

TESIS DEFENDIDA POR

**Berenice Avendaño Morales**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Idania Valdez Vazquez

*Director del Comité*

---

Dra. Rufina Hernández Martínez

*Miembro del Comité*

---

Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez

*Miembro del Comité*

---

Dr. Francisco Javier Rodríguez Varela

*Miembro del Comité*

---

Dr. Ernesto García Mendoza

*Miembro del Comité*

---

Dra. Rufina Hernández Martínez

*Coordinador del programa de posgrado  
en Ciencias de la vida*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de estudios de posgrado*

20 de septiembre de 2010

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA VIDA  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO CON HONGOS FILAMENTOSOS  
PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS**

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA VIDA**

Presenta:

**BERENICE AVENDAÑO MORALES**

Ensenada, Baja California, México, septiembre de 2010.

**RESUMEN** de la tesis de **Berenice Avendaño Morales**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS, EN CIENCIAS DE LA VIDA con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Septiembre 2010.

**FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO CON HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS.**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Idania Valdez Vazquez

La alta demanda por energéticos a nivel mundial obliga ampliar el estudio sobre sistemas de producción sustentable. En este sentido el biodiesel es una opción importante y su generación a partir de lípidos microbianos permitirá *i*) la reducción de gases efecto de invernadero y *ii*) una producción sustentable cuando se utilizan materiales de desecho. El presente estudio, propone la producción ácidos grasos (materia prima para la producción de biodiesel) a partir de la Fermentación en Sustrato Sólido (FSS) de bagazo de *Gelidium robustum*, al utilizar hongos aislados de fuentes marinas y terrestres de Ensenada, Baja California. Se lograron aislar un total de 17 cepas, de las cuales las denominadas M7 y M11 fueron las mayores acumuladoras lipídicas. En base a sus características morfológicas y el análisis de la región del espaciador transcrito interno y la región de la proteína  $\beta$ -tubulina el aislado M7 se ubico dentro de la especie *Penicillium chrysogenum* (condiciones de crecimiento óptimo evaluado fue 26.5°C y pH de 5.95) y el aislado M11 se identificó como *Penicillium toxicarium* (condiciones de crecimiento óptimo evaluado fue 21°C y pH de 4.5). Se exploró el efecto de la relación C/N, temperatura, oxígeno y humedad (a dos niveles) sobre la generación de ácidos grasos por FSS del bagazo algal con *P. toxicarium*. Se encontró que una humedad del 50% y una temperatura de 26°C tuvieron un efecto positivo sobre la producción de lípidos ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, la relación C/N y el suministro de oxígeno no tuvieron efecto sobre la producción de grasas. La mayor cosecha lipídica fue 38.7 g<sub>lip</sub>/Kg<sub>sc</sub> obtenida a 50% de humedad, 26°C, una relación C:N de 52.21 y sin aireación. El análisis cromatográfico mostró una mayor proporción de ácidos palmítico, linoléico, oléico y esteárico (75.5, 23.5, 23.0 y 22.3%, respectivamente). Se observó una tendencia en el perfil de los ácidos grasos según la temperatura de incubación: a mayor temperatura de incubación menor proporción de ácidos insaturados y viceversa.

**Palabras Clave:** bagazo, biodiesel, fermentación en sustrato sólido, lípidos microbianos.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Berenice Avendaño Morales** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE, IN LIFE SCIENCE degree in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California, México. september 2010.

## **SOLID STATE FERMENTATION WITH FILAMENTOUS FUNGI FOR THE PRODUCTION OF UNSATURATED FATTY ACIDS**

The high demand for energy worldwide requires extending the study on sustainable production systems. In this sense, the biodiesel is an important option and its generation from microbial lipids could allow i) the reduction of greenhouse gases and ii) sustainable production when waste materials are used. The present study proposes the fatty acid production (raw material for biodiesel production) from the solid state fermentation (SSF) of *Gelidium robustum* bagasse, using fungi isolated from marine and terrestrial sources of Ensenada, Baja California. A total of 17 strains were isolated, which the isolates M7 and M11 were the main lipid producers. Based on their morphological characteristics and the analysis of their internal transcribed spacer region and the region of  $\beta$ -tubulin protein, the isolated M7 was identified as *Penicillium chrysogenum* (optimal growth conditions were 26.5°C and pH of 5.95) and the isolated M11 was identified as *Penicillium toxicarium* (optimal growth conditions were 21°C, pH 4.5). It was explored the effect of the C/N ratio, temperature, oxygen and moisture (at two levels) on the generation of fatty acids by FSS of algal bagasse with *P. toxicarium*. It was found that moisture 50% and a temperature of 26°C had a positive effect on the production of lipids ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the C/N ratio and the oxygen supply had no effect on fat production. The highest production was 38.7 g lipid<sub>lip</sub> / kg<sub>sc</sub> obtained at moisture 50%, 26°C, a C/N ratio of 52.21 and without aeration. The chromatographic analysis showed a higher proportion of palmitic acid, linoleic acid, oleic acid and stearic acid (75.5, 23.5, 23.0 and 22.3%, respectively). There was a tendency in the fatty acid profile towards a higher proportion of unsaturated fatty acids at lower temperatures, and vice versa.

**Keywords:** Bagasse, biodiesel, microbial lipids, solid state fermentation.

## **Dedicatorias.**

No sé cómo describir lo que siento por ti, y si puedo acercarme con estas letras a tu esencia lo intentaré: eres como mis pantuflas cuando hace frío, como una sopita de estrellitas cuando estoy enferma, mis ATP's cuando necesito energía, el color con el que mejor me veo... ¿entiendes cuánto te amo?, ni yo misma lo entiendo... gracias por ser la mujer perfecta, aquella que decidió entregar su vida a alguien mejor, y que a través de eso nos diste libertad para vivir, te amo mamá, te amo por tantas cosas y por ninguna en particular, y es tan bueno saber que después de la muerte estaremos aún juntas, sentadas en la misma mesa.

A mi hermana Caro, maguitos; juntas o separadas, en el mismo cuarto o a muchos kilómetros de distancia, enojadas, contentas, que se yo, siempre he disfrutado tanto tu vida, siempre me he alegrado de tu vivir, y saber que estás, me hace fuerte. Te amo mucho hermana.

A mi Elisita bella, mi monono; quiero que sepas que eres el mejor ejemplo de dulzura que Dios me ha dado, eres una hermosa persona, gracias por siempre decirme la verdad, por abrazarme cuando lloro, cantar conmigo en las noches, y hacer tantas locuras, puras locuras... mi pequeña hermosa te amo.

A mi papi Juan, gracias por recibirnos como propias y por darnos tanta paz, la paz que nuestro hogar necesitaba para llamarse "hogar", lo amo mucho, y espero compartir muchos años más con usted, mi pastorcito favorito!!!

## **Agradecimientos.**

A la familia Ambrocio, por abrirme las puertas de su hogar, por comprenderme, regañarme y darme mi lechita en la noche, me dieron muchas alegrías...

A la familia Jara Bonilla por estar al pendiente de la "boronita". Gracias Mary, Nana, Kike, Linda, Mely (mi primera y gran amiga en Ensenada) y por supuesto José.

A Gilberto Martínez, amigo, gracias por lo bellos momentos, cuando los cuatro andábamos del tingo al tango... y del tango al tingo.

A la familia Ramírez Rojas, por darme una familia en Ensenada, porque llegar a su casa era como llegar a la mía, porque podía "asaltar" el refri con libertad, por darme una cama, cobijas y mucho amor. Usiel, simplemente sin ti no hubiera terminado esto. Por todo el tiempo, tu disposición, tu mal genio, pero también tu risa incontrolable; me hiciste la vida amena amigo. Ensenada, Tijuana, la Baja sur, el DF, valle de Bravo, buenos y malos momentos pero al fin y al cabo, vivimos. Gracias.

A la familia Gaytán Hannosh: Lisa, Chava, Samara, Danya, amigos los llevaré no cerca del corazón, sino en él, las veladas, oraciones, risas, películas, comidas, cenas... los extrañare, de verdad, no habrá nadie que me haga chai como tu amiga!!!

A la familia Cabral Violante, gracias por estar al pendiente de mi humanidad, por las comidas y las invitadas a su casa, por dejarnos entrar en su hogar. Que bella familia son.

A mi amiga y gran ejemplo Tita, hermosa, tu vida me ha impactado, gracias por dejarme entrar tan fácilmente a tu corazón y descubrirme, siempre sonriente, siempre entregada, que hija de Dios tan linda eres, te llevare en mí.

Candy: amiga, hermana mía, que buenos fueron los momentos juntas, de un extremo a otro, en el suelo y en el cielo, enojadas, contentas, regañándome, sonriéndome, pero nunca solapando mi pecado, eres excelente Candys White Andrew, y aún hay más para nosotras, que bien!!!

Verte, y saber que estas bien me ha dado fuerza para ver más allá de la raíz en donde estoy plantada y descubrir que puedo ver muy lejos desde esta altura, y aunque no estuvimos juntos en esto, si de otra forma. Gracias flaquito hermoso: por nosotros SB.

Albertito, fue un honor y gran gusto que estuvieras involucrado en este negocio, en mi no cabe duda que eres un hombre de una sola pieza, y eso es difícil de ver, amigo, que venga lo que venga que estamos de pie esperándolo.

A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

Doctora Idania, muchas gracias por darse el tiempo para cuidar que este trabajo saliera a tiempo y en su punto, sin usted esto no hubiera sido posible, y perdone si la hice enojar, no fue al propósito, la estimo mucho.

Doctora Rufina, me alegro mucho compartir con usted un tiempo en CICESE, gracias por abrirme un tiempo en su vida y enseñarme más de los hongos, mi admiración y respeto para usted.

Un agradecimiento al Ocean. David Lora Sánchez, Director General de AGARMEX, por facilitarnos las muestras del alga, así como la información de su empresa; sin usted no hubiera sido posible culminar este trabajo.

Oscar Martínez, muchas gracias por molestarme en el laboratorio, por siempre sonreír y quitarme la pesadez de trabajar tanto. Gracias por las comidas, platicas y por lo demás, por el tiempo que me diste para sonreír. Espero tener muchos años más de amistad contigo.

Pily, que bueno fue compartir cuarto contigo, si literal!!! Cuarto, laboratorio, y bailadas, esto apenas comienza que no?

Mi Maranatha hermosa: Lily, Berny, Gaby y Normita, me alegra tanto llegar a mi segundo hogar y verlos allí, con abrazos abiertos para mí. Samy, que bueno es tenerte en la familia, eres un ejemplo para mí, y espero muchos años felices viendo su hogar crecer y que vengan los sobrinos!!!

Xochiquetzalli (chochi), Gabriela (vaquita) y Nancy (nanciton): amigas, que bueno es tener 10 años de amistad con ustedes y que la esencia de nosotras y entre nosotras sea la misma. Qué bueno es tener amigas tan sencillas y capaces. Las quiero muchito.

Silvita, Lily, Araceli, Marinita, Dany, Toño, Miry, Frida, Estelita, Blanca, Kike, Brenda, Familia Morales... que familia tan chida es la suya, es un privilegio compartir la sangre con gente como ustedes, ahí le voy, agárrense!!!

A Ensenada, porque tu mar calmaba al corazón que llevo dentro, en tus calles aprendí la belleza de vivir, en tus playas me enamoré y en tu cielo vi la grandeza de Dios.

Aquí estamos de nuevo, en el punto donde se cierran círculos y comenzamos a formar otro, tuya por siempre, más allá de la muerte amor de mi vida, más allá.

*Pensamientos de bien, no de mal, para que tengas el fin que esperas...*

## CONTENIDO

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés .....	ii
Dedicatorias. ....	iii
Agradecimientos. ....	iv
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas .....	xi
<b>Capítulo I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
I.1 Fermentación en Sustrato Sólido.....	1
I.2 Producción microbiana de biodiesel.....	6
I.4 Revaloración de los residuos sólidos de la industria de hidrocoloides .....	16
II. Justificación.....	17
III. Hipótesis .....	18
IV. Objetivos.....	18
<b>Capítulo II. Metodología .....</b>	<b>19</b>
V.2. Aislamiento y selección de hongos oleaginosos .....	24
V.3 Caracterización e identificación de los hongos oleaginosos .....	28
V.4. Producción de ácidos grasos mediante FSS.....	32
<b>Capítulo III. Resultados y Discusión.....</b>	<b>39</b>
VI.1 Caracterización del sustrato.....	40
VI.2. Aislamiento y selección de hongos oleaginosos.....	42
VI.3. Caracterización e identificación de los hongos oleaginosos .....	47
<b>Capítulo IV. Conclusiones.....</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo V. Recomendaciones .....</b>	<b>87</b>
<b>Capítulo VI. Literatura citada.....</b>	<b>88</b>

**CONTENIDO (continuación)**

VII. Anexos.....110

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Biosíntesis de triacilglicéridos dependiente de Acil CoA (Granner <i>et al.</i> , 2001) ..	12
Figura 2. Diagrama de flujo del plan de trabajo experimental. ....	19
Figura 3. Sitios de muestreo dentro de la Bahía Todos Santos, Ensenada B.C. a) cabeza del canal principal del Estero de Punta Banda, b) playa Agua Caliente.....	25
Figura 4 Acumulaciones lipídicas observables con la tinción Negro Sudán B en varios hongos .....	26
Figura 5. Esquematización del ensayo de FSS de bagazo algal para la producción de lípidos. ....	36
Figura 6 Montaje del ensayo de Fermentación en Sustrato Sólido.....	37
Figura 7. Ejemplo de monocultivos obtenidos de hongos filamentosos aislados de Baja California. T1: de casa, T5: de laboratorio, M12: de sedimento marino. ....	43
Figura 8. Tinción en micelio positiva para la producción de lípidos con negro Sudán B en contraste con safranina (100x). Cepa M7 al tercer día de incubación en medio caldo papa dextrosa; M11 al tercer día de incubación en medio de Inducción .....	45
Figura 9. Tinción en micelio positiva para la producción de lípidos con negro Sudán B en contraste con safranina (100x). Cepa T1 al tercer día de incubación en medio caldo papa dextrosa.....	45
Figura 10. Producción de lípidos en el ensayo de selección de hongos oleaginosos. Incubación por 3 días en caldo papa dextrosa. Incubación por tres días en medio de Inducción. ....	46
Figura 11. Colonias formadas por la cepa M11 en medio agar papa dextrosa. ....	48
Figura 12. Fotografías tomadas para la identificación a nivel Género a) cepa M7; b) cepa M11 (100x). ....	49
Figura 13. Efecto de la temperatura de incubación y pH inicial sobre el crecimiento fúngico. a) cepa M7, b) cepa M11. ....	52
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la región ITS y $\beta$ -tubulina de las cepas M7 y M11. MM: Marcador molecular (1000 pb), ITS: amplificación con cebadores ITS4 e ITS5, BT: amplificación con cebadores Bt2a y Bt2b.....	54

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

- Figura 15. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias ITS de las cepas analizadas en este estudio y de otras cepas aisladas en diferentes partes del mundo usando el método Neighbor-joining en MEGA. M7=H1ITS, M11=ACITS.....56
- Figura 16. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias  $\beta$ -tubulina de las cepas analizadas en este estudio y de otras cepas aisladas en diferentes partes del mundo usando el método Neighbor-joining en MEGA. M7=H1BETATUNULINA, M11=ACBETATUBULINA .....57
- Figura 17. Comportamiento de la producción de lípidos llevada a cabo por las cepas de *Penicillium chrysogenum* y *P. toxicarium* a partir de bagazo algal.....60
- Figura 18. Gráficas de efectos principales de (a) relación C/N ( $p > 0.05$ ), (b) oxígeno ( $p > 0.05$ ), (c) humedad ( $p < 0.01$ ), (d) temperatura ( $p < 0.05$ ) sobre la producción de lípidos por la FSS de bagazo algal con *P. toxicarium*. .....66
- Figura 19. Producción de lípidos bajo la interacción de dos factores de crecimiento sobre sustrato seco (sc) de *G. robustum* a 10 días de incubación. (a) Interacción entre la temperatura y la humedad ( $p < 0.05$ ), (b) Interacción entre la temperatura y relación C/N ( $p > 0.05$ ).....72
- Figura 20. Relación de ácidos grasos saturados e insaturados producidos por *P. toxicarium* durante la FSS bajo una temperatura de 21 y 26°C. ....79
- Figura 21. Relación ácidos grasos saturados e insaturados producidos por *P. toxicarium* durante la FSS con y sin aireación.....80

## LISTA DE TABLAS

Tabla I Comparación entre fermentación en sustrato sólido y fermentación líquida.....	3
Tabla II Microorganismos y sustratos empleados en distintas aplicaciones de la FSS. ....	5
Tabla III Especificaciones para el uso del Biodiesel según los estándares Europeos (Canaki y Sanli, 2008) .....	7
Tabla IV Perfil lipídico reportado en fuentes vegetales, animales y de microorganismos oleaginosos.....	8
Tabla V Condiciones típicas reportadas para la producción de ácidos grasos de origen microbiano. ....	11
Tabla VI Análisis fisicoquímicos realizados al bagazo de <i>Gelidium robustum</i> . ....	20
Tabla VII Medio de inducción para la selección de hongos oleaginosos. ....	27
Tabla VIII Diseño pentagonal para evaluar la temperatura y pH óptimos de crecimiento. .	29
Tabla IX Ensayo preliminar para establecer condiciones de crecimiento fúngico sobre bagazo algal. ....	32
Tabla X Diseño factorial completo para el ensayo de Fermentación en Sustrato Sólido. ....	35
Tabla XI Estándares de metilésteres de ácidos grasos utilizados en la Cromatografía de gases.....	38
Tabla XII Caracterización del bagazo de <i>Gelidium sp.</i> .....	40
Tabla XIII Hongos filamentosos aislados de fuentes marinas y terrestres de Baja California. ....	42
Tabla XIV Producción de biomasa y lípidos en caldo PD y de Inducción.....	46

**LISTA DE TABLAS (continuación)**

Tabla XV Crecimiento fúngico sobre bagazo de <i>Gelidium robustum</i> con diferentes pre-tratamientos.....	59
Tabla XVI Producción de lípidos durante la Fermentación en Sustrato Sólido de bagazo algal con <i>Penicillium</i> sp.....	64
Tabla XVII Producción de ácidos grasos con hongos filamentosos bajo diferentes condiciones de cultivo. ....	74
Tabla XVIII Perfil lipídico de los ácidos grasos generados bajo los 16 tratamientos en la FSS.....	77
Tabla XIX Composición lipídica relativa de varias especies oleaginosas.....	82

# Capítulo I

---

## Introducción

---

### I.1 Fermentación en Sustrato Sólido

La fermentación en sustrato sólido (FSS) es un proceso llevado a cabo por microorganismos los cuales tienen la capacidad de utilizar como fuente de nutrientes una matriz sólida o semisólida con una baja actividad de agua<sup>1</sup> (Cannel y MooYoung, 1980; Aidoo *et al.*, 1982). La matriz de soporte debe tener como características principales ser insoluble en agua y tener una alta porosidad, lo que le permite adsorber grandes cantidades de agua en la interfase sólido/gas, teniendo una variación de humedad entre 30 a 80% (Laukevins *et al.*, 1984; Raimbault, 1998).

La FSS se ha utilizado desde hace varios cientos de años. En el Oriente, se ha utilizado en la elaboración de comida tradicional como el tempeh, ontjom, vino shao-hsing y licor. A partir de 1900, se amplió su aplicación a la producción de enzimas, insecticidas, antibióticos y reactivos para análisis. Sin embargo, fue entre 1920-1960 cuando se descubrieron nuevos caminos para llevar a cabo la FSS, resultado del desarrollo de fermentadores tipo tambor rotatorio y con ello la explotación comercial de antibióticos como la penicilina. A partir de 1990 surgieron nuevas aplicaciones cuando se le dió un

---

<sup>1</sup> Actividad de agua (aw, por sus siglas in inglés) se define como la relación que existe entre la presión de vapor de una matriz en relación con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.

mayor énfasis al desarrollo de productos para la biorremediación, degradación de materiales peligrosos, biodesintoxicación de desechos industriales; además de generalizarse la producción de metabolitos a gran escala como antibióticos, alcaloides, enzimas y ácidos orgánicos (Chundakkadu, 2005; Aidoo *et al.*, 1982, Pandey *et al.*, 2001).

La FSS presenta diversas ventajas frente a su contraparte, la fermentación sumergida (FmS) o fermentación líquida (Tabla I). Entre las principales ventajas destacan: el uso de materiales de desecho como materia prima, una amplia variedad de matrices, menores requerimientos de energía, equipamiento económico y la recuperación de un producto concentrado, todo a un menor costo (Castillo *et al.*, 2000; Durand, 2003; Durand y Chereau, 1988; Gowthaman *et al.*, 2001; Sato y Sudo, 1999).

**Tabla I. Comparación entre fermentación en sustrato sólido y fermentación líquida.**

<b>Factor</b>	<b>Fermentación en sustrato líquido</b>	<b>Fermentación en sustrato sólido</b>
<b>Sustrato</b>	Azúcares simples solubles	Polímeros como almidón, celulosa, pectinas y ligninas
<b>Condiciones asépticas</b>	Requerida, suministradas mediante esterilización por calor	Opcional, suministradas mediante esterilización por calor
<b>Consumo de agua</b>	Alto	Bajo
<b>Control del calor metabólico</b>	Sencillo	Complejo debido a una baja capacidad de transferencia de calor
<b>Aireación</b>	Complicada debido a una limitación en el oxígeno soluble, se requieren equipos especializados	Sencilla debido a la elevada porosidad del sustrato ya que existe una gran superficie de intercambio aire/sustrato
<b>Control del pH</b>	Sencillo	Se requieren sustratos tratados con amortiguadores de pH
<b>Agitación mecánica</b>	Sencilla, se logra una buena homogenización	Difícil, se prefieren condiciones estáticas
<b>Escalamiento</b>	Sencillo, equipamiento industrial altamente desarrollado	Complicado, se requiere del diseño de nuevos equipos
<b>Inoculación</b>	Sencillo, proceso continuo	Sencillo, proceso por lote
<b>Riesgos de contaminación</b>	Elevado principalmente por bacterias	Bajo, debido a una baja actividad de agua
<b>Gasto de energía</b>	Alto	Bajo
<b>Volumen y costo de equipamiento</b>	Alto	Bajo
<b>Generación de efluentes de desecho</b>	Elevado	Bajo o nulo
<b>Concentración del producto</b>	30-80 g/L	100-300 g/L

(Adaptado de Raimbault, 1998).

Los microorganismos utilizados durante la FSS incluyen bacterias, hongos y levaduras: las bacterias se han utilizado con gran éxito en la producción de enzimas en algunos procesos alimenticios (Doelle *et al.*, 1992); las levaduras en la producción de etanol, alimentos y enzimas de interés industrial (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1992, 1992a) y los hongos en la producción de enzimas hidrolíticas, alcaloides ergóticos, ácidos orgánicos, quitina y ácidos grasos esenciales como el eicosapentanoico (EPA), docosahexaenoico (DHA),  $\gamma$  linoléico (GLA) y araquidónico (ARA) (Du *et al.*, 2007; Ma, 2006; Sergeeva *et al.*, 2008).

Respecto al sustrato empleado, éstos incluyen carbohidratos presentes en cereales y sus respectivos subproductos; así como residuos agroindustriales provenientes de cítricos, café y caña de azúcar (Tabla II). El uso de residuos agroindustriales ha permitido la disminución en los costos de producción, por lo que la FSS es una tecnología con gran potencial comercial (Castillo *et al.*, 2000; Durand, 2003).

Una de las más recientes aplicaciones de la FSS, incluye la producción de biocombustibles como etanol y biodiesel a través de la producción de ácidos grasos, siendo una nueva área de investigación de gran importancia para nuestra sociedad, que actualmente enfrenta escasez y aumento en los precios de las fuentes de energía fósil.

