulfato de magnesio	0.2 g/L

Los mismos autores [3,4] informaron que utilizando la misma cepa y empleando nitrato de amonio en un proceso en dos etapas, podían obtener 413 mg/L de ácido giberélico en 400 horas de fermentación. Se trataba de un proceso donde se tenía una primera etapa de crecimiento con nitrógeno como sustrato limitante, en concentraciones de 0.2-0.5% de NH_4NO_3 y glucosa, sacarosa o glicerina como fuente de carbono.

Kumar y Lonsane usando una cepa de *Gibberella fujikuroi* P-3 (National Collection of Industrial Microorganisms, Pune, India) y el medio líquido de Czapek Dox lograron una producción de ácido giberélico entre 650 y 1000 mg/L manteniendo una temperatura de 28 °C y agitación a 200 rpm.

Sánchez-Marroquín [12] estudió la actividad de 43 cepas de *Gibberella fujikuroi* provenientes del Instituto de Micología de Recife y del Instituto Oswaldo Cruz (Brasil), encontró que sólo dos de ellas producían el metabolito con buenos rendimientos. Este autor desarrolló un medio de cultivo con la siguiente composición:

Glucosa	20.0 g/L
Licor de maíz	25.0 g/L
Nitrato de amonio	2.6 g/L
Fosfato monopotásico	0.5 g/L
Sulfato de potasio	0.2 g/L

Con este medio y la cepa 10 C 3326 obtuvo rendimientos de 1196 mg/L. Los tiempos de fermentación fueron de 168 horas.

Holme y Zacharias [8] estudiaron la producción de ácido giberélico con el medio de cultivo descrito por Barrow [4] y lograron obtener 216 mg/L en 360 horas, utilizando frascos erlenmeyer y 564 mg/L en fermentadores continuos en un tiempo de 240 horas.

Como las giberelinas son un tipo de diterpeno, su proceso de formación está enmarcado dentro del proceso general de síntesis de terpenos y diterpenos, el cual se lleva a cabo en cuatro etapas [11]:

- a- La formación de la unidad de isopentano o su equivalente, a partir del acetato o de la leucina.
- b- La condensación de la unidad de isopentano con la formación de un terpeno o diterpeno acíclico.
- c- Ciclización de la estructura del precursor acíclico del terpeno o diterpeno.
- d- Rearreglos de la estructura cíclica de diterpeno, algunos de los cuales están acoplados con la tercera etapa o están ligados a la adición de sustituyentes en la estructura cíclica de terpeno.

2. MÉTODOS Y MATERIALES

2.1 Equipo.

Fermentadores: Se utilizaron fermentadores de 1L de capacidad, los que cuentan con todos los aditamentos necesarios para su control: temperatura, agitación, aereación, toma de muestras, etc. Baño con agitación oscilante: equipado con un controlador de temperatura, utilizado para el crecimiento y preparación del inóculo.

2.2 Microorganismo y cultivo.

En este trabajo se utilizó una cepa del hongo *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 y se utilizó un medio de cultivo con una composición tal

como se expresa en el cuadro 1. La fuente de carbono es un caso fue glucosa, luego se utilizó melaza a una concentración de azúcar equivalente.

CUADRO 1. MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO DURANTE EL DESARROLLO DEL PROCESO DE FERMENTACION.

REACTIVO	CANTIDAD AGREGADA (g / L de medio)
GLUCOSA	50.00
NH ₄ NO ₃	7.50
NH ₂ PO ₄	5.00
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0.01
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.01
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.01
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.01
CACO ₃	0.01

+ En la segunda fermentación se utilizó melaza a una concentración de azúcares equivalente a la concentración de glucosa.

Cultivo del microorganismo:

Los inóculos se prepararon en *erlenmeyer* de 125 mL, a partir de tubos inclinados con 6 días de crecimiento. Para la preparación de los inóculos siempre se utilizó el mismo medio de cultivo presentado en el cuadro 1. El hongo se dejó en agitación por 2.5 días a una temperatura de 30 °C.

-Para las corridas experimentales los fermentadores y el medio de cultivo se esterilizó a 121°C por 20 minutos.