Tabla II. Microorganismos y sustratos empleados en distintas aplicaciones de la FSS.

Producto		Microorganismo	Sustrato
<b>ENZIMAS</b>	Amilasas	<i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Collectotrichum</i> , <i>Gloeosporioides</i> sp.	Residuos de banana
	Celulasas	<i>Trichoderma</i> sp., <i>Penicillium</i> <i>citrinum</i> , <i>T. reesi</i> , <i>A. fumigates</i>	Granos de arroz, pulpa de remolacha, tallos de plátanos, piel de coco
	Lipasas	<i>A. niger</i> , <i>P. candidum</i> , <i>P.</i> <i>camembertii</i>	Arroz y salvado de trigo
	Ligninasas	<i>Pleurotus</i> sp., <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	Paja y bagazo
<b>ÁCIDOS ORGÁNICOS</b>	Ácido cítrico	<i>A.niger</i> (mutante), <i>Penicillium</i>	Bagazo de caña, cáscara de café, salvado de trigo
	Ácido láctico	<i>Rhizopus</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.	Bagazo de caña, desechos de zanahoria
<b>METABOLITOS SECUNDARIOS</b>	Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Fusarium</i> <i>moniforme</i>	Salvado de trigo, col, soya, caña de azúcar
	Alcaloides ergóticos	<i>Claviceps</i> spp., <i>Penicillium</i>	
	Antibióticos	<i>Penicillium notatum</i> , <i>P. chrysogenum</i> .	
<b>AGENTES DE BIOCONTROL</b>		<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>israelensis</i> <i>Bacillus</i> sp.	Arroz húmedo, soya cuajada (okara)
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Pleurotus</i> sp.	Tallo de algodón, mazorca de maíz
	<b>BIO- COMBUSTIBLES</b>	Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Ácidos grasos poli- insaturados	<i>Cunninghemella elegans</i> <i>Thamnidium elegans</i>	Cereales húmedos, pulpa de manzana

(Capalbo *et al.*, 2001; Chundakkadu, 2005; Conti *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2009; Dilip, 2003; Rodríguez *et al.*, 1999; Rozman *et al.*, 1985; Stredansky *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 1993; Zohar *et al.*, 1992)

## I.2 Producción microbiana de biodiesel

El biodiesel es una mezcla de ésteres monoalquílicos provenientes de cadenas largas de ácidos grasos de C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub> como el ácido laúrico, esteárico y oléico, y de alcoholes de bajo peso molecular, principalmente metanol y etanol (Demirbas, 2009). Este biocombustible es eficiente en vehículos pesados y compite directamente con el petrodiesel, ofreciendo ventajas tales como la reducción de emisiones de gases invernadero, una producción sustentable cuando se obtiene de materiales de desecho, nula toxicidad debido a la ausencia de compuestos sulfurados y aromáticos, lo que también contribuye a un mayor grado de biodegradabilidad que el petrodiesel (Demirbas y Demirbas, 2007; Demirbas, 2007; 2009).

La materia prima para la producción de biodiesel son triglicéridos (TAG); especies químicas formadas por tres moléculas de ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol mediante enlaces éster. Debido a que los TAG se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente no pueden ser utilizados directamente en los motores pues provocarían depósitos de carbono disminuyendo su durabilidad. Por tanto, los TAG deben ser sometidos a una reacción de transesterificación en la cual reaccionan con un alcohol en presencia de un catalizador, generando la mezcla de metil-ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y glicerol (Bala, 2005; Chisti, 2007). Un punto a resaltar, es que la calidad del biodiesel final está directamente relacionada con la composición química de los TAG (longitud y grado de saturación de los ácidos grasos constituyentes). Es deseable que los TAG empleados tengan un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (AGI) y un bajo porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya que estos últimos son más susceptibles de oxidación causando la formación de gomas.

De manera general la calidad del biodiesel depende de la estructura química de los ácidos grasos que lo componen, así como los residuos de otras sustancias implicadas en su generación, por lo que se deben de realizar una serie de exámenes para comprobar que éste puede ser utilizado sin el riesgo de deteriorar el sistema del automóvil (Tabla III), (Alvarez *et al.*, 2007; Canacki y Sanli, 2008; Fangrui y Milford, 1999; Graboski y McCormick, 1998)

**Tabla III. Especificaciones para el uso del Biodiesel según los estándares Europeos**

<b>Propiedad</b>	<b>Límite</b>
Viscosidad a (a 40°C)	3.3-5 mm <sup>2</sup> /s
Densidad (a 15°C)	860-900 kg/m <sup>3</sup>
Número de cetano	51 mínimo
Punto de inflamación	120°C mínimo
Agua	500 mg/kg máximo
Cenizas sulfatadas	0.02 % máximo
Sulfuros	10 mg/kg máximo
Corrosión al cobre (3 h a 50 °C)	No. 1
Residuos de carbono	0.3 % máximo
Glicerol libre	0.02 % máximo
Glicerol total	0.025 % máximo
Contenido de fósforo	10 mg/kg máximo
Número de yodo	120 máximo
Estabilidad oxidativa (a 110°C)	6 h mínimo

(Canacki y Sanli, 2008)

Actualmente, la principal fuente de biodiesel son los TAG provenientes de especies vegetales oleaginosas (girasol, palma, jatrofa, cereales), grasas de desecho de alimentos y animales. Recientemente se ha prestado atención a los lípidos producidos por microorganismos oleaginosos, que son definidos como aquellos con capacidad de acumular TAG o ácidos grasos libres de forma intracelular con valores superiores al 20% de su peso total (Ratledge, 2002; 2004; Ratledge y Wynn, 2002).

Los TAG obtenidos de aceites vegetales o grasas animales, suelen tener una composición fija (Tabla IV), que difícilmente puede ser manipulada, lo que en algunas ocasiones produce un biodiesel de baja calidad. Cuando los aceites de origen animal o vegetal son extraídos se obtienen aceites crudos los cuáles contienen usualmente ácidos grasos libres, fosfolípidos, esteroides, agua, sustancias odoríferas, y otras impurezas. Después, cuando se lleva a cabo la refinación pueden quedar trazas de ácidos grasos libres y agua; éstos interfieren con la separación de los metil-ésteres de ácidos grasos (biodiesel) y el glicerol generados a partir de la transesterificación (Fangrui y Milford, 1999). Contrario a esto, los TAG obtenidos de microorganismos oleaginosos tienen una composición muy diversa, que además puede ser fácilmente manipulada para obtener la proporción deseada de AGS/AGI mediante el control de las condiciones de crecimiento del microorganismo en cuestión (Meng *et al.*, 2008).

**Tabla IV. Perfil lipídico reportado en fuentes vegetales, animales y microorganismos oleaginosos.**

Fuente	Perfil lipídico (%)					
	<i>Palmitico</i> (C16:0)	<i>Palmitoléico</i> (C16:1)	<i>Estearico</i> (C18:0)	<i>Oléico</i> (C18:1)	<i>Linoléico</i> (C18:2)	<i>α-linolénico</i> (C18:3)
<b>VEGETAL</b>						
Maíz	11.67	-	1.85	25.16	60.60	0.48
Crambe	2.07	-	0.70	18.86	9.00	6.85
Girasol	6.08	-	3.26	16.93	73.73	-
<b>ANIMAL</b>						
Cerdo	28-30	-	12-18	40-50	7-13	-
Pollo	22.76	8.37	5.36	42.07	17.14	1.07
<b>MICROBIANA</b>						
Microalgas	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Levaduras	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Hongos	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bacterias	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

(Goering *et al.*, 1982; Meng *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2003)

En comparación con los aceites de origen vegetal o animal, los aceites microbianos provenientes de microalgas, levaduras, hongos o bacterias presentan características que los posicionan en un sitio preferencial para su explotación comercial. Entre las ventajas que se pueden citar se encuentran: *i*) ciclos cortos de producción (días o semanas), *ii*) se requieren pequeños espacios para su producción y *iii*) no requieren de suelo por lo que no desgastan áreas fértiles, como es el caso de los monocultivos propuestos para la obtención de biodiesel de origen vegetal (Li y Wang, 1997).

La cantidad de lípidos acumulados por microorganismos oleaginosos varía entre el 20 al 76% bajo ciertas condiciones de crecimiento, donde cada tipo de microorganismo tiene requerimientos muy específicos en cuanto al medio de cultivo y las condiciones fisicoquímicas de producción. Las microalgas han sido ampliamente estudiadas, estas utilizan el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y la luz solar como fuente de energía para llevar a cabo la acumulación de lípidos bajo condiciones especiales según la especie (Quiang *et al.*, 2008). Otros factores de importancia son el pH, la salinidad, la temperatura, los minerales y los micronutrientes. Se ha reportado que la limitación en la fuente de nitrógeno y la intensidad de luz son factores clave en la acumulación de lípidos. Sin embargo la operación de los fotorreactores requeridos para el óptimo crecimiento de las microalgas eleva considerablemente los costos de producción restringiendo su aplicación (Albarracín, 2007). En el caso de las bacterias el uso de la ingeniería metabólica es de suma importancia puesto que ha sido una herramienta utilizada para modificar la forma en que la cepa acumula lípidos. Kalscheuer y colaboradores (2006) produjeron directamente 28 g/l de metil-ésteres de ácidos grasos al utilizar una cepa mutante de *E. coli* al realizar una fermentación tipo lote. Aunque la obtención de cepas mutantes presenta ventajas, los sustratos utilizados aún son costosos (glucosa, gluconato y aceite de oliva) (Tabla V). Finalmente, hongos y levaduras se han utilizado en diversos estudios enfocados en caracterizar y cuantificar ácidos grasos generados bajo condiciones de estrés nutricional, principalmente para su aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica y recientemente en la producción de biodiesel. Gracias a que estos microorganismos pueden crecer en una amplia variedad de sustratos (tanto simples como complejos) la investigación se está dirigiendo al empleo de

residuos agroindustriales, los cuales presentan gran variabilidad en su composición fisicoquímica, y por ende una gran oportunidad de crecimiento para estos microorganismos. Así, su uso representa una oportunidad para aumentar la rentabilidad del tratamiento sin generar grandes cantidades de "nuevos desechos". Este tipo de fermentaciones han alcanzado acumulaciones lipídicas de hasta un 40%, por lo que su uso resulta tanto atractivo como prometedor. En general, la producción industrial de ácidos grasos con hongos puede disminuir los costos de producción aumentando la sustentabilidad del proceso, ventaja que presentan frente a las microalgas y bacterias (García, 2007; Hamelinck *et al.*, 2007; Raimbault, 1998).

Asimismo, la capacidad de los hongos filamentosos para crecer sobre sustratos sólidos los posiciona de forma ventajosa sobre otros microorganismos. Esto se debe a la presencia de enzimas hidrolíticas que son secretadas en la punta de la hifa las cuales pueden penetrar el sustrato sólido incrementando su accesibilidad a todos los nutrientes disponibles. Gracias a estas enzimas, es posible utilizar de forma efectiva la FSS para la producción de lípidos (biodiesel) a partir de sólidos orgánicos residuales. De esta forma, los hongos son los mejor adaptados al proceso de FSS debido a sus propiedades fisiológicas, enzimológicas y bioquímicas; como son su tolerancia a una baja actividad de agua, su capacidad de soportar una alta presión osmótica, y su habilidad para colonizar y degradar una matriz sólida convirtiéndolos en microorganismos altamente eficientes y competitivos. Esto permitela la bioconversión de sustratos sólidos como los desperdicios agroindustriales los cuales suelen tener un bajo o nulo valor comercial, alta disponibilidad y una gran cantidad de material fermentable (García, 2008; Raimbault, 1998).

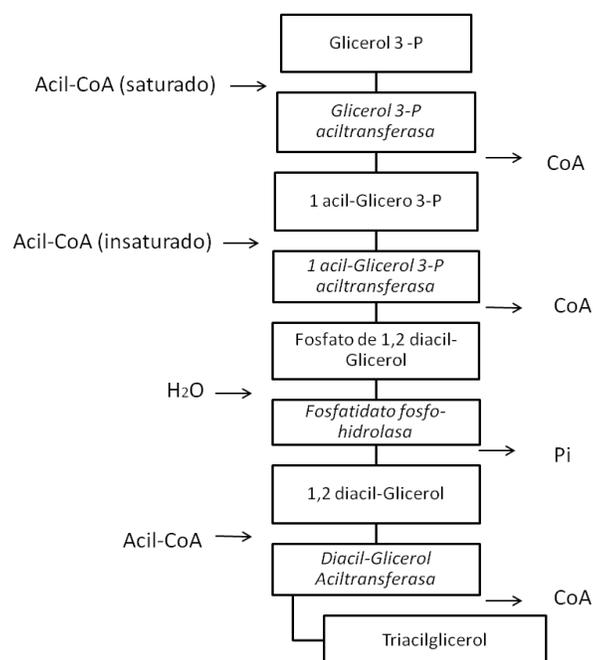
Tabla V. Condiciones típicas reportadas para la producción de ácidos grasos de origen microbiano.

Condiciones de crecimiento	Microorganismo	Contenido lipídico (%)	Sustrato	Referencia
<b>HONGOS</b>				
Deficiencia de N, baja actividad de agua, pH ácido, uso de O <sub>2</sub> , fuentes de carbono de bajo costo con alta producción de lípidos, cultivo económico y viable en biorreactores. <i>Desventajas: Poca información sobre nuevas especies y condiciones de cultivo.</i>	<i>Thamnidium elegans</i>	11.43	Pulpa de manzana	Stredansky <i>et al.</i> , 2000
	<i>Cunninghemella echinulata</i>	39.6	Residuo de tomate hidrolizado	Stylianios <i>et al.</i> , 2008
	<i>Mortierella isabellina</i>	65.5	Xilosa	Stylianios <i>et al.</i> , 2009
<b>LEVADURAS</b>				
Deficiencia de N, temperatura óptima 30°C, pH neutro o ligeramente ácido, con o sin O <sub>2</sub> , fuentes de carbono de bajo costo, facilidad de cultivo y escalamiento. <i>Desventajas: Poca información sobre nuevas especies y condiciones de cultivo.</i>	<i>Apiotrichum curvatum</i>	30	Medio definido	Ykema <i>et al.</i> , 1988
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	25	Glicerol	Meesters y Huijberts, 1996
	<i>Trichosporon fermentans</i>	40.1	Residuo de arroz hidrolizado	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2002
<b>BACTERIAS</b>				
Amplio rango de temperaturas y pH, con o sin O <sub>2</sub> , fuentes de carbono de bajo costo, facilidad de cultivo y escalamiento. <i>Desventajas: Poca información sobre nuevas especies y condiciones de cultivo.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38	Aceite de oliva	De Andrés <i>et al.</i> , 1991
	<i>Monascus purpureus</i> DSM 1379	43	Glucosa	Rasheva <i>et al.</i> , 1997
	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	76	Gluconato	Álvarez, 2006
<b>MICROALGAS</b>				
Amplio rango de temperatura, pH y salinidad, agitación constante, CO <sub>2</sub> como fuente de carbono, alta producción. <i>Desventajas: Escalamiento en fotorreactores costoso y complejo.</i>	<i>Cylindrotheca</i> sp.	37	CO <sub>2</sub>	Meng <i>et al.</i> , 2008
	<i>Nitzschia</i> sp.	20	CO <sub>2</sub>	Anderson <i>et al.</i> , 1978
	<i>Schizochytrium</i> sp.	25	CO <sub>2</sub>	Ganuza <i>et al.</i> , 2008

### I.3 Factores que influyen en la producción de ácidos grasos

Los ácidos grasos y sus derivados metabólicos están implicados en diversos papeles en el metabolismo, estructura celular y funciones de la membrana (Watson, 1984). Su perfil químico y contenido dependen de la composición del medio, estado fisiológico y la constitución genética del microorganismo, la cual varía drásticamente entre especies (Laoteng *et al.*, 1999; Ratledge, 1997; Somashekar *et al.*, 2003).

El almacenamiento lipídico en los microorganismos oleaginosos requiere la actividad de la enzima ATP: citrato liasa (ACL) que genera Acetil Co-A en el citosol precursor de la síntesis de ácidos grasos. Una molécula de Acil Co-A (ácidos grasos de cadena larga unidos a la coenzima A, también llamados ácidos grasos activados) producen 1-acilglicerol 3-P a partir de su unión con el glicerol-3-fosfato llevada a cabo por la glicerol 3-P aciltransferasa, ésta es desfosforilada a 1, 2-diacilglicerol. La enzima diacilglicerol acil-transferasa aporta una tercera molécula de acil-CoA dando como resultado triacilglicéridos (Evans y Ratledge, 1985; Ratledge, 1987) (Figura 1).



**Figura 1 Biosíntesis de triacilglicéridos dependiente de Acil CoA (Granner *et al.*, 2001)**

Ratledge (1994) observó que por cada gramo de carbono consumido proveniente de varios azúcares, polisacáridos y polialcoholes se sintetizan aproximadamente 0.18 a 0.22 gramos de lípidos en microorganismos oleaginosos. Sin embargo, esta facultad está determinada por varias enzimas como la ATP: citrato liasa y aunque la ACL es esencial para que se lleve a cabo la generación de ácidos grasos no se ha observado una correlación entre ésta y los depósitos de grasas por lo que su función es insuficiente para explicar dicho almacenamiento (Ratledge y Winn, 2002).

Debido a este hecho se ha estudiado otra enzima de importancia en la biosíntesis de lípidos como la enzima málica (ME) que genera NADPH (proveedora de energía reductiva en la síntesis de lípidos). Wynn y colaboradores (1997) inhibieron la ME con sesamol en el hongo filamentoso *Mucor circinelliodes* observando una disminución de aceites en un 25%. Años más tarde se corroboró la importancia de la ME cuando se logró su sobreexpresión en *Mortierella alpina* y se comparó su expresión con la de cepas silvestres. Su incubación fue en medio líquido cuya relación C/N fue de 66. Se observó un aumento de la actividad de la ME de 2 a 3 veces y con un incremento de lípidos de de 12 a 30% en la cepa manipulada. Después de 96 h de cultivo la actividad enzimática cesó (Ying *et al.*, 2007).

Tanto la genética, como las condiciones de cultivo están involucradas en la cantidad y perfil de ácidos grasos producidos. Así encontramos que el incremento en la concentración de carbohidratos es necesario para suplir tanto el carbono como la energía necesaria para la síntesis de lípidos (Cochrane, 1958; Prill *et al.*, 1935), hecho por el cual se han evaluado diversas concentraciones de azúcares en los medios de cultivo. No sólo los carbohidratos juegan un papel importante en esta vía, pues se ha detectado que una concentración baja de nutrientes (esencialmente nitrógeno) origina que las cepas aumenten su concentración intracelular de lípidos (Ratledge, 2002; 2004; Ratledge y Wynn, 2002). Así, cuando el nitrógeno es deficiente, la fuente de carbono es asimilada por el microorganismo para la síntesis de triglicéridos (Evans y Ratledge, 1985).

Varios estudios se han enfocado en determinar la relación de C/N más conveniente para la especie de su interés. En el caso de *Aspergillus parasiticus* se encontró una mayor

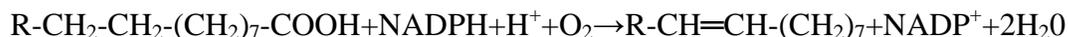
producción lipídica (130 mg/100 ml) cuando se creció con un 30% de glucosa, sin embargo, la biomasa generada en dichas condiciones no fue la máxima en comparación con otras composiciones de cultivo (Shih y Marth, 1974). En el caso de *Cunninghamella* sp. cepa LGAM. se estudió una relación C/N igual a 60, encontrando un producción lipídica de 2.18 g/L bajo las mismas condiciones de desarrollo que las usadas para *Mortierella ramanniana* cepa ATHUM 2922 generando 1.19 g/L y *Zygorhynchus moelleri* MUCL 1430 con un rendimiento igual a 1.27 g/L (Kavadia *et al.*, 2001). Un año después Gema y colaboradores estudiaron un rango amplio de C/N (94 a 183) para la cepa *Cunninghamella echinulata*, encontrando que la mayor acumulación de lípidos fue a una C/N igual a 183 con un 46.6% de lípidos después de 193 h de cultivo (Gema *et al.*, 2002).

Aunque se ha comprobado que la cantidad de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo tiene un efecto directo sobre la acumulación lipídica, también se ha observado que el tipo de fuente nitrogenada tiene influencia. En un ensayo realizado con *Fusarium solani* se concluyó que el medio que contenía nitrato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono fueron los mejores para la síntesis de lípidos siendo de 48.43% en comparación con el nitrato de sodio con el cual se obtuvo un rendimiento de 3.58%. Resultados similares fueron encontrados con *Fusarium oxysporum*, 48.96 vs. 44.96% respectivamente (todos incubados a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 12 días en medio definido). Estos resultados no son extrapolables a otras especies, p. ej. *Aspergillus giganteus* y *A. niger*, que presentaron una mayor acumulación de lípidos con nitrato de sodio en comparación con el nitrato de amonio (42.26 vs. 26.93 y 36.07 vs. 24.51, respectivamente). En ambos medios de cultivo se utilizó glucosa como fuente de carbono, incubados en botes Roux por 12 d a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Baquir *et al.*, 1997).

Otra de las condiciones ambientales estudiadas que influyen en el tipo de lípidos, más que en su rendimiento, es la limitación de oxígeno. El trabajo realizado por Sukanya y colaboradores (2006) demostró que el porcentaje lipídico en *Mucor rouxii* fue similar, bajo condiciones aerobias y anaerobias siendo del 13-14%, pero mostrando diferencia significativa en el perfil químico de los ácidos grasos puesto que la relación AGI/AGS disminuyó de 1.9% bajo condiciones aerobias a 0.1% bajo condiciones anaerobias. Este

cambio se puede atribuir a la modificación de la actividad enzimática implicada en la síntesis de lípidos, elongación y desaturación y/o incremento o decremento del mRNA de dichas enzimas. Según Cook (1996) este cambio también se puede atribuir a la función del oxígeno como aceptor de electrones en el proceso de desaturación en los ácidos grasos.

En el proceso de desaturación son oxidados dos sustratos, uno es el NADPH y el otro es el ácido graso. Los electrones del NADPH se transfieren a través de una flavoproteína reductasa específica y un citocromo a un oxígeno activo que oxidará al ácido graso. Este último paso puede implicar una hidroxilación. Los tres componentes del sistema son la enzima desaturasa, el citocromo b5 y la NADPH citocromo b5 reductasa. La reacción global es (Devlin, 2004):



Estudiar factores que son fácilmente manipulables durante la operación de los bioreactores, como la relación C/N o el suministro de oxígeno, permite tener una visión general de la forma en la que opera la síntesis de lípidos y, por consiguiente genera bases para estudios posteriores.

#### **I.4 Revaloración de los residuos sólidos de la industria de hidrocoloides**

Aunque la fermentación en sustrato sólido ha tenido amplias aplicaciones en diversos sectores industriales, aún es necesario estudiar los factores que influyen en la producción del metabolito deseado, el microorganismo que llevará a cabo el proceso y el sustrato a emplear. Si la matriz de soporte es un residuo generado en grandes cantidades, su utilización revalorará el desperdicio aumentando la rentabilidad de su tratamiento (García, 2008).