-Una vez frío el medio se inocula bajo condiciones asépticas. El inóculo corresponde a un 10% del valor efectivo del fermentador.

-A través de cada corrida experimental se controló la temperatura a 28 °C y un flujo de aire de 0.8 L/min. Periódicamente se tomó muestras para los análisis correspondientes.

2.3 Análisis

Biomasa: Una muestra de 20 mL del caldo de fermentación fue tomada y filtrada utilizando papel Whatmann #1. El micelio separado es secado a 80 °C por 24 h. La biomasa es reportada en base seca.

Ácido Giberélico: su análisis está basado en la descomposición del ácido giberélico a ácido giberelénico en presencia de HCl (9%). Los dos enlaces conjugados del ácido giberelénico le confieren un máximo de absorbancia en el ámbito de ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

Para el análisis se tomó 8 mL del caldo previamente filtrado y se centrifuga a 4000 rpm. Se añade 0.5 mL de acetato de zinc (21.8% p/v) y se agita por 3 min, luego se agrega 0.5 mL de ferrocianuro de potasio (0.69% p/v) y se centrifuga por 15 min a 4000 rpm.

Se toman 2 mL de la muestra centrifugada y se transfiere a un balón aforado de 50 mL, se agregan 4 mL de alcohol absoluto y 44 mL de HCl (9%). Se utiliza como blanco 4 mL de alcohol absoluto, el que se completa a 50 mL.

con HCl (9%). Incubar a temperatura ambiente durante 75 min; luego se procede a leer la absorbancia.

Azúcares totales: La concentración de azúcares totales se obtuvo mediante análisis con HPLC, previamente calibrado con una solución de 0.48% de sacarosa, 0.28% de glucosa y 0.28% de fructosa. Se realizó una dilución de 1:10 de las muestras.

3. RESULTADOS

Las figuras 1 y 2 presentan el comportamiento de la producción del ácido giberélico (GA_3), biomasa expresada en base seca, consumo de carbohidratos y variación de pH respecto al tiempo. En éstas corridas experimentales, se registró datos por un período de 144 h. Las fuentes de carbono utilizadas fueron glucosa (5% p/v) y melaza a una concentración de azúcares equivalente.

En ambas figuras se encuentra que la biomasa (X) durante las primeras 96 h, muestra un crecimiento acelerado, comportamiento que corresponde a la fase exponencial. Esto es estimulado por la existencia de un medio rico en nutrientes. El crecimiento o reproducción del microorganismo, producción de metabolitos primarios y energía para el transporte activo conlleva el consumo de la fuente de carbono, la cual supe la energía.

El decrecimiento de la fuente de carbono es acelerado aproximadamente en el mismo período del crecimiento de la biomasa.

Aún cuando el ácido giberélico es un metabolito secundario, es decir que se produce durante la fase estacionaria, en las dos figuras se observa la existencia de este desde las primeras horas de fermentación. Esto se explica debido a que el inóculo (10%) utilizado ya se encontraba en la fase exponencial y muchos de los hongos a su vez habían alcanzado la fase estacionaria.