En Baja California, México la Empresa Ensenadense AGARMEX industrializa algas marinas de los géneros *Gelidium sp.*, *Gracilaria sp.*, *Chondrus crispus*, *Euchema cottoni*, *Euchema spinosum* y *Gigartina sp.* para la obtención de hidrocoloides tales como agar y carragenina. En 1978, la planta tenía una producción entre 40 y 60 toneladas por año, producción que ha incrementado por la salida del mercado de otras empresas generadoras de hidrocoloides. Por tal motivo, la empresa ha logrado incrementar su producción hasta 125 toneladas anuales. Así, la cosecha anual de algas marinas es de 850 ton/peso seco, con un volumen aproximado de bagazo de 250 ton/peso seco (Agarmex S.A. de C.V.). De esta forma, se hace necesaria la disposición de los residuos de forma adecuada lo que genera costos a la empresa. Una alternativa ambientalmente responsable, es la revaloración de los residuos generados en esta industria mediante su uso como sustrato para la producción de biocombustibles.

Se sabe, que el bagazo generado del alga *Gelidium sesquipedale* después de la extracción de agar es rico en minerales, proteínas, azúcares y pequeñas cantidades de ácidos grasos (Ennouali *et al.*, 2006). Esto lo hace ideal para su utilización como fertilizante, aditivo en alimento animal o la producción de compuestos de interés como biocombustibles. Existen antecedentes donde el residuo generado de la extracción de alginato de las algas *Laminaria hyperborea* y *Ascophyllum nodosum* es utilizado en la obtención de metanol y etanol, con rendimientos aún susceptibles de optimizarse (Jarle, 2000). En general, se ha estudiado la producción de biocombustibles utilizando biomasa de macro y microalgas más que con el bagazo, la cual es una fuente de materia prima renovable debido a su alta disponibilidad y su bajo costo (Angenent *et al.*, 2004). Así, la

FSS puede ser una herramienta útil para transformar grandes volúmenes de estos materiales, con una tecnología sencilla generando productos de alto valor comercial (Rodríguez *et al.*, 2001).

## **II. Justificación.**

El uso del Biodiesel como fuente alterna de energía supone una mejora tanto en el ámbito ambiental como económico. El proceso propuesto de su generación a partir de materiales de desecho permite una producción sustentable, puesto que es económicamente viable, amigable con el medio ambiente y con beneficios para la sociedad. En Ensenada, la generación de aproximadamente 250 ton/peso seco de bagazo algal por parte de la empresa AGARMEX no solo aumenta la cantidad de desechos municipales, sino a su vez incrementa los gastos operativos de la empresa, ya que su disposición en basureros representa un gasto. Su uso en la generación de un producto de interés como los lípidos permitiría revalorizar el desecho y a su vez, disminuir la cantidad del subproducto. Sin embargo, para que este proceso se lleve a cabo de manera eficiente es necesario evaluar el efecto de los factores que se conocen tienen repercusión en la producción y perfil lipídico.

### III. Hipótesis

La acumulación de ácidos grasos en una fermentación en sustrato sólido con hongos filamentosos será mayor bajo condiciones de estrés hídrico, hipoxia y limitación de nitrógeno que bajo condiciones normales de crecimiento.

### IV. Objetivos

#### General

Evaluar el tipo y cantidad de los ácidos grasos generados por la fermentación en sustrato sólido de bagazo de *Gelidium robustum* bajo condiciones de estrés hipóxico, hídrico y nutricional utilizando hongos filamentosos aislados en Baja California.

#### Particulares

1. Caracterizar física- y químicamente los residuos sólidos de *Gelidium robustum* generados de la industria de compuestos hidrosolubles.
2. Aislar y seleccionar hongos filamentosos con capacidad de sobre-acumular lípidos intracelulares.
3. Evaluar las condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento de los hongos filamentosos oleaginosos seleccionados.
4. Evaluar la producción de los ácidos grasos generados por hongos filamentosos oleaginosos bajo diferentes condiciones de estrés (déficit hídrico, hipoxia y limitación de nitrógeno) por la fermentación en sustrato sólido de bagazo de *Gelidium robustum*.
5. Evaluar el perfil químico de los ácidos grasos producidos.
6. Identificar mediante la amplificación de un fragmento del DNA ribosomal el hongo filamentosos con mayor potencial de acumulación de ácidos grasos.

## Capítulo II

---

### Metodología

---

El presente capítulo describe los materiales y métodos utilizados para el desarrollo del trabajo experimental. La Figura 2 presenta de manera resumida los objetivos planteados y el plan experimental a seguir el cual se dividió en cuatro actividades que se describen en los siguientes apartados.

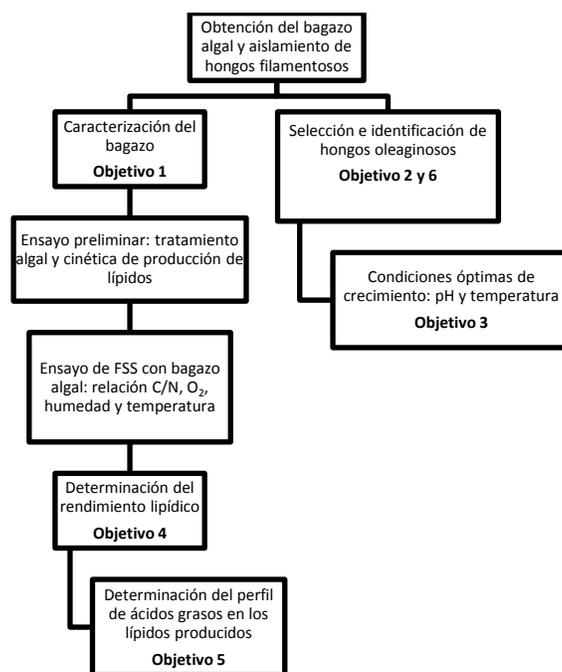


Figura 2. Diagrama de flujo del plan de trabajo experimental.

## V.1. Obtención y caracterización del bagazo algal

Se colectaron alrededor de 4 kg del residuo de la extracción de agar y carragenano del alga roja *Gelidium robustum* producido por la empresa AGARMEX, una de las mayores exportadoras de agar en México con sede en ciudad de Ensenada, Baja California. Este bagazo fue molido en licuadora hasta un tamaño de partícula de aprox. 30 mm y almacenado en congelación hasta su uso. Los análisis fisicoquímicos realizados y la metodología empleada se resumen en la Tabla VI.

**Tabla VI. Análisis fisicoquímicos realizados al bagazo de *Gelidium robustum*.**

<b>Análisis</b>	<b>Método</b>	<b>Referencia</b>
<b>Humedad</b>	Secado en estufa a 105°C/24 h	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
<b>Cenizas y materia orgánica volátil</b>	Calcinación a 550°C/ 20 min	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
<b>Carbohidratos totales</b>	Digestión con fenol	Sattler y Zerban, 1948
<b>Azúcares reductores</b>	Ácido dinitrosalicílico	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
<b>Lípidos</b>	Extracción con HCl/éter de petróleo	Cunniff, 1995
<b>Proteína</b>	Bradford	Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990
<b>Nitrógeno total</b>	Micro-Kjeldahl	Cunniff, 1995
<b>Calcio y magnesio</b>	Complexometría	APHA, 1992

### V.1.1. Humedad, cenizas y materia volátil

Se pesó entre 1.0 - 1.5 g de bagazo de *Gelidium robustum* por triplicado en una cápsula de porcelana (llevada a peso constante), secando en una estufa a 100 °C durante 24 h, al término de las cuales se enfriaron por 30 min en un desecador para posteriormente registrar su peso. Una vez pesadas, las muestras fueron calcinadas en una mufla a 550 °C

por 20 min, al término de este tiempo se enfriaron por 30 min en un desecador y se registró su peso (Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990).

### **V.1.2. Carbohidratos totales y azúcares reductores**

Para evaluar la cantidad de carbohidratos totales contenidos en el bagazo de *Gelidium robustum* se utilizó el método de fenol reportado por Sattler y Zerban (1948). Se tomaron 0.5 mg/ml de muestra y se mezcló rápidamente con 1ml de agente Fenol (50 g de fenol aforado a 1 L de agua destilada) más 5ml de ácido sulfúrico al 67 %. Se dejó reposar la mezcla por 10 min y posteriormente se incubó en un baño María a 25 °C/10 min. Después, se leyó la absorbancia a 488 nm contra un blanco, el cual contenía 1 ml de agua destilada, 1 ml de agente fenol y 5 ml de ácido sulfúrico al 67 %. Para la curva de calibración se utilizó D-glucosa en un rango de 0.0125 a 0.1 mg/ml.

Para la cuantificación de los azúcares reductores se utilizó el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) reportado por Poggi-Varaldo y Rinderknecht (1990). El reactivo de DNS contenía por litro: 100 g de 3,5 ácido dinitrosalicílico, 20 g de fenol, 5 g de sulfito de sodio, 20 g de tartrato de sodio-potasio en 1 L de hidróxido de sodio al 1 %. Se pesó por triplicado aprox. 1.0 g de bagazo de alga seca molida y se mezcló perfectamente con 5ml de agua destilada. Se tomaron 0.5 ml de sobrenadante y se agregó 2.5 ml de reactivo DNS. Se incubó en un baño María a 100 °C/10 min, al término de los cuáles se enfrió la muestra en un recipiente con agua y hielo. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 600 nm contra el blanco, el cual consistió en 0.5 ml de agua destilada y 2.5 ml del reactivo DNS. Se realizó una curva de calibración con D-glucosa con un rango lineal de 1.0 a 10.0 mg/ ml.

### **V.1.3. Lípidos**

Para la extracción de los lípidos intracelulares se utilizó el método descrito por Cunniff (1995). Primeramente, se pesó por triplicado aprox. 0.5 g de muestra de bagazo seca molida y se adicionó 6 ml de HCl concentrado, se calentó en baño María a 100 °C/90 min. Después de enfriar, se adicionaron 10 ml de éter de petróleo y se agitó vigorosamente por 1 min. Después, se colocó la fase orgánica que contenía los lípidos en un tubo de vidrio a peso constante evaporando a 60 °C en baño María y por último en una estufa a 100 °C. Al final,

se dejaron enfriar los tubos en un desecador y se registró el peso del tubo más los lípidos recuperados.

Otro de los métodos probados para la extracción de los lípidos intracelulares a partir de la biomasa fúngica fue el reportado por Bligh y Dyer (1959) en donde, después del crecimiento requerido, el micelio fue recuperado por filtración y lavado con agua estéril y se dejó en refrigeración durante 24 h.

La relación final peso/volumen fue igual a 5 g peso seco/122.5 ml de solventes (modificación del método de Bligh y Dyer), los cuales se agregaron de la siguiente manera: cloroformo/metanol/agua en una relación 1:2:0.8 agitando 15 s después de adicionar cada solvente. La solución se dejaba reposar por 18 h para posteriormente adicionar los mismos solventes cambiando la relación 1:1:0.9, después que se formaron las fases se tomó la inferior la cual fue trasladada a un vaso de precipitado (peso constante) para evaporar el cloroformo a 70 °C y finalmente meter a estufa a 10 °C por 5 min para secar completamente la muestra y pesar (Bligh y Dyer, 1959).

#### **V.1.4. Proteína**

La evaluación se realizó por triplicado tomando entre 1.0 - 1.5 g de muestra de bagazo seco molido de *Gelidium robustum* en un tubo de plástico donde se agregó 10 ml de hidróxido de sodio 1N para recuperar las proteínas presentes. Se agitó por 5 min con vortex y se calentaron por 25 min a 70°C para posteriormente centrifugar 8 min a 14,000 g. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 7.0. Luego se tomaron 50 µl y se mezclaron perfectamente con 2.5 ml de agente diluido Bradford (dilución 1:4). Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se empleó seroalbúmina para obtener la curva de calibración (rango lineal de 0.2 a 0.9 mg/ml) (Poggi-Varaldo y Rinderknecht, 1990).

También se cuantificaron proteínas mediante el colorante de Biuret. Para 1 L de agente Biuret se disolvieron 1.5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  más 6 g de NaK Tartrato.  $4\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) en 500 ml de agua destilada, a esta solución se le adicionaron 300 ml de NaOH al 10%. Se empleó seroalbúmina para la curva de calibración (rango lineal de 1.0

a 0.10 g/L). Se extrajeron las proteínas de 1 g de muestra con 10 ml NaOH 1 N, la mezcla se calentó a 70 °C/30 min, al término de los cuales se filtró (Whatman No. 1) y neutralizó con HCL 1N. A 1 ml de sobrenadante se le agregó 4 ml de agente Biuret, se incubó por 30 min a temperatura ambiente y leyó la absorbancia a 500 nm. Paralelamente, se trabajó con un blanco que consistió en 10 ml de NaOH neutralizado, de esta mezcla se tomó 1 ml y se realizó el mismo procedimiento que el descrito para las muestras.

#### **V.1.5. Nitrógeno total**

Para esta evaluación se utilizó el método de micro-Kjeldahl reportado por Cunnif (1995). Para ello, se pesó por triplicado entre 50-100 mg de bagazo de alga seca y molida, que se colocó en un matraz micro-kjeldhal añadiendo 2 g de sulfato de potasio, 50 mg de sulfato de cobre pentahidratado y 3 ml de ácido sulfúrico al 67 %. El matraz se calentó en un digestor de proteínas hasta la oxidación de la muestra (cambio de color, aproximadamente en 1.5 h). El material digerido fue transferido a un matraz volumétrico aforando a 25 ml con agua destilada y posteriormente se tomaron 5 ml los cuales fueron mezclados con 10 ml de NaOH al 40 % w/v. Esta mezcla se destiló en un aparato de destilación hasta recuperar entre 40-50 ml en un matraz Erlenmeyer el cual contenía previamente 15 ml de ácido bórico al 3 % y tres gotas del indicador Shiro Tashiro. Después, la muestra se tituló con ácido clorhídrico 0.001 N hasta un vire de color azul-violeta. Paralelamente, se trabajó con un blanco con el cual se siguió el mismo procedimiento, éste consistió en 2 g de sulfato de potasio, 50 mg de sulfato de cobre pentahidratado y 3 ml de HCl al 67 %. El HCl fue valorado utilizando 15 ml de carbonato de sodio 0.01 N y agregando 3 gotas de azul de bromofenol y titulando con HCl 0.01 N hasta un vire de color de azul a verde.

#### **V.1.6. Calcio y Magnesio**

Para calcular la dureza total se utilizó el método de complexometría reportado en APHA (1992). Primero, se pesaron por duplicado aproximadamente 1g de bagazo de alga seca molida la cual se dejó remojar por 24 h en 50 ml de agua destilada. Después de este tiempo se recuperaron 50 ml de sobrenadante, al cual se le añadió una pequeña cantidad de negro de ericromo T y 5. ml de solución tampón pH 10. Se tituló con una solución de

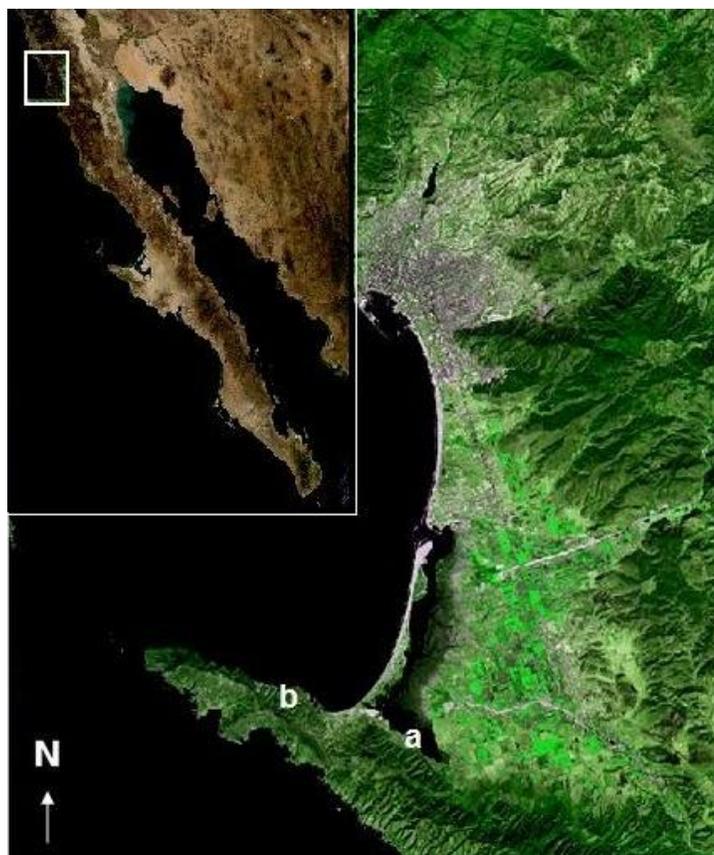
EDTA 0.02 N hasta virar de rojo a azul. Para determinar la dureza cálcica se trató la muestra de la misma forma, a los 50 ml de sobrenadante se le adicionaron 5 ml de NaOH 2N y una pequeña cantidad de murexida y se tituló con EDTA 0.02 N. Para determinar magnesio se resto la dureza total menos la dureza cálcica.

El EDTA fue valorado con 10 ml de  $\text{CaCO}_3$  (0.5 mg/ml) más 3 ml de la solución tampón pH 10 y negro de ericromo T. Se tituló con la solución de EDTA 0.02 N.

## **V.2. Aislamiento y selección de hongos oleaginosos**

### **V.2.1. Aislamiento y mantenimiento de microorganismos**

Se aislaron hongos filamentosos de diferentes ambientes marinos y terrestres de Baja California durante julio-septiembre de 2009. Los sitios de muestra fueron el canal, lodo y lama del Estero de Punta Banda y el sedimento marino de la playa Agua Caliente, ambos en el municipio de Ensenada, Baja California, México (Figura 3). Estas muestras fueron dispuestas en tubos tipo Falcon de 50 ml y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.



**Figura 3. Sitios de muestreo dentro de la Bahía Todos Santos, Ensenada B.C. a) cabeza del canal principal del Estero de Punta Banda, b) playa Agua Caliente.**

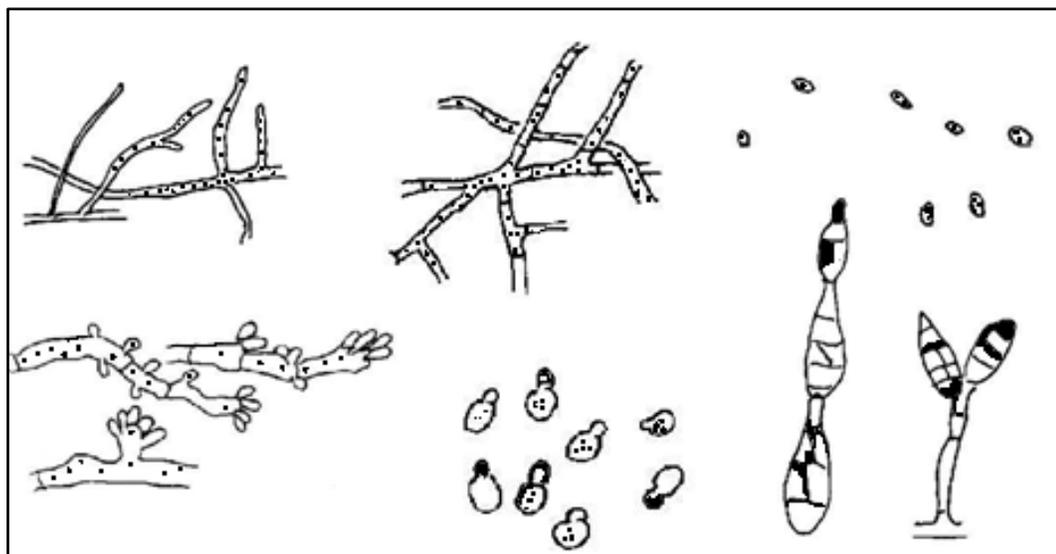
Otras muestras fueron recolectadas del medio ambiente en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Biocombustibles del Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), casas particulares y del sobrenadante de una fermentación alcohólica espontánea del alga *Macrocystis* sp.

Las muestras semi-líquidas fueron diluidas en solución salina estéril (dilución  $10^{-1}$ ), de donde se tomó 0.1 ml y se sembró por extensión en cajas Petri con agar de papa dextrosa (PDA) bajo condiciones estériles. Para los hongos filamentosos que se encontraron creciendo sobre un sustrato sólido se tomó una parte de micelio y se sembró por picadura en una caja Petri con (PDA). Sí el micelio no era visible en la muestra, 1 g del material sólido fue suspendido en 10 ml de agua estéril y sembrando 0.1 ml en cajas Petri con PDA. Cada una de las cepas fue incubada a temperatura ambiente hasta observar el desarrollo de colonias (aproximadamente 5 días), las cuales fueron re-sembradas hasta obtener

monocultivos según las diferencias macroscópicas de la colonia, es decir, color de la colonia, textura, forma y producción de pigmentos (Asan, 2004). El mantenimiento de las cepas se realizó mediante resiembras cada 3 semanas.

### V.2.2 Selección de hongos filamentosos oleaginosos

El criterio en el cual se basó la selección de los hongos oleaginosos fue la detección de acumulaciones lípidas intracelulares visibles al realizar una coloración diferencial en la cual los lípidos son teñidos en negro por el colorante Negro Sudán B contrastado con Safranina (Burdon, 1946, Figura 4). Para esto fue necesario el crecimiento del micelio en un medio con un déficit en la fuente de nitrógeno para llevar a la cepa a un estrés nutricional y por ende a la acumulación lipídica (Evans y Ratlege, 1985).



**Figura 4** Acumulaciones lipídicas observables con la tinción Negro Sudán B en varios hongos (Burdon, 1946)

Para la observación, se preparó un pre-cultivo con 50 ml de caldo papa dextrosa (PDC) para cada hongo aislado. Cada tubo se inoculó en condiciones estériles con discos de micelio y se incubó por 3 días a 30 °C con agitación constante, al término de los cuáles se realizó una tinción con el colorante Negro Sudán B el cual se preparó de la siguiente manera. Se disolvieron, con ayuda de calor 0.7 g de negro Sudán B (SIGMA 199664, certificado por Biological Stain Commission) en etanol al 70 %. Se filtró y guardó en un

recipiente de vidrio color ámbar. Para fijación y tinción de las cepas se colocó una pequeña cantidad de micelio en un portaobjetos y se fijó con calor, después se agregó suficiente colorante negro Sudán B sobre la muestra dejando reposar por 1 h al término de la cual se lavó con xilol. Después se tiñó con safranina la cual se dejó actuar por 2 min y se lavó da con agua destilada. Se consideró una tinción positiva si se presentaban gránulos en color oscuro al observarse con el Microscopio Steren (Zeiss) en contraste de fases.

Cuando se presentaban gránulos lipídicos, la biomasaera se recuperó por filtración (Whatman No. 1), guardando 2 ml para para continuar con la extracción de lípidos por el método de Cunnif (sección V.I.III).

De las cepas del pre-cultivo se tomaron aproximadamente 2 ml para ser sembrados en matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml del medio de inducción, el cual presentó un déficit de nitrógeno, manejado como nutriente limitante para llevar a cabo la acumulación lipídica (Tabla VII, modificado de Kavadia *et al.*, 2001). Se incubó por 3 días a 30 °C con agitación constante y se observó la posible presencia de lípidos con la tinción Negro Sudán B del micelio tomado de medio de inducción.

**Tabla VII. Medio de inducción para la selección de hongos oleaginosos**

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Glucosa	30
Cloruro de amonio	0.08
Fosfato de sodio monobásico	7
Fosfato dibásico de sodio	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.5
Cloruro de calcio monohidratado	0.1
Cloruro férrico hexahidratado	0.008
Sulfato de zinc heptahidratado	0.001
Sulfato de cobre pentahidratado	0.0001
Nitrato de cobalto hidratado	0.0001
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.001

(Kavadia *et al.*, 2001)

Al final de la selección de los hongos oleaginosos, las cepas restantes fueron almacenadas en una solución de glicerol al 40%, a -20°C.

### **V.3 Caracterización e identificación de los hongos oleaginosos**

Al término de la selección de los microorganismos oleaginosos se llevó a cabo su caracterización morfológica e identificación molecular. Asimismo se precisaron las condiciones óptimas de crecimiento (pH y temperatura). Todo lo anterior, con el propósito de tener una base de referencia al momento de llevar a cabo el ensayo de fermentación en sustrato sólido para la producción de lípidos.

#### **V.3.1. Morfología de hongos oleaginosos**

El micelio fue observado a través del microscopio invertido Axiovert 200 Zeiss. Se tomaron fotografías con una cámara AxioCam HRc las cuales fueron procesadas con el software AxioVision versión 4.70, éstas sirvieron como referencia al utilizar los manuales de identificación taxonómica de Barnett y Hunter (1972) y Dugan (2006). Gracias a esta identificación se pudo conocer si alguno de estos hongos había sido reportado previamente como microorganismo oleaginoso.

#### **V.3.2. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento**

El procedimiento para evaluar la temperatura y pH óptimos fue a través de un diseño pentagonal el cual permitió analizar 2 factores a varios niveles con el menor número de ensayos (Box *et al.*, 1978). Éste diseño genera una superficie de respuesta a partir de la combinación de 4 niveles fijados para el factor pH y 5 niveles para el factor temperatura, así como el uso de 3 réplicas para definir el error experimental. En la Tabla VIII se muestran los factores y niveles evaluados.

**Tabla VIII. Diseño pentagonal para evaluar la temperatura y pH óptimos de crecimiento.**

No. de experimento	pH	Temperatura (°C)
8	5	32
1	6	28
6	5.6	21
7	4.4	21
2	4	28
4	5	26
5	5	26
3	5	26

(Box *et al.*, 1978)

Para cada experimento se utilizaron tubos tipo Falcon de 50 ml los cuales contenían 30 ml de PDC. El pH fue ajustado con NaOH/HCl 1N según lo indicado en el diseño experimental y se esterilizó por calor húmedo (15 lb/pulg<sup>2</sup> y 121 °C). Los tubos fueron inoculados con 1 ml de solución de esporas, ésta fue preparada al lavar con 15 ml de caldo papa dextrosa una caja Petri agar que contenía un cultivo de la cepa. Después de incubar por 5 días, se recuperó la biomasa de cada tubo por filtración (Whatman No. 1) y se secó por 12 h a 100 °C para determinar el peso seco. Los resultados de crecimiento fueron expresados en términos de mg/ml.

### V.3.3. Identificación molecular de los hongos oleaginosos

La regiones que mayormente se emplea para la identificación a nivel de especies es la que codifica el complejo ARN ribosomal (en hongos los genes 18S, 5.8S y 28S); éstos genes contienen dominios variables y regiones espaciadoras internas altamente variables. Las regiones utilizadas con mayor frecuencia para la identificación de hongos son los espaciadores de transcrito interno ITS (por sus siglas en inglés). Con el fin de corroborar la información proporcionada por el análisis de la secuencia del espaciador se secuenció el gen de la proteína  $\beta$ -tubulina (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2007; Nagao *et al.*, 2005; Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008; Gilgado *et al.*, 2005).

### V.3.3.1. Extracción de ADN

Los hongos oleaginosos seleccionados se inocularon en medio PDC contenidos en tubos tipo Falcon de 50 ml con los. Estos crecieron por 5 días a temperatura ambiente, la biomasa fue recuperada por filtración con filtros Whatman No. 1. El micelio fue puesto en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml y fue liofilizado por 24 h (liofilizador Free zone 2.5, Labconco). Después, el micelio liofilizado fue triturado con palillos estériles para extraer el ADN genómico con el kit de extracción DNeasy Plant Tissue Quiagen. Para corroborar la presencia de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tris-acetato-EDTA (TAE) y se colocó los pozos 3  $\mu$ l de muestra y 3  $\mu$ l de buffer de carga (azul de bromofenol/glicerol) y tiñendo con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml), el gel se corrió con un flujo eléctrico de 80 V por 40 min.

### V.3.3.2. Amplificación de la región ITS y $\beta$ -tubulina

Una vez probada la existencia del ADN genómico se amplificaron 4 secuencias por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Para amplificar la región se utilizaron los cebadores ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990). Para la amplificar un fragmento del gen de la proteína  $\beta$ -tubulina se emplearon los cebadores Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') y Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass y Donaldson, 1995). La amplificación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer, las muestras madre contuvieron: 12.5  $\mu$ L de Buffer *FailSafe*<sup>TM</sup> PCR 2X Premix E (Epicenter; InterScience), 0.5  $\mu$ l de cada cebador a 100 pM, 2  $\mu$ l de ADN y 0.125  $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa, el volumen se completó a 25  $\mu$ l con agua ultrapura. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 94 °C/2 min, 35 ciclos de desnaturalización 95 °C/1 min, alineación 55 °C/1 min, extensión a 72 °C/1.5 min, la extensión final fue a 72 °C/10 min (Redondo et al., 2009; Scott, 2004).

Los productos de la amplificación fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en Tris-acetato-EDTA (TAE) colocando en los pozos 4  $\mu$ l de muestra y 2  $\mu$ l

de buffer de carga (azul de bromofenol/glicerol) y tiñendo con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) con un flujo eléctrico de 80 V por 40 min, junto con las muestras se corrió un marcador de peso de 1000 pb (Fisher Labs).

La purificación de los productos de PCR se realizó con el kit QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen. Para confirmar la presencia de los fragmentos ITS y de la proteína  $\beta$ -tubulina se corrió un gel de agarosa al 1 % (bajo las mismas condiciones que el anterior).

#### **V.3.3.3. Secuenciación y análisis filogenético.**

Las fracciones amplificadas se enviaron a secuenciar a Eton Bioscience, Inc., San Diego California. Posteriormente se utilizaron varias secuencias ITS de aislados de diversas partes del mundo de la base de datos del National Center for Biotechnology Information con el fin de establecer las relaciones de las cepas obtenidas en este trabajo con ya reportadas. Para esto se utilizó el método el vecino más cercano o Neighbor-Joining con el programa MEGA (500 réplicas). Lo mismo se realizó para las secuencias  $\beta$ -tubulina (Capa y Cocconcelli, 2001).

## V.4. Producción de ácidos grasos mediante FSS

### V.4.1. Ensayo preliminar

Los ensayos previos a la fermentación en sustrato sólido del bagazo algal tuvieron como propósito conocer lo siguiente:

- ✓ Procedimiento para la inoculación del hongo filamentoso.
- ✓ Factibilidad de emplear el bagazo sin pre-tratamiento.

Para esto se realizó un ensayo inoculando con esporas o micelio. En el caso del residuo algal, los pre-tratamientos realizados fueron un lavado para eliminar el exceso de sales y una hidrólisis para incrementar la disponibilidad de carbohidratos (química y enzimática). En la Tabla IX se describe de forma detallada el procedimiento para cada caso. En todos los tratamientos, el pH fue cercano al establecido como óptimo para la cepa en cuestión (sección VI.3.2)

**Tabla IX. Ensayo preliminar para establecer condiciones de crecimiento fúngico sobre bagazo algal.**

<b>Tipo de inoculación</b>	<b>Tipo de pre-tratamiento</b>
Esporas ( $1.8 \cdot 10^6$ /g)	Sin lavar pH 4.9
Esporas ( $1 \cdot 10^7$ /g)	Sin lavar pH 7.8
Micelio (0.2 mg/g)	Sin lavar pH 5.08
Micelio (0.2 mg/g)	Lavado pH 5.12
Micelio (0.2 mg/g)	Enzimático pH 5.12 (7 U celulasa/g, 37°C/ 24 h)
Micelio (0.2 mg/g)	Químico pH 5.12 ( $H_2SO_4$ 1%, 110°C/210 min)

#### V.4.1.1 Preparación del inóculo esporal

El inóculo utilizado provino del lavado con agua estéril de monocultivos en cajas Petri con PDA de las cepas seleccionadas, esta solución fue denominada cultivo original. Para conocer el número de células presentes se realizaron diluciones de dicho cultivo de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-5}$ , estas fueron agitadas durante 15 s para luego realizar siembra masiva en superficie (0.1 ml) en medio agar. El número de células viables en el cultivo original fue calculado con la siguiente ecuación (Claus y Freeman, 2000):

$$\text{No. esporas del cultivo original} = \frac{\text{No. de colonias}}{(\text{dilución} \times \text{volumen sembrado})} \quad [1]$$

#### V.4.1.2 Preparación del micelio

Se tomaron 30 ml de medio PDC previamente esterilizados ( $15 \text{ lb/pulg}^2$  y  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ) en tubos Falcon, los cuales fueron inoculados con una pequeña cantidad de micelio proveniente de un monocultivo creciente en agar papa dextrosa. El medio fue incubado durante 5 días a temperatura ambiente. La biomasa fue recuperada por centrifugación a  $15,500 \text{ g}/15 \text{ min}$  y fue lavada con agua estéril para nuevamente ser centrifugada descartando el sobrenadante. El micelio fue molido bajo condiciones asépticas y el volumen fue ajustado a 25 ml con agua estéril para finalmente obtener una mezcla homogénea.

#### V.4.1.3 Preparación del residuo

La hidrólisis enzimática se realizó al agregar 7 unidades de celulasa de *Aspergillus niger* (SIGMA C-1184) por cada gramo de residuo seco, se incubó a  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  a pH 5.12 por 24 h siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la hidrólisis ácida, se agregó al bagazo una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1 % (relación 1:10) con un tiempo de hidrólisis de 210 min a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  (Aguilar-Rivera y Canizales-Leal, 2004).

Uno de los pre-tratamientos realizados al bagazo algal consistió en disminuir la concentración de sales presentes, mediante su lavado con agua destilada. Con esto se pretendió evitar posibles efectos inhibitorios al desarrollo fúngico.

El tamaño de partícula que presentó el residuo originalmente varió entre 5-30 mm, éste fue utilizado en los dos primeros experimentos, que corresponden a los tratamientos inoculados con esporas. Sin embargo, en los siguientes ensayos se realizó una molienda más fina hasta un tamaño de partícula de 0.5 mm para mejorar la homogenización.

#### **V.4.1.4 Procedimiento**

Para todos los tratamientos se emplearon 5 g del bagazo de *Gelidium robustum*. Una vez aplicado el pre-tratamiento al sustrato éste se esterilizó por calor húmedo (15 lb/pulg<sup>2</sup>, 121 °C/15 min) dentro de tubos de vidrio para posteriormente ser incubados. Cada tratamiento fue incubado a la temperatura y pH óptimos para cada cepa durante 5 días. Al término de este tiempo, se observó y cuantificó la biomasa fúngica mediante la determinación de proteína con el método de Biuret (sección V.1.4.).

#### **V.4.2. Cinética de producción de lípidos en bagazo algal**

Una vez identificado el pre-tratamiento con los mejores resultados en función del crecimiento fúngico, estas condiciones fueron utilizadas para realizar una cinética de producción de lípidos. El objetivo de la cinética fue determinar el punto máximo de acumulación lipídica bajo condiciones normales de crecimiento, es decir, sin agregar otra fuente de nutrientes.

##### **V.4.2.1 Procedimiento**

Se montaron 12 matraces Elermeyer con 75 ml de caldo papa dextrosa esterilizado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> y 121 °C. Se inoculó con 10 ml de una solución esporal la cual se incubó durante 7 días; dos de los matraces Elermeyer se utilizaron como blanco para cuantificar la biomasa generada y el porcentaje lipídico. De los matraces restantes se recuperó la biomasa por decantación para ser lavada con agua estéril y triturada bajo condiciones asépticas. Finalmente, se agregaron 5 g del residuo algal molido y esterilizado con la humedad y pH ajustado a 80 % y 50 % respectivamente con una solución de HCl 0.2 N. Cada 24 h se tomó un matraz para cuantificar la producción de lípidos, % de humedad y pH. Esto se realizó hasta completar 10 días de incubación.

### V.4.3. Fermentación en sustrato sólido

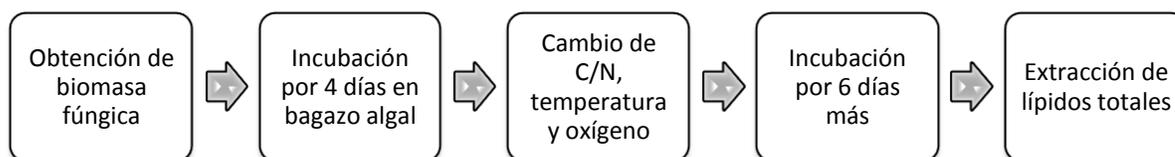
Se utilizó un diseño factorial completo para estudiar el efecto de la relación C/N, oxígeno, humedad y temperatura sobre la producción y perfil de ácidos grasos en una FSS de bagazo algal. La Tabla X muestra los niveles de los factores estudiados, cada uno de los cuales tuvieron dos réplicas.

**Tabla X. Diseño factorial completo para el ensayo de Fermentación en Sustrato Sólido.**

Exp.	C/N	Oxígeno	Humedad (%)	Temperatura (°C)
1,2	23.6	con	50	21
3,4	32.7	con	50	21
5,6	23.6	sin	50	21
7,8	32.7	sin	50	21
9,10	23.6	con	80	21
11,12	32.7	con	80	21
13,14	23.6	sin	80	21
15,16	32.7	sin	80	21
17,18	23.6	con	50	26
19,20	32.7	con	50	26
21,22	23.6	sin	50	26
23,24	32.7	sin	50	26
25,26	23.6	con	80	26
27,28	32.7	con	80	26
29,30	23.6	sin	80	26
31,32	32.7	sin	80	26

La Figura 5 muestra la serie de pasos realizados para montar el ensayo de FSS. Para la obtención del inóculo, se usaron 38 matraces Elermeyer los cuales contenían 75 ml de caldo papa dextrosa esterilizado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> y 121 °C. Estos fueron inoculados con  $7 \times 10^8$  esporas e incubados por 7 días/21 °C. La biomasa generada se recuperó por decantación, se lavó con agua estéril y se trituró bajo condiciones asépticas. Después, a cada matraz se le agregaron 5 g de bagazo molido y esterilizado a pH 4.5 y con la humedad ajustada según el diseño factorial. Estos matraces fueron incubados durante 4 días a 21°C, después de este

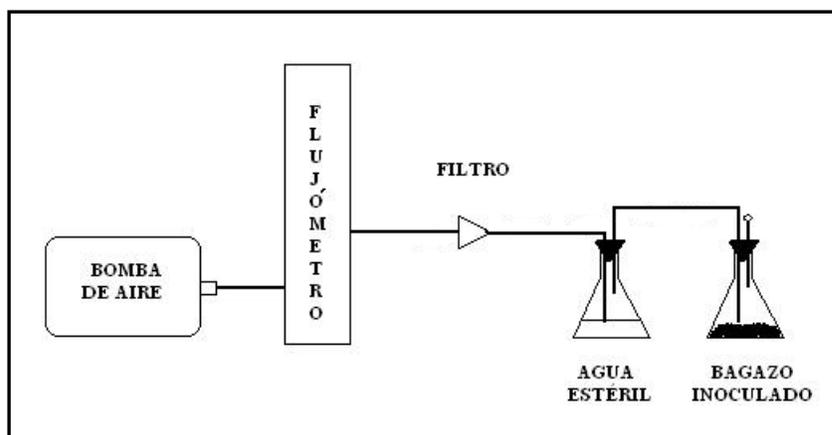
tiempo se procedió a cambiar las condiciones de oxigenación, relación C/N y temperatura según el diseño factorial mostrado en la Tabla X.



**Figura 5. Esquematación del ensayo de FSS de bagazo algal para la producción de lípidos.**

La relación C/N se modificó en todos los casos con sacarosa estéril a la misma humedad y pH que el bagazo; es decir, para obtener una humedad del 50%, el azúcar fue disuelta en HCl 0.27 N, y para una humedad del 80% se disolvió en ácido a 0.1 N para obtener en ambos casos un pH entre 4.5 y 4.6. Los matraces que debían ser incubados con la menor relación C/N, fueron suplementados con 2.5 g de sacarosa estéril, mientras que los matraces con la mayor relación C/N fueron suplementados con 5 g de sacarosa estéril.

Para los matraces que debían ser aireados de acuerdo al diseño factorial, se adicionó aire mediante una bomba a un flujo continuo de 50 mil/min que fue distribuido en 16 matraces (flujómetro Gilmont Instruments); el aire fue filtrado (ACRO<sup>®</sup> 50 0.2  $\mu$ m Gelman Laboratory) y humidificado en agua estéril, antes de ser suministrado a los matraces (Figura 6). Después, los matraces fueron incubados a la temperatura que indicó el diseño factorial durante 6 días más, para finalmente extraer los lípidos por el método de Bligh y Dyer (Sección V.1.3)



**Figura 6 Montaje del ensayo de Fermentación en Sustrato Sólido.**

Para determinar si los factores estudiados y/o sus interacciones presentaban un efecto significativo sobre la producción lipídica, los valores de lípidos generados  $\text{mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$  (miligramos de lípidos  $\text{lip}$ /gramos de sustrato seco  $\text{sc}$ ) se examinó usando un análisis de varianza (ANOVA) con el programa Design-Expert 8.0.2 Trial con un nivel de significancia del 0.05, para determinar si los factores estudiados y/o sus interacciones presentaban un efecto significativo sobre la producción lipídica.

#### **V.4.4. Perfil de metilésteres de ácidos grasos**

Para realizar el análisis de los ácidos grasos generados fue necesario la transesterificación de las muestras lipídicas extraídas, para ellos se agregaron 20 ml de metanol, 5ml de agua y dos hojuelas de NaOH en cada muestra. Se calentó a sequedad a 80 °C y después se agregaron 20 ml de hexano para después recuperar el precipitado. A éste se agregaron 30 ml de metanol y 3 ml de HCl concentrado, esta solución se calentó a sequedad a 80 °C para después agregar 20 ml de hexano. La muestra se transvasó a un embudo de separación, al cual se le agregaron 20 ml de agua destilada mezclando vigorosamente. Se realizó el enjuague dos veces más. La fase superior que contenía a los lípidos) fue recuperada y evaporada a 60 °C hasta sequedad.

Finalmente, se agregaron 2 mL de hexano a las muestras esterificadas y se inyectó 1  $\mu$ l de ésta solución al cromatógrafo de gases modelo Varian CP-3380 equipado con un detector de ionización de flama (FID); el inyector y detector se mantuvieron a 250°C y a 270 °C, respectivamente. La temperatura de la columna fue programada de 120 a 190 °C con un incremento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ . La columna utilizada fue de sílica Omegawax<sup>TM</sup> 250 de 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m.

Los picos de los cromatogramas fueron identificados al comparar su tiempo de retención con el tiempo de retención de una solución estándar (Tabla XI) de metilésteres de ácidos grasos que contenía los siguientes ácidos:

**Tabla XI. Estándares de metilésteres de ácidos grasos utilizados en la Cromatografía de gases.**

<b>Metilester de ácido graso</b>	<b>Tiempo de retención (<math>\pm 0.2</math> min)</b>
Mirístico	7.662
Miristoléico	8.000
Palmítico	9.784
Palmitoléico	10.100
Esteárico	12.310
Oléico	12.530
Linoléico	13.086
Araquídico	14.951
Behénico	17.770

El porcentaje de los metilésteres de ácidos grasos fue calculado al tomar como 100%, el área total de los 9 picos generados por el estándar (Kavadia *et al.*, 2001). Se graficaron los tratamientos agrupando por temperatura de incubación menor y mayor, así como los tratamientos con o sin aireación esto con el fin de observar la tendencia del perfil lipídico bajo estos factores.

## Capítulo III

---

### Resultados y Discusión

---

En general, se plantearon 4 actividades para cumplir con los objetivos establecidos en el trabajo de investigación:

1. Caracterización del bagazo algal: evaluación fisicoquímica del sustrato a fermentar en el ensayo de acumulación lipídica.
2. Aislamiento y selección de hongos oleaginosos: se muestrearon diferentes fuentes marinas y terrestres de las cuales se aislaron hongos filamentosos que posteriormente fueron seleccionados en base a su capacidad de acumulación de lípidos.
3. Caracterización e identificación de los hongos oleaginosos: se evaluó la temperatura y pH óptimo para el crecimiento fúngico, así como su constante de velocidad de crecimiento instantáneo. Se identificó el género y especie de las cepas fúngicas seleccionadas, mediante biología molecular.
4. Producción de ácidos grasos mediante fermentación en sustrato sólido: se realizaron ensayos de pre-tratamiento al bagazo algal, la cinética de producción de lípidos sobre el bagazo y un ensayo de fermentación en sustrato sólido estudiando el efecto de la humedad, oxígeno, relación C/N y temperatura sobre la producción lipídica.

## VI.1 Caracterización del sustrato

Se solicitaron muestras de bagazo de *Gelidium robustum* proveniente de la extracción de agar llevada a cabo por la empresa AGARMEX. Las colectas se realizaron entre los meses de agosto de 2009 a marzo de 2010. La composición fisicoquímica centesimal se presenta en la Tabla XII.

**Tabla XII. Caracterización del bagazo de *Gelidium sp.***

<b>Parámetro</b>	<b><i>Gelidium robustum</i> (este trabajo)</b>	<b><i>Gelidium sesquipedale</i> (Ennouali <i>et al.</i>, 2006)</b>
Humedad (%)	92.01	5.5 - 9.9
Cenizas (% , bs)	26.05	7.1 - 11.7
Materia orgánica volátil (% , bs)	73.9	87.4
Carbohidratos totales (% ,bs)	44.3	54.95 - 49.10
Azúcares reductores (% , bs)	0.047	nr
Lípidos (% ,bs)	0.467	0.85 - 0.60
Proteína(% ,bs)	20.24	31.6 - 30
Nitrógeno total (% ,bs)	1.243	3.61 - 4.01
Calcio(mg/L)	168.4	180
Magnesio(mg/L)	69.4	18.8

Nota: bs, base seca; nr, no reportado.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del bagazo de *Gelidium robustum* indicaron que el contenido de humedad después de la extracción de hidrosolubles fue elevado, lo que se debe a las características propias del proceso de extracción en la cual se utiliza una solución alcalina/ácida. El contenido de cenizas fue elevado (26 %). Se encontró una alta proporción de Ca y Mg, los cuales funcionan como activadores enzimáticos (Kendrick, 2000). Por otro lado, el contenido de materia orgánica volátil fue moderado y representa en gran medida los componentes que podrían ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno; de acuerdo a su concentración se detectaron más carbohidratos que proteínas y lípidos. En la caracterización del bagazo algal no se identificó el tipo de carbohidratos presentes; sin embargo, se sabe que entre los carbohidratos que pueden estar presentes están la celulosa, laminaran y xilano (Otto y Towle, 1995). Los resultados de la

composición del bagazo de *G. robustum* fueron similares a los reportados previamente por Ennouli *et al.* (2006), quien caracterizó bagazo de *G. sesquipedale*, obtenido del proceso de extracción de agar. Estas similitudes probablemente están asociadas a que ambas especies pertenecen al mismo género (Guzmán del Proó, 1969).

La caracterización del bagazo algal, también permitió evaluar los efectos del proceso de extracción de agar sobre la composición de éste. En un estudio realizado en la Costa Pacífica de Baja California por Serviere-Zaragoza y colaboradores (2001, 2002) se reportó la composición química de *G. robustum* en forma fresca. El contenido de proteínas y cenizas estuvieron en un rango cercano a los obtenidos en este trabajo (18.1 - 20.9% y 7.1 - 19.9%, respectivamente). Por lo que, podemos inferir que el proceso de extracción de polisacáridos no afecta de manera importante estos componentes que podrán servir como fuente de carbono, nitrógeno, así como minerales durante el crecimiento microbiano.