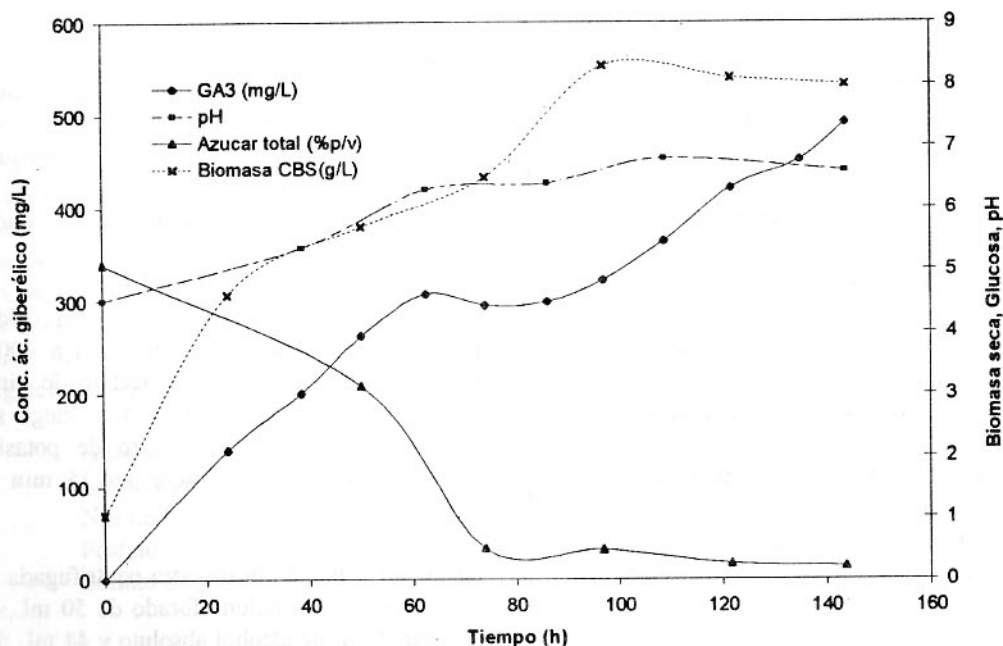


FIG. 1. CONCENTRACIÓN DE GA_3 , GLUCOSA, BIOMASA Y pH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DURANTE UNA CORRIDA CON GLUCOSA COMO SUSTRATO

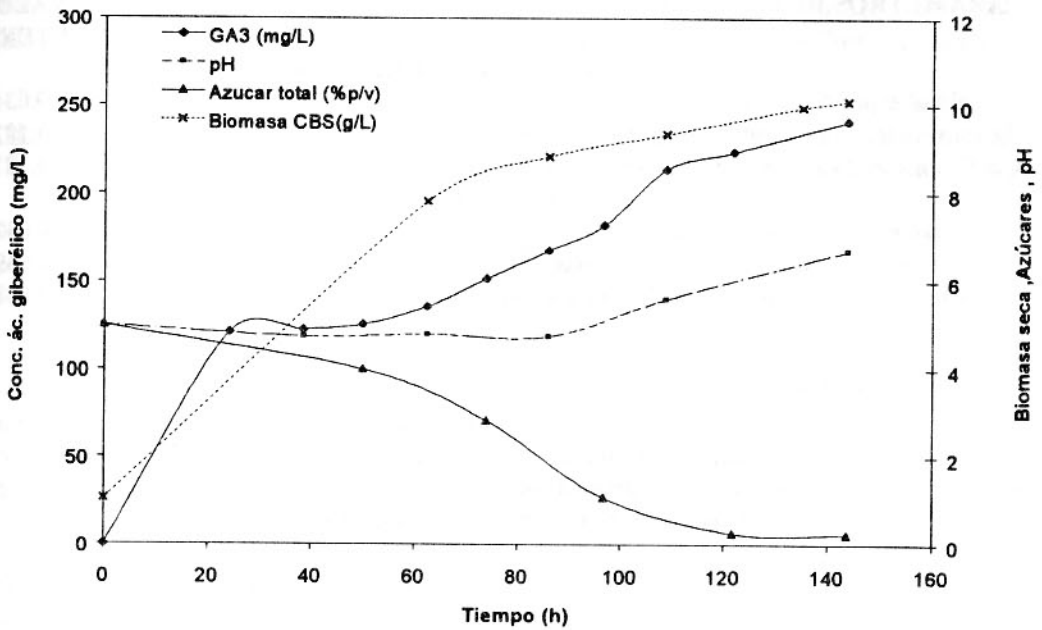


FIG. 2. CONCENTRACIÓN DE GA3, GLUCOSA, BIOMASA Y pH EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DURANTE UNA CORRIDA CON MELAZA COMO SUSTRATO.