Se calculó que la relación C/N en el bagazo algal fue de 14.39, el cual está reportado como un balance adecuado para el desarrollo fúngico. Por tanto, este residuo industrial se considera una matriz viable para ser utilizada como sustrato en un proceso de fermentación debido a que posee los nutrientes esenciales (carbono, nitrógeno, minerales). Es importante destacar, que la relación C/N reportada puede presentar variaciones debido a modificaciones en el proceso de extracción de agar, época de cosecha del alga, cambios del sitio de cosecha o zona geográfica y por variaciones en los nutrientes del agua de mar en donde se desarrolla el algal, entre otros (Jesen y Haug, 1956).

## VI.2. Aislamiento y selección de hongos oleaginosos

### VI.2.1. Aislamiento y mantenimiento de microorganismos

El periodo de colecta de las muestras para el aislamiento de microorganismos se ubico entre julio-septiembre de 2009, en total se obtuvieron 17 cepas de hongos filamentosos. La Tabla XIII muestra los sitios de muestreo y el número de cepas obtenidas en cada uno.

**Tabla XIII. Hongos filamentosos aislados de fuentes marinas y terrestres de Baja California.**

<b>Fuente de aislamiento</b>	<b>No. de cepas aisladas</b>	<b>Designación</b>
<b>Fuente Marina</b>		
Lodo en canal del Estero	3	M1, M2, M3
Lama en canal del Estero	3	M4, M5, M6
Fermentación espontánea de <i>Macrocystis sp.</i>	3	M7, M8, M9
Sedimento marino de la zona intermarial	3	M10, M11, M12
<b>Ambiente terrestre</b>		
Ambiente casa	4	T1, T2, T3, T4
Laboratorio	1	T5

El canal del Estero de Punta Banda fue elegido como lugar de colecta debido a su fácil acceso y, a que se encontraron charcos de agua estancada con evidente proliferación de microorganismos. De este sitio, se aislaron 6 cepas de hongos, 3 cepas provenientes de muestras de lodo (M1, M2 y M3) y 3 cepas provenientes de lama (M4, M5 y M6).

La playa Agua Caliente se encuentra en una zona de varias fallas tectónicas asociadas al sistema Agua Blanca que cruzan la Península (Rockwell *et al.*, 1989). Por lo que, es una zona con aguas termales (temperatura promedio 45°C) cercanas a la línea de costa, siendo éste el principal atractivo para llevar a cabo la colecta del sedimento en la zona intermarial; se esperaba aislar hongos capaces de crecer a temperaturas por arriba del

promedio de otros hongos. De este sitio, se lograron aislar 3 cepas de hongos filamentosos (M10, M11 y M12).

Fueron de gran interés 3 cepas fúngicas aisladas de una fermentación espontánea de la alga parda *Macrocystis* sp. (M7, M8 y M9), ya que al crecer sobre una alga daba la pauta para suponer que crecerían de igual forma sobre el residuo industrial de *Gelidium robustum*.

El fácil crecimiento y detección de hongos sobre fruta, comestibles o aire permitió aislar las cepas T1 (hongo creciendo sobre residuos de comida), T2 (moho aislado del aire de casa), T3 (moho sobre cáscara de melón), T4 (hongo sobre queso comercial marca Philadelphia a 4°C) y T5 (hongo aislado del aire de laboratorio de Biotecnología Ambiental y Biocombustibles, CICESE). Esto permitió tener una mayor diversidad y cantidad de cepas de hongos, para su posterior selección como cepas oleaginosas.

La formación de monocultivos se realizó por la separación de las colonias al diferenciar sus características macroscópicas, es decir, morfología, pigmentación y textura (Figura 7).

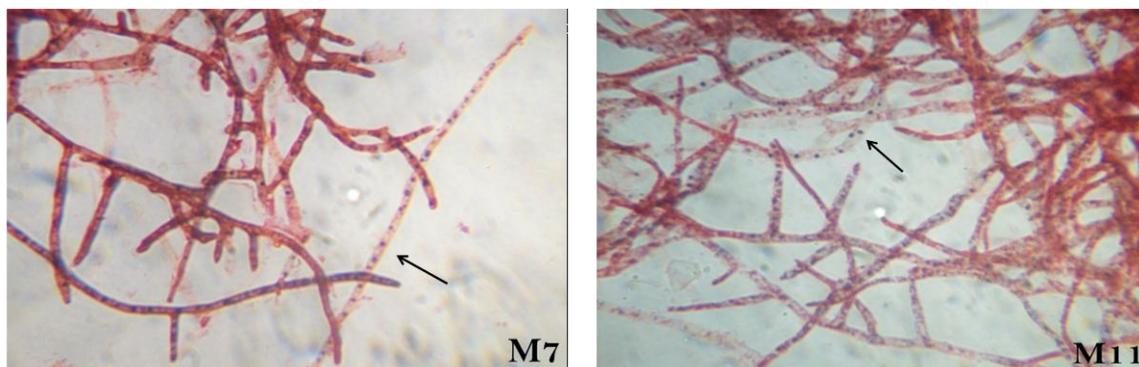


**Figura 7.** Ejemplo de monocultivos obtenidos de hongos filamentosos aislados de Baja California. T1: de casa, T5: de laboratorio, M12: de sedimento marino.

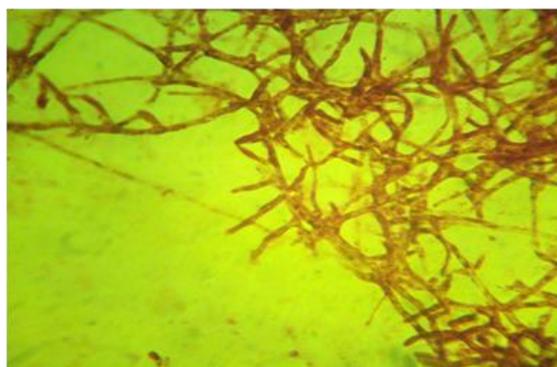
### **VI.2.2. Selección de hongos filamentosos oleaginosos**

De las 17 cepas aisladas de hongos filamentosos que fueron sometidas a un ensayo de acumulación de lípidos y a las que se observó después de 3 días de incubación en cada medio, y de la observación al microscopio de contraste se encontró una tinción positiva para 5 cepas: M2 y M3 (de lodo de Estero), M7 (de fermentación espontánea), M11 (de playa Agua Caliente) y T4 (de queso comercial), dichas acumulaciones se presentaron tanto en la biomasa del pre-cultivo como en el medio de Inducción (Figura 8). Las 12 cepas restantes no presentaron acumulaciones lipídicas evidentes bajo las condiciones de cultivo ensayadas (Figura 9).

Las cepas positivas M2, M3, M7 y M11 aisladas de fuentes marinas, pueden ser clasificadas como hongos marinos facultativos puesto que tuvieron la capacidad de desarrollarse tanto en agua dulce como en salada (Karleskint *et al.*, 2010)

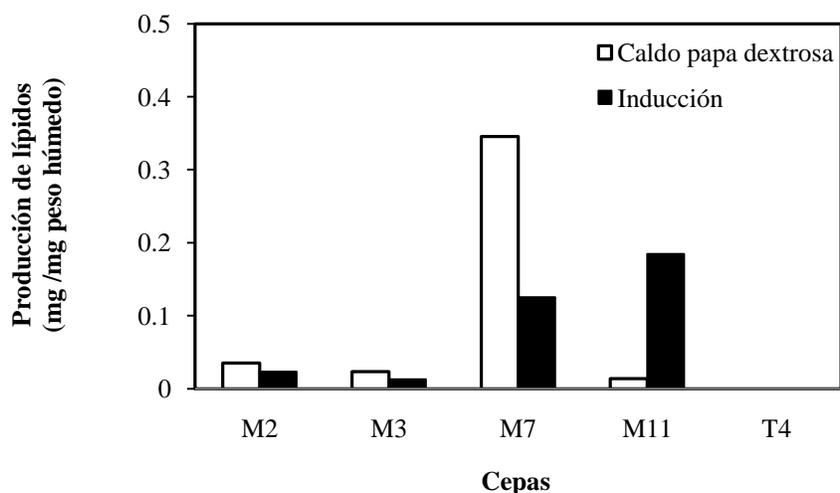


**Figura 8. Tinción en micelio positiva para la producción de lípidos con negro Sudán B en contraste con safranina (100x). Cepa M7 al tercer día de incubación en medio caldo papa dextrosa; M11 al tercer día de incubación en medio de Inducción**



**Figura 9. Tinción en micelio positiva para la producción de lípidos con negro Sudán B en contraste con safranina (100x). Cepa T1 al tercer día de incubación en medio caldo papa dextrosa.**

Al evaluar cuantitativamente la producción lipídica, se observó que las cepas M7 y M1 presentaron incrementos considerables a los 3 días de incubación en PDC y en el medio de Inducción, respectivamente (Figura 10). La cepa M7 presentó la mayor acumulación lipídica con 0.3456 mg/mg peso húmedo al tercer día de incubación, mientras que en el medio de Inducción, la cepa M11 fue la mayor acumuladora de lípidos obteniendo 0.1845 mg/mg peso húmedo al tercer día de incubación.



**Figura 10. Producción de lípidos en el ensayo de selección de hongos oleaginosos. Incubación por 3 días en caldo papa dextrosa. Incubación por tres días en medio de Inducción.**

Por otro lado, las cepas M2 y M3 presentaron un buen crecimiento en ambos medios de cultivo, no obstante la producción lipídica fue menor en comparación con las cepas M7 y M11 (Tabla XIV). En el caso de la cepa T4, su crecimiento fue muy lento, por lo que la producción lipídica fue imperceptible con el método de extracción utilizado para ambos medios de cultivo y por el tiempo de incubación empleado (Tabla XIV).

**Tabla XIV. Producción de biomasa y lípidos en PDC y de Inducción.**

Cepa	Caldo PD		Medio de inducción	
	Biomasa (mg/mL)	Lípidos (mg/mg <sub>ph</sub> )	Biomasa (mg/mL)	Lípidos (mg/mg <sub>ph</sub> )
<b>M2</b>	28.44	0.0352	42.74	0.0234
<b>M3</b>	42.76	0.0234	76.78	0.0130
<b>M7</b>	26.04	0.3456	23.92	0.1254
<b>M11</b>	73.82	0.0135	27.1	0.1845
	1.92	0.0000	0.08	0.0000

ph: peso húmedo

En base en los resultados obtenidos, M7 y M11 fueron seleccionadas como cepas de trabajo debido a que presentaron las mayores acumulaciones lipídicas. Es importante hacer notar que las cepas fúngicas que resultaron positivas a la tinción de lípidos con Negro Sudán B fueron de origen marino (a excepción de la cepa T4).

Los hongos oleaginosos mayormente son de la división Zygomycota. Estos han sido aislados de suelos de bosques coníferas como *Mortierella isabellina* (Mueller, 2004; Saksena, 1966) y suelos de Pino Negral como *M. alpina* (Luppi, 1960), de raíces de plantas y material vegetal como *M. ramanianna* (Howell, 1972), y plantíos de cereales como *Cunninghamella bainieri* y *C. echinulata*. *Rhizopus spp.* también ha sido reportado como oleaginoso, y se localiza comúnmente en material en descomposición con baja actividad de agua. Otros géneros, que también han sido reportados como oleaginosos son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Pitt1981; Pitt y Hocking, 1997). Sin embargo, los microorganismos oleaginosos aislados de fuentes marinas sólo corresponden a procariotes, y hasta donde fue posible hacer la revisión bibliográfica, no se encontraron reportes de hongos oleaginosos aislados de fuentes marinas. Por lo tanto, las cepas fúngicas aisladas en este trabajo adquieren importancia puesto que podrían tener características interesantes para su uso industrial.

### **VI.3. Caracterización e identificación de los hongos oleaginosos**

Una vez que se seleccionaron las cepas M7 y M11, como hongos productores de lípidos bajo las condiciones ensayadas, se procedió a realizar su caracterización mediante su observación morfológica macroscópica, microscópica y su identificación molecular. Asimismo, se evaluaron las condiciones de temperatura y pH óptimas para su crecimiento.

#### **VI.3.1. Morfología de los hongos oleaginosos.**

Se tomaron fotografías con la cámara AxionCam HRc, las cuales dieron pauta para realizar la identificación de las cepas M7 y M11 a nivel de género. Con ayuda de las claves de identificación de Barnett y Hunter (1972) y Dugan (2006) se reconoció que ambas cepas pertenecen al género de *Penicillium spp.*, cuya clasificación taxonómica fue la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Eufungi

Orden: Eurotiales

Familia: Trichomaceae

Género: *Penicillium*

Las colonias de *Penicillium* spp., M7 y M11, se caracterizaron por tener un rápido crecimiento, colonias sin relieves con aspecto filamentososo y textura algodonosa. Inicialmente, las colonias fueron de color blanco las cuales cambiaron gradualmente a verde olivo (Figura 11). El reverso de la colonia fue usualmente pálido o amarillento. Todas estas características morfológicas coinciden con lo previamente reportado para el género de *Penicillium* spp. (Larone, 1995).



**Figura 11. Colonias formadas por la cepa M11 en medio agar papa dextrosa.**

A nivel microscópico, se observó que ambas cepas presentaron hifas septadas y hialinas (St-Germain y Summerbell, 1996), los conidióforos fueron ramificados y sobre estos se observaron las métulas, fiálides y conidios (Figura 12). La organización de las

fiálides sobre la punta de los conidióforos fue similar a un pincel (de allí el nombre de “*Penicillium*”). Los conidios fueron globosos, unicelulares y dispuestos sobre las fiálides.



**Figura 12.** Fotografías tomadas para la identificación a nivel Género a) cepa M7; b) cepa M11 (100x).

*Penicillium* spp. es el género más común de todos los mohos, con más de 200 especies reportadas alrededor de todo el mundo, se encuentra en suelo, composta, alimentos, sustancias orgánicas entre otros, por lo que su presencia en ambientes marinos no fue inesperada (Peberdy, 1937).

El género *Penicillium* además de estar ampliamente distribuido en el ambiente, es una cepa microbiana común en bioprocesos orientados a la producción de metabolitos de interés. Tal es el caso de la producción de  $\alpha$ -amilasa a partir de la fermentación de hoja de mazorca de maíz, paja de centeno, paja de trigo o salvado de trigo (Bilal y Figen, 2007); producción de citrato que es utilizado en la lixiviación de metales pesados de desechos industriales y minerales (Gallmetzeer y Burgstaller, 2001); producción de proteínas con actividad antifúngica tales como PgAFP y PgChP; producción de enzimas como xilanasas, amilasas, celulasas, glucanasas, lipasas, pectinasas, proteasas y tanasas (Acosta *et al.*, 2009; Allah *et al.*, 2008; Banu *et al.*, 2010; Nuero y Reyes, 2002.). Este hongo también ha sido utilizado en el tratamiento de aguas residuales, para la disminución de la concentración de nutrientes como fósforo y nitrógeno (Thanh y Simard, 1973).

El proceso más conocido y exitoso en donde se explota a *Penicillium* spp., es la producción de penicilina donde se ha logrado aumentar el rendimiento en un orden de 1000

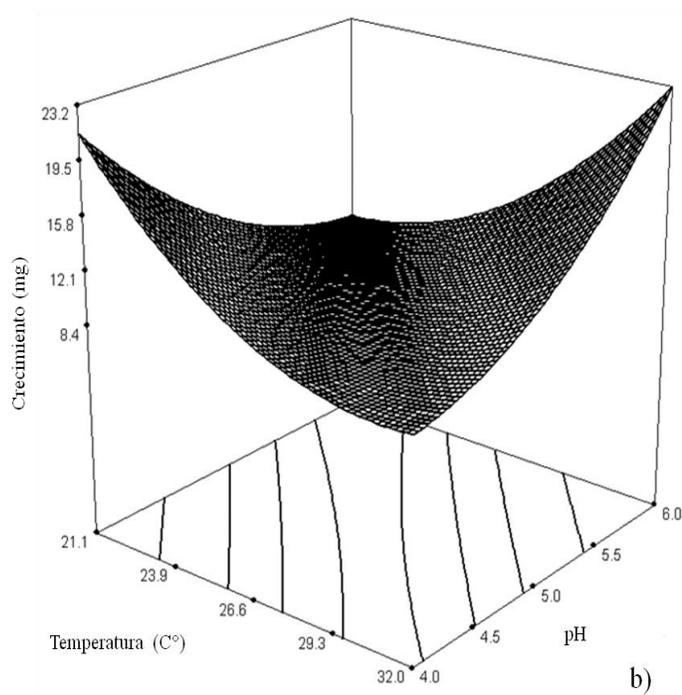
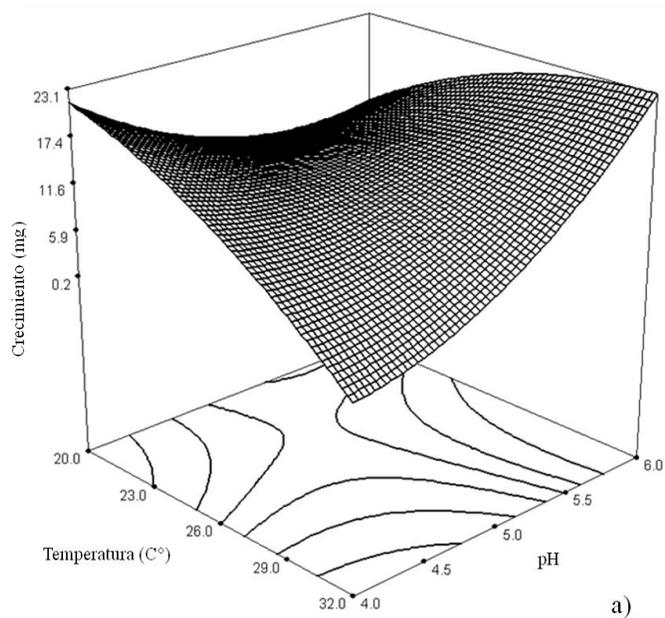
veces en comparación con la cepa nativa, al emplear una cepa mutante de *Penicillium chrysogenum* (Veerapagu *et al*, 2008).

### **VI.3.2. Evaluación de condiciones óptimas de crecimiento.**

Una vez que se obtuvieron las cepas microbianas oleaginosas, uno de los objetivos fue determinar las condiciones de temperatura y pH que favorecen su crecimiento, ya que esto podría estar relacionado al menos en una primera fase, con la producción de lípidos. Es decir, se busca una alta densidad celular, que después sería sometida a estrés para la producción de lípidos. De esta manera, las cepas M7 y M11 crecieron en PDC bajo diferentes rangos de temperatura (21, 26, 28, 32 °C) y pH (4.0, 4.4, 5.0, 5.6, 6.0) según un diseño pentagonal para evaluar las condiciones óptimas de crecimiento. Los resultados fueron analizados como un diseño pentagonal, realizando un análisis de varianza con un nivel de confianza mínimo del 95 % (Tabla A I y II del Anexo)

Para ambas cepas, se encontró que el crecimiento fúngico fue dependiente de la temperatura de incubación y el pH inicial del medio ( $p < 0.05$ , Figura 13a y 13b). Para la cepa M7 (Figura 13a), se observaron dos máximos localizados en los extremos, lo que corresponde a un pH 4.0 y una temperatura de 20 °C, y otro a un pH de 6.0 y 32 °C. Es importante hacer notar que en general, el hongo presentó un buen crecimiento (0.23 - 0.70 mg/ml) en todo el intervalo estudiado, excepto en pH cercanos a 4.0 combinados con temperaturas elevadas (alrededor de 32 °C).

Para la cepa M11, se observó un comportamiento similar (Figura 13b) ya que se encontraron dos máximos de crecimiento; uno a pH 4.0 y 21 °C, y otro a pH 6.0 y 32 °C. Al igual que la cepa M7, se observó un mínimo en el crecimiento fúngico bajo los menores pH combinados con las mayores temperaturas de incubación.



**Figura 13. Efecto de la temperatura de incubación y pH inicial sobre el crecimiento fúngico.**  
a) cepa M7, b) cepa M11.

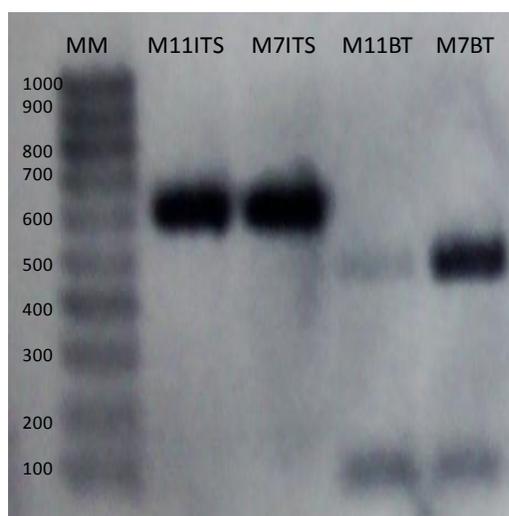
De acuerdo con el análisis de la Figura 13, el comportamiento del crecimiento fúngico de ambas cepas en función de la temperatura y pH fue similar. Esto se debe en gran medida, a que ambas cepas pertenecen al género *Penicillium* con un sitio de aislamiento similar. Se ha reportado que este género, tiene una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre los 20 °C hasta 30 °C, aunque puede presentar desarrollo en un rango de temperatura mucho mayor (desde -2 °C hasta 42 °C) (Corry 1987; Kavanagh, 2005; Lacey 1989. Por ejemplo, Muller y colaboradores (1990) determinaron como temperaturas óptimas de crecimiento para varias cepas del género de *Penicillium spp.* aisladas de trigo y maíz seco en un rango entre 10 °C hasta 27 °C creciendo sobre agar extracto de malta. Otras especies como *P. roqueforti* y *P. digitatum* mostraron un máximo crecimiento a una temperatura alrededor de los 20 °C (Kassim y Shamsher, 1996). También, Ji y colaboradores (1997) reportaron una temperatura de crecimiento óptima para *P. citreoviride* y *P. citrinum* alrededor de los 30 °C sobre MiGao (pastel de arroz). En este trabajo, el rango de temperatura óptima para el desarrollo fúngico de las especies de *Penicillium sp.* fue entre los 20 °C a 32 °C, teniendo una relación directa con el pH del medio.

El pH óptimo para el crecimiento de hongos filamentosos es entre 4.0 a 6.0. Las cepas pertenecientes al Género *Penicillium* son tolerantes tanto a pH ácidos como neutros. En este trabajo, ambas cepas mostraron un máximo de crecimiento tanto a pH 4.0 como de 6.0, lo que coincide con lo previamente reportado por otros autores (Fred y Marvin, 1953; Wheeler *et al.*, 1991; Zyska, 1997).

### VI.3.3. Identificación molecular

Para la identificación a nivel molecular de las cepas M7 y M11, se utilizaron los oligonucleótidos universales específicos para hongos que amplifican la región del espaciador de transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés). Para corroborar la información generada por dichos cebadores se utilizaron paralelamente los cebadores que amplifican la región de la proteína  $\beta$ -tubulina.

La amplificación de la región ITS del rADN se llevó a cabo con los cebadores ITS 4 y 5, dando como resultado la amplificación de una secuencia de aproximadamente 500 pb para ambas cepas. Para la región que codifica la proteína  $\beta$ -tubulina del rADN se utilizaron los cebadores Bt2a y Bt2b amplificando una secuencias de aproximadamente 600 pb, tanto para M7 como para M11 (Figura 14). El tamaño de los productos concuerda con lo reportado por varios autores (White *et al.*, 1990; Glass y Donaldson, 1995).



**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la región ITS y  $\beta$ -tubulina de las cepas M7 y M11. MM: Marcador molecular (1000 pb), ITS: amplificación con cebadores ITS4 e ITS5, BT: amplificación con cebadores Bt2a y Bt2b.**

Se tomaron secuencias generadas por la amplificación de la región ITS y  $\beta$ -tubulina de la base de datos del NCBI para establecer la relación de nuestras cepas con aquellas aisladas en otras partes del mundo. Se empleó el método del vecino más cercano o Neighbor-joining para la construcción de los árboles filogenéticos consenso con el programa MEGA (500 réplicas) (Saitou y Nei, 1987).

La Figura 15 muestra el análisis de la región ITS para la cepa M7 (H1ITS, nombre dentro del árbol), la cual se agrupó con especies de *Penicillium chrysogenum*. Por su parte, la cepa M11 (ACITS, nombre dentro del árbol) se agrupó tanto con especies pertenecientes a *P. citreonigrum* como *P. toxicarium*.

Para apoyar la información se incluyó el análisis de las secuencias de la  $\beta$ -tubulina. Como se puede observar en la Figura 16, nuevamente la cepa M7 (H1BETATUBULINA, nombre dentro del árbol) se agrupó con especies *P. chrysogenum*, mientras que la cepa M11 (ACBETATUBULINA, nombre dentro del árbol) se agrupó con especies de *P. toxicarium*. En base a estos resultados M7 fue identificado como *P. chrysogenum* y el aislado M11 como *P. toxicarium*.

*P. chrysogenum* es un hongo distribuido ampliamente, es el hongo productor de penicilina más conocido y también produce roquefortina C, meleagrina y crisogina (alcaloides), y  $\alpha$ -amilasas. Se encuentra comúnmente en edificios húmedos, material de construcción y papel tapiz. También se han descrito casos de colonización en vías respiratorias. Algunas de las enfermedades relacionadas a este microorganismo son: la otomicosis, endoftalmitis, queratitis, infecciones cutáneas, esofagitis, neumonías, entre otros (Pitt, 1981).

Por su parte, *P. toxicarium* es una especie productora de citrioviridina, una micotoxina relacionada con la enfermedad de beriberi. Algunas cepas han sido aisladas de arroz (Uraguchi, 1969)

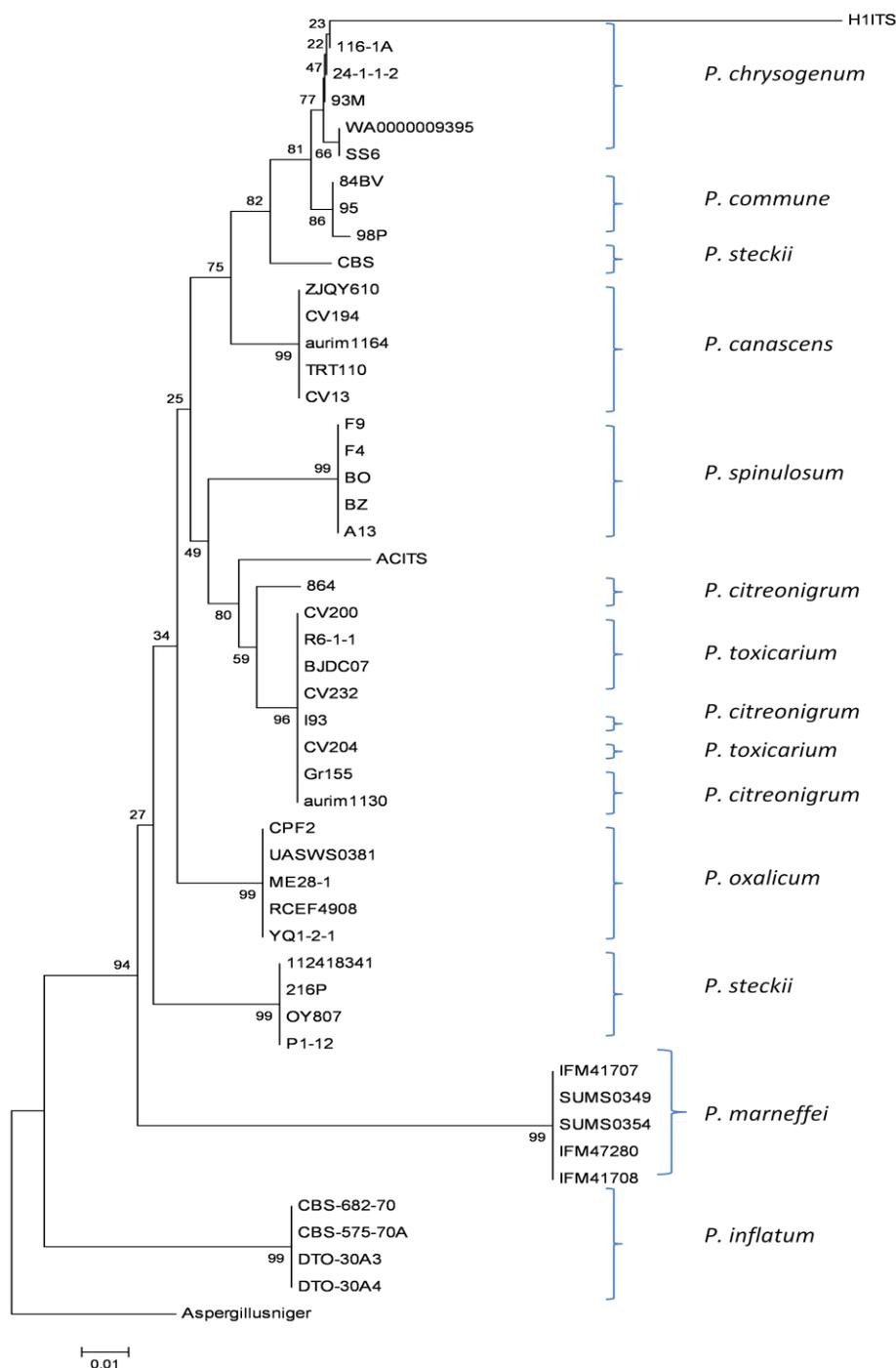


Figura 15. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias ITS de las cepas analizadas en este estudio y de otras cepas aisladas en diferentes partes del mundo usando el método Neighbor-joining en MEGA. M7=H1ITS, M11=ACITS.

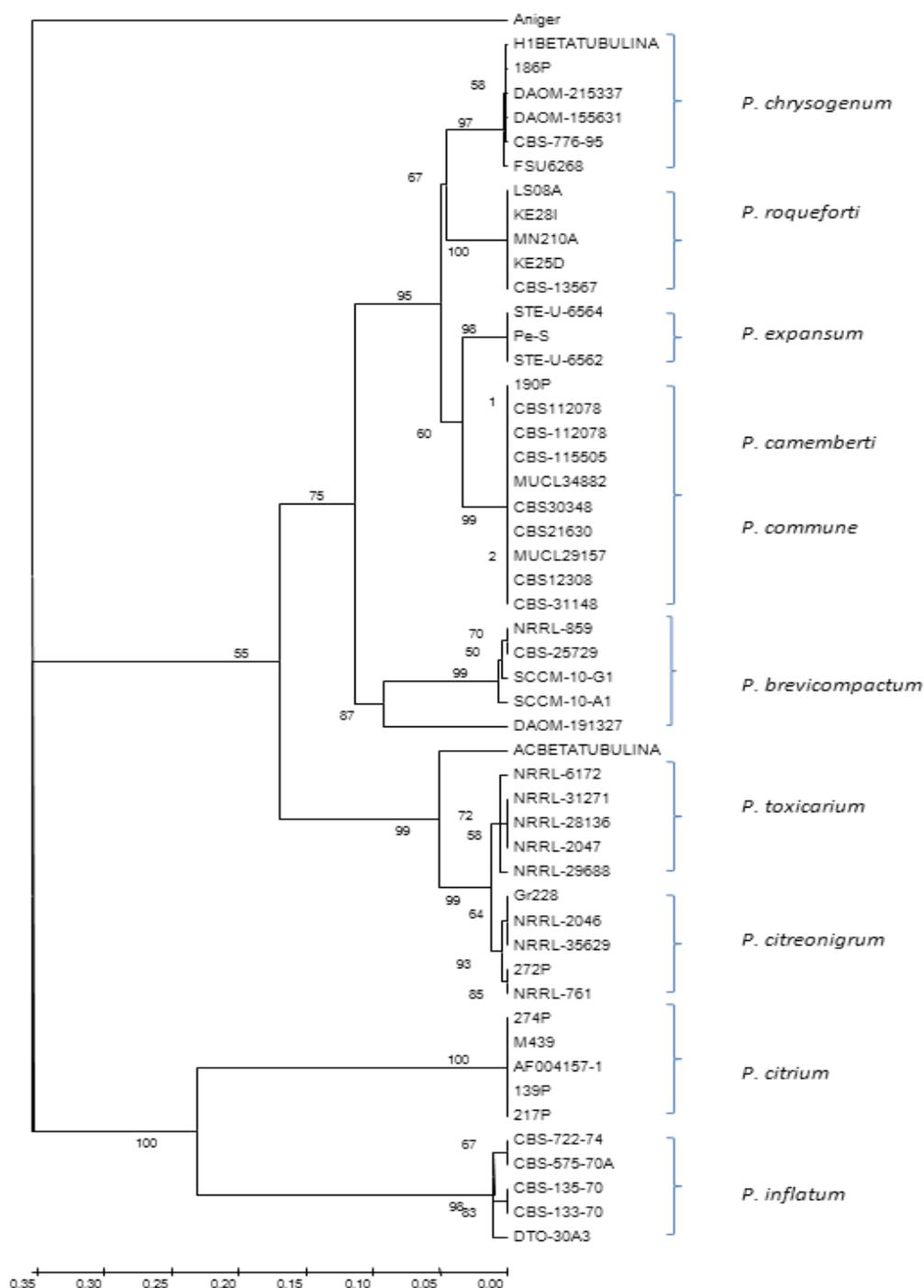


Figura 16. Árbol filogenético consenso generado a partir del análisis de las secuencias  $\beta$ -tubulina de las cepas analizadas en este estudio y de otras cepas aisladas en diferentes partes del mundo usando el método Neighbor-joining en MEGA. M7=H1BETATUNULINA, M11=ACBETATUBULINA

## **VI.4. Producción de ácidos grasos mediante FSS**

Para llevar a cabo el ensayo de FSS fue necesario considerar si el bagazo algal necesitaba un tratamiento para que el microorganismo pudiera aprovechar los nutrientes presentes en él, así como la forma de inoculación adecuada del hongo para la colonización del sustrato. Para precisar estos detalles fue necesario llevar a cabo un ensayo preliminar con el fin de optimizar la FSS para la producción de ácidos grasos.

### **VI.4.1. Ensayo preliminar**

El crecimiento de las cepas seleccionadas sobre bagazo algal requería establecer algunas condiciones antes de montar el ensayo de FSS para la producción de lípidos. Para esto se realizó un pre-ensayo para verificar si las cepas eran capaces de crecer sobre el bagazo sin ningún tipo de pre-tratamiento, y además si la forma de inoculación tenía algún efecto sobre la velocidad de crecimiento fúngico. Una vez establecidas estas condiciones, fue necesario conocer el tiempo aproximado en el cuál los lípidos fúngicos debían ser cosechados, ya que un tiempo mayor supone el probable consumo de los lípidos acumulados y/o la generación de esporas. Para esto, se caracterizó producción de lípidos de 10 días de incubación.

En la Tabla XV se muestran los resultados del pre-ensayo para el crecimiento sobre el bagazo para las cepas *P. chrysogenum* y *P. toxicarium* con diferentes pre-tratamientos. Primeramente, se observó que en los tratamientos 1 y 2 (inoculado con esporas) no se presentó crecimiento fúngico, sólo en aquellos tratamientos que fueron inoculados con micelio. Por lo tanto, los ensayos posteriores en donde se aplicaron diferentes pre-tratamientos al bagazo, sólo fueron inoculados con micelio. De esta forma, después de 5 días de incubación se encontró crecimiento fúngico en todos los pre-tratamientos de bagazo, excepto aquel hidrolizado con ácido (pre-tratamiento 6).

De los pre-tratamientos que permitieron el desarrollo fúngico, es decir, bagazo sin lavar, lavado y tratado con celulasas, se tuvo seleccionaron los dos primeros, debido a que la hidrólisis enzimática del bagazo (tratamiento con celulasas) supone un mayor costo para el proceso y a que en los resultados se evidenció que los hongos tuvieron la capacidad

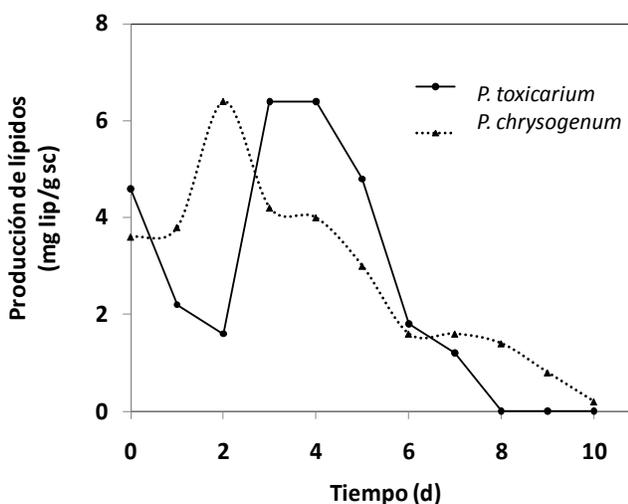
hidrolítica para crecer sobre el bagazo sin tratar. De esta forma, se encontró un mayor crecimiento fúngico medido como proteína total sobre el bagazo sin lavar ( $18.70 \pm 0.91$  mg/mg), en comparación con el crecimiento sobre el bagazo lavado ( $14.83 \pm 2.74$  mg/mg).

**Tabla XV. Crecimiento fúngico sobre bagazo de *Gelidium robustum* con diferentes pre-tratamientos.**

Experimento	Pre-tratamiento	Tipo de inoculación	Crecimiento
1	Sin lavar pH 4.9	Esporas ( $1.8 \cdot 10^6$ /g)	No
2	Sin lavar pH 7.8	Esporas ( $1 \cdot 10^7$ /g)	No
3	Lavado pH 5.08	Micelio (0.2 mg/g)	Si
4	Sin lavar pH 5.12	Micelio (0.2 mg/g)	Si
5	Enzimático pH 5.12	Micelio (0.2 mg/g)	Si
6	Químico pH 5.12	Micelio (0.2 mg/g)	No

A partir de los resultados de este ensayo preliminar, se concluyó que un rápido crecimiento fúngico sobre el bagazo estuvo condicionado a la forma de inoculación, donde el micelio colonizó el sustrato en un lapso menor a 3 días. Ambas cepas de *Penicillium* spp. fueron capaces de crecer sobre bagazo algal sin requerir pre-tratamientos que liberarán los azúcares disponibles y el desarrollo fúngico fue mayor al utilizar bagazo sin lavar. A partir de esto, se realizó una caracterización de la producción de lípidos para establecer el día de cosecha, en el cual las cepas presentaron un máximo de producción.

La Figura 17 presenta el comportamiento de la producción de lípidos a partir de bagazo algal con *P. chrysogenum* y *P. toxicarium* durante 10. Al día 0, se observó que ambas cepas tuvieron una cantidad de lípidos acumulada del pre-cultivo (7 días de incubación/21°C en PDC sin agitación). La cantidad de lípidos inicial fue similar para ambas cepas.



**Figura 17.** Comportamiento de la producción de lípidos llevada a cabo por las cepas de *Penicillium chrysogenum* y *P. toxicarium* a partir de bagazo algal.

La producción de lípidos fue semejante en ambas cepas. Para *P. chrysogenum*, en los días 1 y 3 se encontraron valores muy similares de producción, iguales a 3.8 y 4.2 mg lip/g<sub>sc</sub>, respectivamente. Al segundo día de incubación sobre el bagazo algal, se encontró el máximo de producción igual a 6.4 mg lip/g<sub>sc</sub>, éste incremento puede ser atribuido totalmente a la síntesis de lípidos por parte del microorganismo. Sin embargo, la cantidad de lípidos en el día posterior, fue similar a la encontrada al inicio de la cinética, seguido de una disminución gradual hasta alcanzar valores cercanos a cero. Es importante hacer notar, que el máximo encontrado sólo fue observado por un periodo de 24 h, ya que posterior a este punto, los niveles de lípidos fueron similares a los encontrados al inicio de la cinética. Esto hace suponer que el hongo, consumió los lípidos acumulados de forma inmediata.

Por otro lado, *P. toxicarium* mostró una cinética de producción de lípidos con un máximo en los días 3 y 4 (6.4 mg lip/g<sub>sc</sub>). Es decir, aparentemente esta cepa tuvo la capacidad de acumular los lípidos acumulados por un periodo de tiempo mayor (48 h) que *P. chrysogenum*. Después de este máximo, hubo una disminución gradual de lípidos hasta llegar a cero en el décimo día de incubación.

En general, el comportamiento de producción de lípidos a partir de bagazo algal fue similar para ambas cepas; al inicio ambos hongos presentaron acumulación lípida intracelular, después se observó una disminución al cambiar de medio, de PDC a bagazo algal. Esta disminución de lípidos puede deberse a su consumo, como resultado del cambio de sustrato en el cual la cepa requiere de la obtención de energía para sintetizar las enzimas necesarias para hidrolizar y consumir la nueva matriz. De esta forma, se presume que los lípidos almacenados en PDC, fueron los contribuidores de energía para el crecimiento en el nuevo sustrato durante las primeras etapas. El incremento de lípidos intracelulares observado alrededor del tercer día de incubación, puede deberse a que parte del sustrato fue consumido y la fuente de nitrógeno se convirtió en un nutriente limitante, obligando al hongo a la acumulación de lípidos como material de reserva (Koike *et al*, 2001; Zhu, 2002). Después de observar un máximo, los lípidos fueron nuevamente consumidos para ser utilizados posiblemente como fuente de energía para el mantenimiento, en donde el microorganismo lleva a cabo funciones esenciales tales como la respiración. La disminución de lípidos en las últimas etapas puede deberse también a que el bagazo ya no contenía una cantidad suficiente de carbono y nitrógeno aprovechable por el hongo, lo que condujo a la generación de esporas (Murray, 2007).

Aunque ambas cepas mostraron un aumento en la cantidad de lípidos sintetizados, *P. toxicarium* presentó un máximo de producción durante un periodo de tiempo mayor, lo que permite tener un mayor umbral en el tiempo de cosecha. Por lo tanto *P. toxicarium* fue seleccionada para llevar a cabo en ensayo de FSS.

#### **V1.4.2. Fermentación en sustrato sólido**

Muchos sustratos sólidos compuestos de biopolímeros actúan como fuente de carbono, nitrógeno, minerales, agua y otros nutrientes, los cuales son propicios para el desarrollo de microorganismos dando como resultado el aprovechamiento de agromateriales o bioproductos de la industria agro-alimentaria. La mayoría de los estudios encaminados a la revaloración de desechos industriales se han realizado con Mucorales, principalmente los géneros *Mortierella* sp., *Mucor* sp. y *Cunninghamella* sp., mismos que tienen la capacidad de producir ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) durante su

crecimiento (Certík y Adamechova, 2009). Algunos cereales como el salvado de arroz, salvado de trigo, ojuelas de avena y cáscara de cebada son materia prima utilizable para producir lípidos, los cuales tienen una relación de nutrientes carbono/nitrógeno (C/N) que oscila entre los 20 a 60, siendo adecuado para el crecimiento fúngico. Estos sustratos son generalmente suplementados con aceites precursores de PUFAS. El uso de estos PUFAS ha aumentado su cosecha y en otros casos, son las grasas contenidas en los sustratos empleados, lo cual aumenta la cantidad de lípidos de manera importante probablemente porque su incorporación es directa a los lípidos intracelulares (Certik y Adamechova, 2009; Tauk-Tornisielo *et al.*, 2007; Tauk-Tornisielo *et al.*, 2009).

En el presente estudio se propuso la revaloración de bagazo algal mediante su fermentación en sustrato sólido utilizando un hongo acumulador de lípidos aislado de una fuente marina de la región de Baja California.

Fueron cuatro los factores a estudiar para evaluar su efecto sobre la producción lipídica, cada uno se examinó a dos niveles: temperatura a 21 y 26 °C, humedad al 50 y 80 %, relación C/N a 52.21 y 79.13 y, con o sin oxígeno. El diseño empleado para evaluar el efecto de éstos factores fue un diseño factorial; éste es utilizado como herramienta para estudiar simultáneamente el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas (como producción de lípidos), así como sus interacciones. De esta manera, será posible identificar qué factores influyen en el proceso.

En base al ensayo preliminar (sección V1.4.1.) se determinó que el cambio en las condiciones de cultivo para estudiar el efecto de estos factores, se realizaría al cuarto día de incubación, ya que fue en este tiempo cuando la cepa *P. toxicarium* inicio la acumulación lipídica. Esta estrategia, también tuvo como fin asegurar el consumo del sustrato algal por parte del hongo filamentoso. Cabe mencionar que cada tratamiento fue inoculado con micelio proveniente de un precultivo en PDC, al igual que en la cinética de producción de lípidos. Así, a partir del cuarto día, las condiciones de incubación fueron cambiadas según lo fijado por el diseño experimental e incubando por un periodo de 6 días. La Tabla XVI

muestra los resultados promedio y su desviación estándar de la producción lipídica en cada tratamiento. El contenido de ácidos grasos fluctuó entre 9.0 y 38.7 mg/g de biomasa seca.

**Tabla XVI. Producción de lípidos durante la Fermentación en Sustrato Sólido de bagazo algal con *P. toxicarium*.**

Exp.	FACTORES				Producción de lípidos (mg <sub>lip</sub> /g <sub>sc</sub> )	Desviación estándar
	A C/N	B Oxígeno	C Humedad (%)	D Temperatura (°C)		
1-2	52	con	50	21	22.3	1.56
3-4	79	con	50	21	20.5	2.40
5-6	52	sin	50	21	16.6	4.53
7-8	79	sin	50	21	21.6	3.11
9-10	52	con	80	21	16.9	3.25
11-12	79	con	80	21	10.3	0.71
13-14	52	sin	80	21	12.2	4.81
15-16	79	sin	80	21	11.5	0.99
17-18	52	con	50	26	31.4	0.57
19-20	79	con	50	26	29.3	6.08
21-22	52	sin	50	26	38.7	0.42
23-24	79	sin	50	26	24.1	9.76
25-26	52	con	80	26	17.0	3.82
27-28	79	con	80	26	11.5	1.27
29-30	52	sin	80	26	13.9	0.99
31-32	79	sin	80	26	9.0	0.85

mg<sub>lip</sub>/g<sub>sc</sub>: miligramos de lípidos por gramo de sustrato seco.

Los resultados obtenidos fueron analizados para calcular el efecto principal<sup>2</sup> de cada factor, el cual indica la variación promedio de la respuesta cuando cambia este factor. Los efectos principales calculados fueron colocados en una gráfica de probabilidad normal<sup>3</sup> (Figura A 4 del Anexo), la cual indicó que los efectos de los factores C y D fueron importantes (Walpole, 1999). Para verificar la significancia del efecto de estos factores, los datos de producción de lípidos fueron sujetos de un análisis de varianza según la práctica común para un diseño factorial  $2^4$  con dos réplicas (Tabla AIII del Anexo). Esto permitió comprobar que la variación observada en la respuesta (producción de lípidos) fue debida al efecto de los factores, y no del error experimental.

Del ANOVA, se encontró que el factor humedad tuvo un efecto altamente significativo sobre la producción de lípidos ( $p < 0.01$ ), mientras que la temperatura tuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, la relación C/N y oxígeno no presentaron un efecto significativo sobre la producción lipídica ( $p > 0.05$ ). Estos resultados fueron representados en gráficas de efectos principales<sup>4</sup> para identificar con facilidad la diferencia entre los niveles de los factores (Figuras 18a-d).