Después de 96 h de fermentación la biomasa tiende a su condición estacionaria y en esta etapa se presenta un crecimiento acelerado en la producción del ácido giberélico, especialmente cuando el medio de cultivo

Las máximas producciones de ácido giberélico fueron de 492 y 209 mg/L para las corridas con glucosa y melaza, respectivamente. La literatura reporta valores de 180 - 900 mg/L

En el cuadro 2, se presentan los parámetros cinéticos y bioquímicos. El rendimiento (γ), fue sustancialmente mayor cuando se utilizó

tiene glucosa. El pH no mostró variaciones sustantivas; siempre estuvo dentro del ámbito óptimo de la *Gibberella fujikuroi*, a pesar que el pH se dejó libre.

en procesos por lotes. Las concentraciones máximas obtenidas son bastantes buenas, si se tiene presente que no se trabajó con las condiciones óptimas [9].

melaza, esto significa que el hongo siguió preferentemente la ruta de su metabolismo primario, hecho que concuerda con una menor producción de ácido giberélico.

CUADRO 2. PARAMETROS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *GIBBERELLA FUJIKUROI*.

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	VALOR OBTENIDO
CORRIDA CON GLUCOSA	
Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})	0.034
Rendimiento, y (g de biomasa / g de sustrato)	0.182
Coficiente metabólico, q (g sustrato / g biomasa \cdot h)	0.187
CORRIDA CON MELAZA	
Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})	0.032
Rendimiento, y (g de biomasa / g de sustrato)	0.669
Coficiente metabólico, q (g sustrato / g biomasa \cdot h)	0.048

4. CONCLUSIONES

Con la finalidad de reducir drásticamente el tiempo de fermentación es imprescindible asegurar que el inóculo se encuentre en la fase exponencial.

Debido a que la producción y, consecuentemente, la productividad del metabolito se afecta con las condiciones de operación, es necesario realizar la fermentación utilizando las condiciones óptimas.

La utilización de melaza como sustrato, requiere de un tratamiento previo para eliminar aquellas sustancias que producen efectos inhibitorios en la producción del ácido giberélico y por otro lado que algunas sustancias nitrogenadas induzcan al microorganismo hacia el metabolismo primario y a un crecimiento acelerado de biomasa.

5. BIBLIOGRAFÍA

Barrow, A. et al., *The effect of varied temperature on the kinetics of Gibberella fujikuroi in stirred culture*, Canadian Journal of Microbiology, 10, pp. 458 - 464 (1961).

Barrow, A. et al., *The kinetics of metabolism of Gibberella fujikuroi in stirred culture*, Canadian Journal of Microbiology, 10, pp. 407 - 442 (1961).

Barrow, A. et al., *The metabolism of Gibberella fujikuroi in stirred culture*, Canadian Journal of Microbiology, 10, pp. 227 - 276 (1961).

Barrow, A. et al., *Gibberellic acid, a metabolite product of the fungus Gibberella fujikuroi: some observations of its production and isolation*, J. Sci. Food Agric., 6, pp. 340 (1955).

Bu ' lock, J. et al., *Regulation of secondary Biosynthesis in Gibberella fujikuroi*, Trans. Brit. Mycol. Soc. ,62 (20), pp 377 - 389.

Darken , M. et al., "Gibberellic acid production", U.S. Patent 2.906.670, Sep. 1959.

Hill, A.T., Hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, Ediciones Omega S.A, Barcelona, España (1977).

Holme, T. y Zacarias, B., *Gibberellic acid formation in continuous culture*, Biotech. Bioeng. 7, pp. 413 - 414 (1965).

Molina C.M, Murillo G.A, *Producción de Ácido Giberélico mediante fermentación utilizando el hongo Gibberella fujikuroi*, Ingeniería ,5(2),63-70,1995.

Moore, T.C., Biochemistry and Physiology of Plant Hormones, Springer-Verlag, Nueva York, USA (1979).

Rainbow, R., Rose, A.H., Biochemistry of Industrial Microorganisms, The Whitefriars Press Limited, Londres (1969).

Sánchez-Marroguín, A., Microbiological production of gibberellic acid in glucose media, Appl. Microbiol. 11, pp 523 (1963).

6. AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación por el financiamiento del proyecto 325 - 93 - 201 "Producción de metabolitos secundarios mediante fermentación". Así mismo al Lic. Herberth Madrigal del Centro de Investigaciones de Tecnología de Alimentos (CITA) por su cooperación en el análisis de las muestras.

Manuel E. Molina, prof. Escuela de Ingeniería Química, Univ. de Costa Rica, e-mail : mmolina@perry.eiq.ucr.ac.cr.