---

<sup>2</sup> Se calcula como la respuesta cuando el factor A esta en el nivel máximo (+) y la respuesta media cuando el factor A esta en el nivel inferior (-).

<sup>3</sup> Gráfica bidimensional de los valores de datos observados sobre el eje vertical con sus valores cuantiles correspondientes de una distribución normal estandarizada sobre el eje horizontal. Si los puntos parecen quedar sobre o cerca de la recta de una línea imaginaria que va de la esquina izquierda inferior de la gráfica a la esquina derecha superior se tendría evidencias para creer que el grupo de datos obtenidos (al menos aproximadamente) normalmente distribuido (Berenson y Levine, 1999).

<sup>4</sup> Las gráficas de efectos principales se construyen al tomar el promedio de la producción de los tratamientos bajo el factor tanto a nivel alto como a nivel bajo.

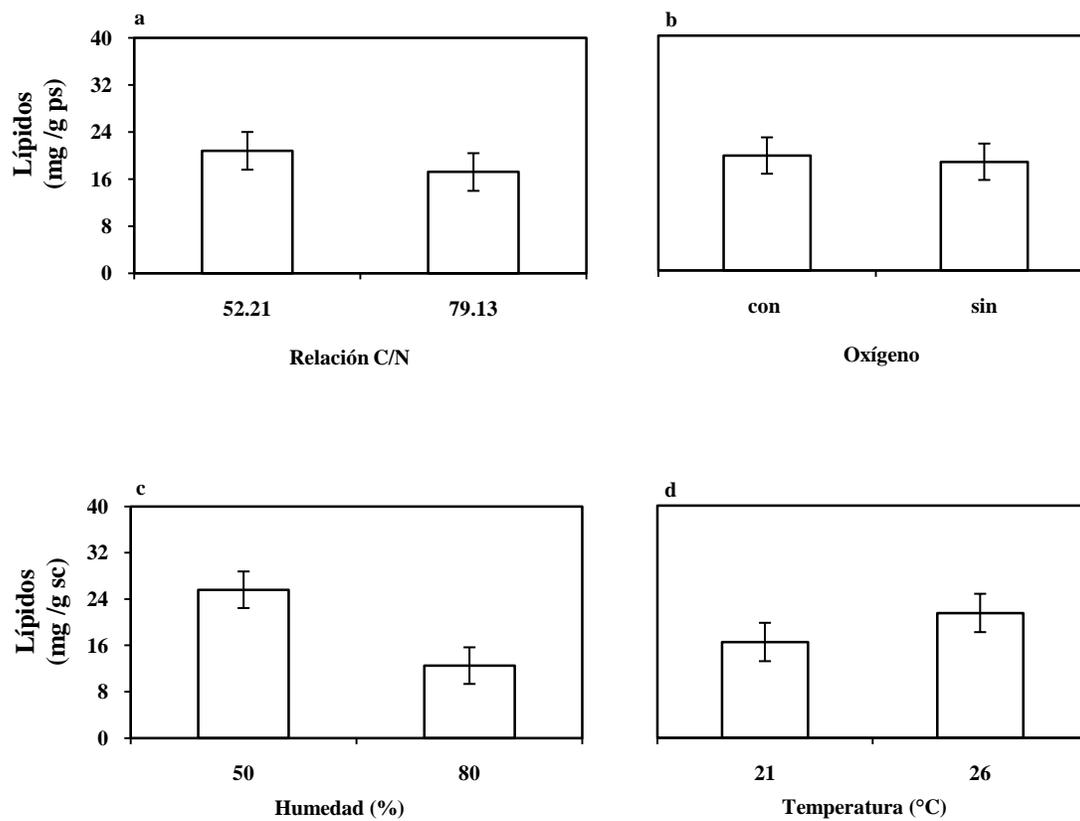


Figura 18. Gráficas de efectos principales de (a) relación C/N ( $p > 0.05$ ), (b) oxígeno ( $p > 0.05$ ), (c) humedad ( $p < 0.01$ ), (d) temperatura ( $p < 0.05$ ) sobre la producción de lípidos por la FSS de bagazo algal con *P. toxicarium*.

En la Figura 18a, se muestra la gráfica de efectos principales para el factor de relación C/N. Se observó que en promedio la producción a una relación C/N de 52.21 fue mayor en comparación con la relación C/N de 79.13 (cosecha de 20.8 vs. 17.2g  $g_{lip}/kg_{sc}$ , respectivamente), sin embargo, no fue estadísticamente significativo. Esto fue confirmado con la producción obtenida en los cultivos control, los cuales no tuvieron carbono adicional (relación C/N 14.4), y cuya producción estuvo en el mismo orden.

A partir de estos resultados, se puede decir que el hongo almacenó una cantidad ligeramente mayor de lípidos a una menor relación C/N. Una tendencia similar fue documentada para especies del género *Penicillium* específicamente *Penicillium funiculosum* y *P. oxysporum* quienes disminuyeron su producción lipídica un 91 y 86%, respectivamente cuando se aumentó la relación C/N de 22.9 a 100. Contrario a esto, se sabe que para especies pertenecientes al grupo de los Zygomycotas<sup>5</sup>, la acumulación lipídica es proporcional al carbono disponible, hasta alcanzar un máximo en el carbono asimilado (Baqir *et al.*, 1997).

Si la adición de carbono hubiese sido al inicio del ensayo, puede ser que el microorganismo pudiera haber asimilado una mayor cantidad y por ende generar una mayor cantidad de lípidos.

Sin embargo, el hecho que el microorganismo no haya asimilado una mayor cantidad de carbono para la producción lipídica, pudiera deberse a que *P. toxicarium* no es oleaginosa. Los microorganismos oleaginosos llevan a cabo una síntesis excesiva de lípidos, debido a que su enzima málica (EM) genera cantidades importantes de NADPH el cual es utilizado en la generación de compuesto lipídicos. Por lo tanto, la expresión de EM en nuestra cepa no es suficiente para sintetizar lípidos. Otra enzima importante en la generación de ácidos grasos es la ATP-citrato liasa, la cual tiene que estar presente en cantidades suficientes para llevar cabo la síntesis de ácidos grasos. Esta enzima es regulada

---

<sup>5</sup> La gran parte de los estudios enfocados en la producción de lípidos de origen fúngico se llevan a cabo con especies pertenecientes a este grupo.

tanto por la cantidad de triglicéridos/ésteres de ácidos grasos, así como por la cantidad de ATP/ADP (Atkinson, 1977; Boulton y Ratledge, 1983). Ambas enzimas están implicadas en la lipogénesis, por lo que en las condiciones de nuestro ensayo pudieron verse inhibidas y/o no ser expresadas en los niveles que presentan los microorganismos oleaginosos (Boulton y Ratledge, 1981).

La hipótesis de trabajo sugiere que habrá una mayor producción de ácidos grasos, cuando la limitación de nitrógeno sea mayor y a su vez, haya suficiente carbono disponible para ser asimilado y convertido en triglicéridos. Los resultados obtenidos con la caracterización de la producción de lípidos nos permitieron observar una producción mayor de lípidos conforme el sustrato fue consumido. Al considerar este hecho, la hipótesis pudiera ser validada, sin embargo, es necesario diseñar un experimento que lo confirme.

Por otra parte, se encontró que el oxígeno no fue un factor que repercutiera significativamente sobre la producción de grasas (Figura 18b). Sin embargo, se esperaba que este factor tuviera relevancia sobre el perfil lipídico, lo que será discutido más adelante.

En la Figura 18c, se ilustra el efecto principal del factor de humedad; se observó que en promedio, el nivel bajo de humedad tuvo un efecto positivo sobre la acumulación lipídica lo que produjo en promedio  $25.6 \text{ mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$  vs.  $12.5 \text{ mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$  generados en el nivel alto. Es decir, la cantidad de grasas almacenadas por el hongo fue mayor en los tratamientos con menor humedad. Probablemente la cantidad de agua presente fue absorbida por la matriz, por lo que el hongo colonizó, hidrolizó y consumió los nutrientes eficientemente. De esta manera, la cantidad de nutrientes disminuyó a tal punto que accionó la acumulación lipídica. Por el contrario, al 80% de humedad el hongo creció sobre la fase líquida formada. Esta fase permitió una mejor solubilidad de los nutrientes y permeabilidad de éstos al interior de la célula, por lo tanto un mayor crecimiento y menor acumulación. Se sabe que la acumulación de ácidos grasos esta relacionada en gran medida con la disminución de nitrógeno en el medio, y no necesariamente su ausencia. Bajo estas condiciones, la célula cambia su metabolismo de consumo de ácidos grasos, a su síntesis (Aggelis y Sourdís 1997; Certik *et al.*, 2006; Lekha y Lonsane, 1994; Zandrazil y Brunert, 1981).

Por otro lado, se sabe que la cantidad de agua disponible esta asociada directamente con la actividad de agua. Esta a su vez, repercute en la velocidad de crecimiento y cantidadde biomasa. Se sabe que una menor actividad de agua disminuye el crecimiento celular (Raimbault, 1998), bajo estas condiciones se podría suponer que la célula comienza la síntesis de metabolitos secundarios, como son los lípidos.

La hipótesis del trabajo postuló la posibilidad de obtener una mayor cantidad de ácidos grasos bajo condiciones de estrés hídrico, es decir, la condición menos favorable para el microorganismo. Los resultados mostraron que a una menor humedad se encontró la mayor producción de lípidos,  $25.6 \text{ mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$  a 50% de humedad vs.  $12.5 \text{ mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$  a 80 % de humedad. Por lo tanto, la hipótesis es aceptada para la condición de estrés hidrico.

En la Figura 18d, se muestra la gráfica de efectos principales para el factor de temperatura. Se observó que en promedio, el nivel alto tuvo un efecto positivo y

significativo sobre la acumulación lipídica produciendo 21.5 mg<sub>lip</sub>/g<sub>sc</sub> vs. 16.5 mg<sub>lip</sub>/g<sub>sc</sub> generados al nivel bajo.

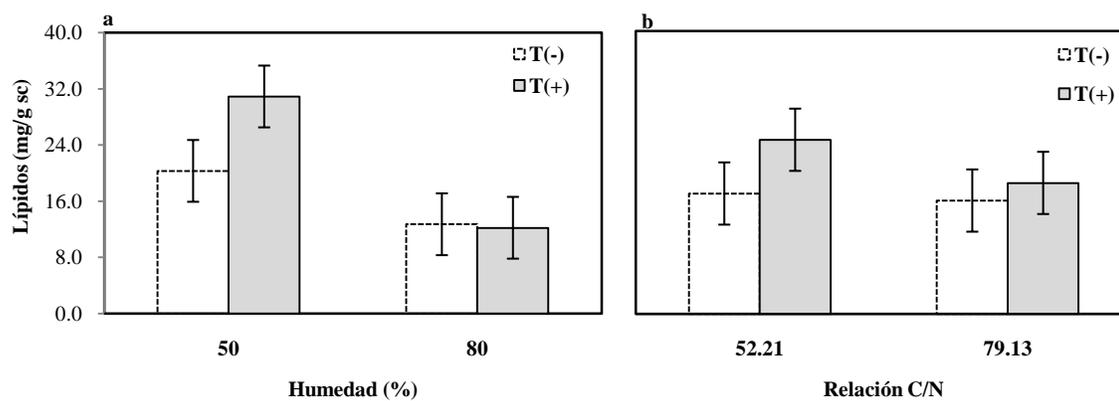
El aumento o la disminución de la temperatura, respecto a la óptima de crecimiento repercute directamente en su crecimiento (Gunstone *et al.*, 1994; Shimp y Kinsela 1977). Para la cepa utilizada en el ensayo de FSS, la temperatura óptima de crecimiento al pH fijado (4.5) fue alrededor de 21°C, mientras que la incubación a 26°C tuvo un menor crecimiento fúngico (Figura 13b). Si el hongo filamentoso esta bajo condiciones óptimas de crecimiento, los lípidos producidos serán utilizados para la formación de la membrana plasmática, hormonas, vitaminas, fuente de energía y carbono entre otros (Devlin, 2004). Sin embargo, cuando su desarrollo se llevó a cabo bajo condiciones no óptimas, es decir a 26°C, la acumulación de grasas fue mayor posiblemente porque el metabolismo dirigido al crecimiento celular disminuyó.

Al relacionar este hecho con la hipótesis, la cual planteaba una mayor acumulación lipídica bajo condiciones de estrés, es posible decir que la temperatura también fue un factor de estrés que favoreció la producción de lípidos.

Además, de encontrar efectos significativos por parte de los factores estudiados, se encontraron interacciones interesantes de analizar, ya que la interacción entre los factores, puede repercutir de manera positiva o negativa sobre la producción. El análisis de varianza demostró que la interacción entre temperatura y humedad tuvo un efecto significativo sobre la acumulación lipídica ( $p < 0.05$ ). Esto quiere decir que, la combinación entre el nivel alto de temperatura con el nivel bajo de humedad (26 °C y 50 % de humedad) dieron como resultado una producción promedio de 30.9  $\text{mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$ , la cual fue significativamente mayor que la producción obtenida a una baja de temperatura y alta humedad (21 °C, 80 % de humedad, Figura 19a).

Por otro lado, se observó una tendencia interesante entre los factores relación C/N y temperatura (Figura 19b): el nivel bajo de C/N, junto con el nivel alto de temperatura resultó en una producción superior, en comparación con la combinación contraria (24.60  $\text{mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$  vs. 16  $\text{mg}_{\text{lip}}/\text{g}_{\text{sc}}$ ,  $p > 0.05$ ).

Sólo estas dos interacciones mostraron una tendencia que pueden ser una base importante en la producción de ácidos grasos. Si consideramos la combinación del nivel alto de temperatura, una baja humedad y una baja relación C/N, como aquella que incrementó la acumulación lipídica de manera significativa e independiente, se puede suponer que bajo estas condiciones obtendremos los mayores rendimientos, donde la cepa es capaz de crecer bajo condiciones de estrés. Esto permite validar en lo general, la hipótesis de trabajo.



**Figura 19. Producción de lípidos bajo la interacción de dos factores de crecimiento sobre sustrato seco (sc) de *G. robustum* a 10 días de incubación. (a) Interacción entre la temperatura y la humedad ( $p < 0.05$ ), (b) Interacción entre la temperatura y relación C/N ( $p > 0.05$ ).**

### V1.4.3. Comparación con otros estudios

La mayor producción de lípidos al final de la FSS fue de 38.7 g<sub>lip</sub>/kg<sub>sc</sub> (equivalente a 19.01 g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub>, que se refiere a los lípidos cosechados por kg de carbono alimentado). Estos lípidos fueron cosechados del tratamiento incubado a 26°C, sin oxígeno, humedad del 50% y una relación C/N de 52.21. Al comparar esta cosecha, con la obtenida con el tratamiento control el cual no tuvo una dosis extra de carbono (21°C, sin oxígeno, 50% humedad), se observó un incremento del 50% en la producción de ácidos grasos. Esto demostró que la producción de lípidos pudo ser incrementada al controlar las condiciones durante la FSS.

En la figura VXII se puede observar que la producción lipídica alcanzada en este trabajo, fue mayor que aquella reportada por Tauk-Tornisielo y colaboradores (2007, 2009). En un primer estudio, utilizaron *Mucor hiemalis* incubado por 72 h a 25 °C dando como resultado una producción de 1.5g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> al emplear xilosa como fuente de carbono. En un segundo estudio, se empleó un cultivo sumergido que contuvo de 1 a 4 % de aceite y 1 % de extracto de levadura a 150 rpm y 25 °C, con un cambio de temperatura a 12 °C después de las 72 h de incubación; al final, se lograron cosechar 1.48g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> al utilizar una cepa de *Rhizopus* sp. (fuente de carbono aceite de canola) y 2.1 g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> (fuente de carbono aceite de palma). Bajo las mismas condiciones *Mucor circinelloides* produjo 1.85 g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> (fuente de carbono aceite de ajonjolí). Otro estudio realizado con Zygomycetos, se obtuvo un rendimiento de 1.19<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> al utilizar a *Mortierella sarnyensis* Mo 064 en una incubación de 11 días en bagazo de cebada con el 80 % de humedad (Jacobs *et al.*, 2009).

Un valor mucho menor fue el obtenido por Papanikolau y colaboradores en el 2004 quienes sólo recuperaron 0.45 g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> al cultivar a *Mortierella isabellina* en un medio con una relación C/N de 340 por 250 h. Por su parte, *Pythium irregulare* mostró una mayor acumulación (4.60g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub>) al ser incubado a 25 °C por 6 días bajo una fermentación sumergida de salvado de arroz cuya relación C/N fue de 10 (Zhu, 2002). García (2008) llevo a cabo una fermentación de bagazo de remolacha con el hongo *Umbelopsis isabellina* para la generación de biodiesel. El máximo acumulativo lo obtuvo al realizar un tratamiento de sacarificación y fermentación simultánea obteniendo 0.16 g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub>

Tabla XVII. Producción de ácidos grasos con hongos filamentosos bajo diferentes condiciones de cultivo.

Microorganismo	Condiciones	Rendimiento (g lip/kg C)	Ref.
<i>P. toxicarium</i>	- Sin oxígeno a 21°C por 10 días - Bagazo algal + glucosa como fuente de carbono	19.01	Este trabajo
<i>Penicillium roqueforti</i> MUCL29151	-Con agitación a 28°C por 9 días -Glucosa como fuente de carbono	2.41 7.16	Lomascolo <i>et al.</i> , 1994
<i>Penicillium camemberti</i> MUCL31575		8.9	
<i>Penicillium roqueforti</i> Sociéte			
<i>Mortierella sarnyensis</i> Mo 064	-23 °C/ 3 días y 16°C/ 8 días -Bagazo de cebada como fuente de carbono	1.19	Jacobs, <i>et al.</i> , 2009
<i>Mucor hiemalis</i>	-72 h a 25°C -Xilosa como fuente de carbono	1.5	Tauk-Tornisielo <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhizopus sp.</i> y <i>Mucor circinelloides</i>	-150 rpm, 25°C/3 días a 12°C/ 2 días - 4 % de aceite como fuente de carbono	1.48 1.85	Tauk-Tornisielo <i>et al.</i> , 2009
<i>Pythium irregulare</i>	-25°C por 6 días -Salvado de arroz como fuente de carbono	4.61	Zhu, 2002
<i>Mortierella isabellina</i>	- Con agitación a 28°C/250h -Glucosa como fuente de carbono	0.45	Papanikolau <i>et al.</i> , 2004
<i>Umbelopsis isabellina</i>	-25 °C por 160 h -Bagazo de remolacha enriquecido	0.16	García, 2008

Producción referida a la cantidad de carbono suministrado en el medio de cultivo.

Otras especies de *Penicillium* spp. han sido aprovechadas para la obtención de ácidos grasos, ejemplo de ello fue la producción de 2.41g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub> al utilizar un medio Czapek con 30 g/L de glucosa después de incubar a *Penicillium roqueforti* MUCL 29151 a 28 °C por 9 días. No obstante, al incubar bajo estas mismas condiciones a *Penicillium camemberti* MUCL 31575 y *Penicillium roqueforti* "Société" produjeron cantidades de 7.16 y 8.9 g<sub>lip</sub>/kg<sub>C</sub>, respectivamente (Lomascolo *et al.*, 1994).

Se puede concluir que este estudio, ha logrado obtener una producción de lípidos por arriba de la reportada por diversos autores. Es necesario aclarar que la mayoría de los estudios han utilizado altas concentraciones de carbono, y aunque, la producción en la mayoría de los casos fue similar a la máxima acumulada en este trabajo (38 g<sub>lip</sub>/kg<sub>sc</sub>), al relacionar la cosecha de lípidos con la cantidad de carbono adicionado, el rendimiento obtenido en este estudio fue muy superior.

Además, los sustratos que han sido empleados son fuentes de carbono de alto valor, como glucosa, xilosa y aceites vegetales. Por lo que este estudio, resulta interesante al aprovechar como materia prima un residuo orgánico industrial suplementado con sacarosa, la cual pudiera ser fácilmente sustituida por un residuo con alto contenido de azúcares, con el fin de reducir costos de producción.

Utilizar la Fermentación en Sustrato Sólido, en lugar de una fermentación sumergida como vía para obtener un metabolito de interés comercial permitió alcanzar un mayor rendimiento del producto deseado (g/kg<sub>C</sub>). Este proceso, no sólo permitió el aprovechamiento de un material con poco valor comercial, sino también, obtener altos rendimientos.

La importancia del análisis del diseño factorial, permitió puntualizar qué factores repercuten sobre la acumulación lipídica. El hecho de identificar, tanto el factor como el nivel que aumenta la cantidad de lípidos, posibilita tener las bases para tener un conocimiento más profundo sobre el proceso y llegar a su optimización para la producción de lípidos.

#### **V1.4.4. Perfil de los metilésteres de ácidos grasos generados**

Los lípidos obtenidos de la FSS a partir de bagazo algal fueron analizados para identificar y cuantificar los ácidos grasos producidos. Se lograron identificar 9 ácidos grasos con una longitud que varió entre los 14 y 22 carbonos, con una o dos insaturaciones (Tabla XVIII). En todos los tratamientos los ácidos grasos predominantes fueron el ácido palmítico, linoléico, oléico y esteárico con un 75.5, 23.5, 23.0 y 22.3% del total de los ácidos grasos producidos, respectivamente.

Este perfil de ácidos grasos concuerda con lo reportado por varios autores como Van Etten y Gottlieb (1965), quienes encontraron que *Penicillium atrovenetum* produce mayoritariamente los ácidos palmítico (19.65 %), esteárico (12.73 %), oléico (31.26 %) y linoléico (32.21 %) al crecerlo en un medio sintético con glucosa y asparagina (10 y 2 g/L respectivamente). Datos similares fueron reportados para *Mucor* sp. RRL001, el cual presentó una composición máxima de ácido oléico, seguido de palmítico y linoléico en una fermentación de un medio compuesto a 30°C, 200 rpm por 7 días (Ahmed *et al.*, 2006). Asimismo, la composición de ácidos grasos de levaduras carotenogénicas (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus longinousculus*, *Sporobilomyces patagonicus*, *Rhodoturula minuta*, *Cystofilobasidium lacus-mascardii* y *Dioszegia* sp.) revelaron la presencia de una mayor cantidad de ácido linoléico (~40%), oléico (~34%) y palmítico (~13%) al cultivarlas en un medio semisintético (Libkind *et al.*, 2008).

En menor proporción se encontraron ácido mirístico, behénico, palmitoléico, araquídico y miristoléico, cuyo porcentaje no rebazó el 6.2%.

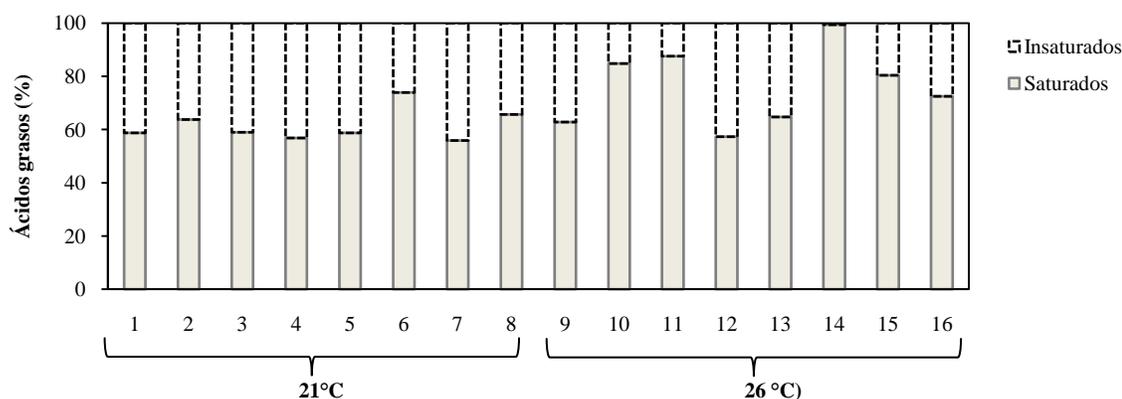
**Tabla XVIII. Perfil lipídico de los ácidos grasos generados bajo los 16 tratamientos en la FSS.**

<i>Tratamiento</i>	Perfil lipídico (%)								
	<i>Mirístico (14:0)</i>	<i>Miristoléico (14:1)</i>	<i>Palmítico (C16:0)</i>	<i>Palmitoléico (C16:1)</i>	<i>Esteárico (C18:0)</i>	<i>Oléico (C18:1)</i>	<i>Linoléico (C18:2)</i>	<i>Araquídico (20:0)</i>	<i>Behénico (22:0)</i>
C:N=52, con O <sub>2</sub> ,50% H, 21°C	6.2	1.3	43.5	0.8	6.1	18.9	20.3	2.2	0.6
C:N=79, con O <sub>2</sub> ,50% H, 21°C	3.5	0.0	51.6	1.2	8.1	19.8	15.2	0.5	0.1
C:N=52, sin O <sub>2</sub> ,50% H, 21°C	2.5	0.0	48.6	0.8	7.4	20.2	20.0	0.3	0.1
C:N=79, sin O <sub>2</sub> ,50% H, 21°C	0.7	0.2	43.0	1.4	12.0	22.4	19.2	0.6	0.5
C:N=52, con O <sub>2</sub> , 80% H, 21°C	2.4	0.2	50.7	1.1	5.4	16.4	23.5	0.1	0.2
C:N=79, con O <sub>2</sub> ,80% H, 21°C	2.4	0.2	62.6	0.8	7.1	15.1	10.0	1.1	0.6
C:N=52, sin O <sub>2</sub> ,80% H, 21°C	2.6	0.0	41.4	1.3	10.9	23.0	19.9	0.4	0.5
C:N=79, sin O <sub>2</sub> ,80% H, 21°C	2.2	0.3	53.4	0.9	8.3	18.2	14.9	0.9	0.9
C:N=52, con O <sub>2</sub> ,50% H, 26°C	1.1	0.0	44.7	0.3	15.8	20.3	16.7	0.5	0.6
C:N=79, con O <sub>2</sub> ,50% H, 26°C	2.4	0.0	60.7	0.2	19.9	8.4	6.6	0.8	1.0
C:N=52, sin O <sub>2</sub> ,50% H, 26°C	1.0	0.1	62.2	0.0	22.3	7.0	5.3	0.6	1.5
C:N=79, sin O <sub>2</sub> ,50% H, 26°C	2.9	0.0	45.2	0.8	8.4	20.2	21.8	0.5	0.2
C:N=52, con O <sub>2</sub> ,80% H, 26°C	1.7	0.3	52.8	0.9	6.5	18.9	15.3	0.6	3.1
C:N=79, con O <sub>2</sub> ,80% H, 26°C	1.7	0.1	75.5	0.1	20.9	0.1	0.3	0.1	1.1
C:N=52, sin O <sub>2</sub> ,80% H, 26°C	0.8	0.7	64.9	1.0	13.5	11.6	6.4	0.6	0.6
C:N=79, sin O <sub>2</sub> ,80% H, 26°C	3.4	0.0	60.3	1.1	4.5	14.2	12.2	0.4	4.0

Generalmente, los factores que influyen en el perfil lipídico son la temperatura y el oxígeno (Sukanya *et al.*, 2006; Lomascolo *et al.*, 1994; Sumner, 1969). En este trabajo, se analizaron los perfiles lípidos obtenidos bajo los diferentes tratamientos para conocer si el factor temperatura u oxígeno influyeron sobre el perfil.

La Figura 20 muestra el porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados respecto a la temperatura de incubación. Se observó una proporción ligeramente mayor de ácidos grasos saturados a una temperatura mayor (26 °C).

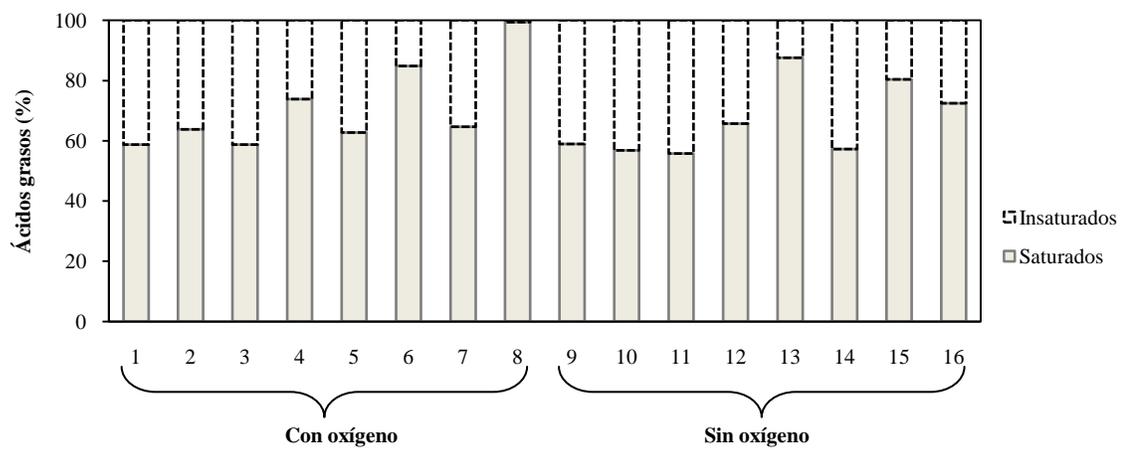
La producción de ácidos grasos saturados esta relacionada directamente con el incremento en la temperatura. Estos ácidos grasos se producen en mayor cantidad como una respuesta del incremento en la temperatura, esto se debe principalmente a que de esta manera las células mantienen la fluidez de la membrana; constituida principalmente por ácido palmítico y esteárico. Por otra parte, los ácidos grasos insaturados, se sintetizan mayormente cuando la temperatura disminuye, lo que mantiene la fluidez de la membrana. Posiblemente, este comportamiento ocurre a 21°C por el hecho de que los ácidos grasos insaturados son líquidos a temperatura ambiente (Devem y Manocha, 1976; Devlin, 2004; Fangrui *et al.*, 1999; Hiruta *et al.*, 1996). Esta tendencia concuerda con la reportada para el orden de los Mucorales, así como para el género *Penicillium* spp. y especies como *Entomophthora exilialis* (Kendrick y Ratledge, 1992; Lomascolo *et al.*, 1994; Sumner *et al.*, 1969).



**Figura 20. Relación de ácidos grasos saturados e insaturados producidos por *P. toxicarium* durante la FSS bajo una temperatura de 21 y 26°C.**

Al igual que la temperatura, el oxígeno es un factor que influye el grado de insaturación de los ácidos grasos pues actúa como un cofactor de la enzima desaturasa, que junto la acetil coenzima A realizan la conversión de grasas saturadas a insaturadas (Kendrick y Ratledge, 1992). La Figura 21 muestra la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados de los 16 tratamientos dados, agrupados por la adición o no, de oxígeno; en este caso, no observó una tendencia en el perfil lipídico.

Esto podría deberse a una mala aireación en el sustrato sólido, puesto que sólo los microorganismos que crecieron sobre el sustrato fueron los que probablemente tuvieron acceso al oxígeno suministrado. De esta forma, las células que crecieron en el seno del sustrato sólido, no tuvieron acceso al oxígeno, y por tanto éste no tuvo un efecto sobre el perfil lipídico como era esperado. Para que el efecto sea evaluado de manera efectiva, será necesario emplear un biorreactor que asegure una buena distribución del oxígeno a través del sustrato sólido, como un biorreactor tipo tambor horizontal o de columna-charola, ambos con alta transferencia de oxígeno (Ruiz *et al.*, 2007).



**Figura 21. Relación ácidos grasos saturados e insaturados producidos por *P. toxicarium* durante la FSS con y sin aireación.**

#### **V1.4.5. Uso de ácidos grasos para la producción de biodiesel.**

Aunque aún no se ha definido la relación de ácidos grasos saturados:insaturados más adecuada para la generación de biodiesel, es importante tener en cuenta que los metilésteres que conformen el biodiesel influirán en características como calor de combustión, estabilidad oxidativa, viscosidad, lubricidad y en las emisiones generadas (Fangrui y Milford, 1999).

La Tabla XIX muestra el perfil lipídico reportado para especies vegetales y grasas que han sido estudiadas como posibles insumos para la producción de biodiesel. Se puede observar, que en la mayoría de los casos se presenta una mayor cantidad ácido palmítico y linoléico. Sin embargo, son pocos los estudios que proponen el uso de determinados ácidos grasos para la obtención de biodiesel. Por ejemplo, Knothe (2005) concluyó que posiblemente el metilésterer que presenta la combinación de propiedades más adecuada es el ácido oléico, un metiléster monoinsaturado. Este aceite se encuentra en la semilla de colza, esto pudiera fundamentar el hecho de que la semilla de colza ha sido la mayor fuente a nivel mundial para la generación de biodiesel, seguida del aceite de soya y palma (International Grains Council, 2008).

Sin embargo, autores como Canaki y Sanli (2008) dan a conocer que es recomendable que el 50% de los ácidos grasos correspondan a saturados, por su alta temperatura de fusión y alta viscosidad; por lo que aceites como los encontrados en la manteca de cerdo y el sebo serían apropiados.

**Tabla XIX. Composición lipídica relativa de varias especies oleaginosas.**

<i>Fuente</i>	<i>Palmítico</i> (C16:0)	<i>Estéarico</i> (C18:0)	<i>Oléico</i> (C18:1)	<i>Linoléico</i> (C18:2)	<i>Referencia</i>
<i>Penicilliumtoxicarium.</i>	41.4	10.9	23.0	19.9	Este trabajo
<i>P. roqueforti</i> MUCL 29151	12	2.6	8.2	58	Lomascolo <i>et al.</i> , 1994
<i>P. roqueforti</i> "Société"	9.7	4	20	45	Lomascolo <i>et al.</i> , 1994
<i>P. camemberti</i> MUCL 31575	15		12.2	46	Lomascolo <i>et al.</i> , 1994
<i>P. spinulosum</i>	18	11.9		43.3	Shimi <i>et al.</i> , 1959
<i>P. lilacinum</i>	32.2	9.4		38.6	Shimi <i>et al.</i> , 1959
<i>A. nidulans</i>	20.9	15.9		40.3	Shimi <i>et al.</i> , 1959
<i>T. longibrachiatum</i>	20.5	10.4	13.5	38.2	Ruiz <i>et al.</i> , 2007
<i>Sebo</i>	28	22.5	40		Lee <i>et al.</i> , 1995
<i>Manteca de cerdo</i>	29	15	27	10	Lee <i>et al.</i> , 1995
<i>Aceite de palma</i>	32.2	5.5		52.4	Bank <i>et al.</i> , 1935
<i>Aceite de soya</i>	11	4	23	54	Fangrui y Milford, 1999
<i>Aceite de oliva</i>	15.6			64.6	Goering <i>et al.</i> , 1982
<i>Aceite de cacahuete</i>	8.8	4.5		60.3	Crawford y Hilditch, 1950
<i>Semilla de colza</i>	3.49	0.85	64.4	22.30	Gunde y Hilditch, 1940

Se muestran solo los valores mayores o iguales al 3%. El perfil lipídico mostrado para este trabajo fue aquel que presentó la relación saturados:insaturados más cercana a 1:1, así con la mayor cantidad de ácido oléico.

Si suponemos que una relación saturados:insaturados 1:1 es recomendable para la obtención de biodiesel de buena calidad, se puede decir que los ácidos grasos producidos por nuestra cepa fúngica es una opción interesante. Ya que la temperatura fue un factor determinante en el perfil de los ácidos grasos cosechados (Figura 20), por lo que se recomienda la disminución de la temperatura de incubación hasta lograr la relación saturados:insaturados deseada. Es por ello, que se propone estudiar a una menor temperatura de incubación, con un rango entre los 10 a 20 °C.

Aunque, una temperatura de incubación menor es preferible para aumentar la cantidad de ácidos grasos insaturados, se sugiere que el crecimiento fúngico sobre el bagazo en la primera fase de la producción, se realice a la temperatura óptima de crecimiento. Una vez que se alcance la mayor densidad fúngica, se disminuya el calor proporcionado con el fin de regular la proporción de ácidos grasos.

Aunque en gran manera el escrutinio y evaluación del almacenamiento de nuevas cepas oleaginosas es de suma importancia, hay dos aspectos de igual importancia para la generación de éste biocombustible: el costo de producción de la materia prima y el costo de procesamiento.

En el primer caso, se invierte entre el 60 al 80 % del costo total, y para disminuir este gasto es necesario el empleo de materias primas de bajo costo, como son los subproductos de la industria alimentaria, que son caracterizados por tener una alta carga de materia orgánica que puede ser utilizada para el crecimiento de microorganismos oleaginosos. Otros subproductos que pudieran ser empleados serían aquellos con una alta cantidad de grasas libres, ya que estas pudieran ser transformadas en aquellas útiles para la producción de biodiesel (Paulson y Ginder, 2007).

En el segundo caso, en el costo del procesamiento, hay tres aspectos importantes: la extracción de triglicéridos a partir de la matriz hongo-lípido-sustrato, la transesterificación de los triglicéridos a biodiesel, y la recuperación de subproductos (Krawczyk, 1996). Es importante, que estas tres etapas se optimicen para incrementar la rentabilidad del proceso.

En conclusión, la materia prima a utilizar para la producción de biodiesel será aquella que se encuentre en mayor proporción, por lo que en Europa se utilizan mayormente la semilla de colza y el girasol, mientras que en países tropicales predomina el aceite de palma y soya, y las grasas animales son comúnmente empleadas en Estados Unidos (Dermibas, 2006).

La importancia de este estudio radica en gran manera, en el aprovechamiento de un derivado de la industria de hidrocoloides que se encuentra disponible en grandes cantidades en la Región. El uso de estos materiales de desecho, como el bagazo algal es una opción interesante para la generación de ácidos grasos empleados en la producción de biodiesel. Sin embargo, y aunque la investigación es creciente en el tema, aún no se ha podido reemplazar el petrodiesel por el biodiesel ya que, la demanda aún no ha sido cubierta por lo que es necesario examinar nuevas fuentes que permitan consolidar su uso al utilizar varias fuentes alternas.

## Capítulo IV

---

### Conclusiones

---

Se aislaron 17 cepas tanto de fuentes marinas como terrestres, de las cuales 5 fueron positivas a la coloración de Negro Sudán B, lo que indicó la presencia de acumulaciones lipídicas intracelulares. Las cepas denominadas como M7 y M11 presentaron la mayor generación de lípidos, ambas aisladas de fuentes marinas.

La temperatura y pH óptimos para el crecimiento de la cepa M7 fue de 26.5°C y 5.95, mientras que para M11 fue de 21°C y 4.5.

En base a las características morfológicas y al análisis molecular, las cepas M7 y M11 fueron identificadas como miembros de las especies *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium toxicarium*, respectivamente.

De la caracterización fisicoquímica del bagazo de *Gelidium robustum* generado de la extracción de agar, se evaluó una relación C/N igual a 14.39. Se observó que *P. chrysogenum* y *P. toxicarium* fueron capaces de colonizar e hidrolizar el bagazo algal, al ser inculadas en forma vegetativa.

En la fermentación en sustrato sólido (FSS) el porcentaje de humedad y temperatura tuvieron un efecto significativo sobre la producción de lípidos ( $p < 0.05$ ), mientras la relación C/N y el oxígeno no tuvieron un efecto sobre la producción ( $p > 0.05$ ). Se encontró que una menor temperatura tuvo un efecto positivo sobre la producción de lípidos. Por su parte, un nivel bajo de humedad incrementó la cosecha lipídica.

La mayor cosecha de lípidos se encontró a una relación C/N de 52.2, sin oxígeno e incubado a 26°C (38.7 g<sub>lip</sub>/kg<sub>sc</sub>), siendo considerablemente mayor que la cosechada en el tratamiento control el cual fue incubado sin la adición de carbono, sin oxígeno, a 21°C (21.1 g<sub>lip</sub>/kg<sub>sc</sub>). Esto permitió en lo general, aceptar la Hipótesis de trabajo.

Los ácidos palmítico, linoléico, oléico y esteárico se encontraron en mayor porcentaje en las muestras procedentes del ensayo de FSS, alcanzado hasta un 75.5, 23.5, 23.0 y 22.3%, respectivamente. En menor proporción se encontraron los ácidos mirístico, behénico, palmitoléico, araquídico y miristoléico, lo cuales no rebazaron el 6.2%.

Se observó una ligera tendencia de los ácidos grasos en función de la temperatura; a 26°C se observó una mayor proporción de ácidos grasos saturados, mientras que los ácidos insaturados fueron predominantes a 21°C.

El oxígeno no tuvo un efecto significativo sobre la producción lipídica, de igual manera el perfil de ácidos grasos no mostró una tendencia respecto a este factor. Este hecho se pudo deber en gran medida, a una mala transferencia de oxígeno en la matriz sólida, por lo que el microorganismo no pudo asimilarlo y por ende tener un efecto sobre la producción lipídica.

## Capítulo V

---

### Recomendaciones

---

El escrutinio de nuevas cepas nativas de la región de Ensenada que muestren capacidad en la producción lipídica al crecer sobre matrices de bajo costo (preferentemente desechos).

Realizar una cinética de crecimiento sobre el bagazo de *Gelidium robustum* utilizando al CO<sub>2</sub> como parámetro a seguir, esto con el fin de determinar la fase estacionaria que es considerada como una de las etapas de acumulación lipídica (Caltriver *et al.*, 1962).

Utilizar un Biorreactor de columna-charola el cual permite una mejor aireación de la matriz sólida.

Aumentar la cantidad de micelio con el que se inocula el sustrato algal para aprovechar de manera más sustancial el bagazo (en este trabajo se empleo el 2% de micelio en relación con el peso del sustrato).

Incubación del medio a fermentar por más de 10 días para observar si el almacenamiento lipídico resulta mayor.

Examinar el rango de temperatura entre los 10 y 20°C, para evaluar su efecto sobre la producción de grasas insaturadas.

## Capítulo VI

---

### Literatura citada

---

Abd-Aziz, S., G. S. Hung, M. A. Hassan, M. I. Abdul y N. Samat. 2008. Indirect method for quantification of cell biomass during solid state fermentation of palm kernel cake based on protein content. *Asian Journal of Scientific Research*. 1(4):385-393 p.

Acosta, R., A. Rodríguez-Martín, A. Martín, F. Núñez y M. A. Asensio. 2009. Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* Submitted. 135(1):39-46 p.

AFNOR. 1984. Recueil de Normes Francais des Corps Gras, Graines Oleagineuses et Produits Derives. Tercera edición. Francia. 438 pp.

Aguilar-Rivera, N. y M. J. Canizales-Leal. 2004. Cinética de la hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 3: 257-263 p.

Ahmed, S. U., S. K. Singh, A. Pandey, S. Kanjilal y B. N. Prasad. 2006. Effects of Various Process Parameters on the Production of  $\gamma$ -Linolenic Acid in Submerged Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 283–287 p.

Aidoo, K. E., R. Hendry y J. B. Wood. 1982. Solid substrate fermentations. *Adv. Applied Microbiol.* 28: 201–237 p.

Alastruey-Izquierdo, A., M. Cuenca-Estrella, A. Monzón y J. Rodríguez-Tudela. 2007. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:748-51 p.

Albarracín, I. 2007. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. XV Simposio Electronico Internacional.

Alcazar-Fuoli, L., E. Mellado, A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella y J. Rodríguez-Tudela. 2008. *Aspergillus* section fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother. 52: 1244-1251 p.

Allah, A. A., F. Delvigne, A. Jean-Marc, J. Destain y P. Thonart. 2008. Improvement of xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 12(2): 111-118 p.

Álvarez, H. M. 2006. Bacterial Triacylglycerols. En: Linda T. Welson (ed.). Triglycerides and Cholesterol Research. Nova Science Publishers, New York, 159-176 p.

Alvarez, H. M., B. Matías, A. María, M. A. Fajardo y Sánchez T. P. 2007. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. XV Simposio electronico internacional.

APHA: American Public Health Association. 1992. American Waterwork Association (AWWA) and water and Enviroment Federation (WEF). Standar Method for the Examination of water of water and Wasterwater. Edición diesiocho. Washington D.C. 320 pp.

Anderson, R., B. P. Livermore, M. Kates y B. E. Volcani. 1978. The lipid composition of the non-photosynthetic diatom *Nitzschia alba*. Biochim Biophys Acta. 528(1):77-88 p.

Angenent, L., K. Karim, M. Al-Dahhan, B. Wrenny D. Espinosa. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. TIBITECH. 22(9): 477-485 p.

Asan, A. 2004. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. Turk J Bot. 28: 287-298 p.

Atkinson, D. E. 1977. Cellular Energy Metabolism and its Regulation. Academic Press. Primera edición. New York. 293 pp.

Bala, B. K. 2005. Studies on biodiesels from transformation of vegetable oils for diesel engines. Energy Edu Sci Technol. 15:1-43 p.

Bank, A., Dean, H. K. y T. P. Hilditch. 1935. J. Soc. Chem. Ind., Lond., 54- 77 p.

Banu, A., M. Rasheedha, D. Kalpana, G. R. Gnanaprabhal, B. V. Pradeep y M. Palaniswamy. 2010. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. Indian Journal of Science and Technology. 3 (4):377-381 p.

Baquir, S. N., Khurshid H., Farooq A. K., Dilnawaz S. y A. M. Zafar. 1997. Production of lipids by fermentation preliminary report. Journal of Islamic Academic of Sciences. 10(1):13-18 p.

Barnett, H. L. y B. B. Hunter. 1972. Illustrated of genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Tercera edición. Minnesota. 241 pp.

Berenson, M. L. y D. M. Levine. 1999. Estadística básica en administración. Conceptos y aplicaciones. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A.. Sexta edición. 933 p.

Bilal, Balkan y F. Ertan. 2007. Production of  $\alpha$ -Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by using some agricultural by-Products. Food Technol. Biotechnol. 45 (4): 439-442 p.

Bligh, E. G. y W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917 p.

Boulton C. y Ratledge Colin .1981. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP : citrate lyase. Journal of General Microbiology. 127: 169-176 p.

Boulton, C. y C. Ratledge. 1983. Partial purification and some properties of ATP:Citrate lyase from the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Journal of General Microbiology*. 129: 2863-2869 p.

Box, G. E., W. G. Hunter y J. S. Hunter. 1978. *Statistics for experiments*. Jhon Waley and sons. Primera edición. New York. 653 pp.

Burdon, K. L. 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bact.* 52: 665-678 p.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing of Protein Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 p.

Caltrider, P. G. 1962. Germination and enzymes for glucose metabolism in fungus spores. Ph. D. Thesis, University of Illinois, Urbana.

Canakci, M. y H. Sanli. 2008. Biodiesel production from various feedstocks and their effects in the fuel properties. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 35: 431-441 p.

Cannel, E. y M. Moo-Young. 1980. Solid-state fermentation systems. *Process. Biochem.* 4: 2-7 p.

Capalbo, F. M., F. H. Valicente, O. I. Morales y L. H. Pelizer. 2001. *Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Católica de Valparaíso.4 (2)

Cappa, F. y P. S. Cocconcelli. 2001. Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 69(1):157-160 p.

Castillo, L. R., T. L. Alves y R. A. Medronho. 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 71: 45-50 p.

Certík, M., L. Sláviková, S. Masrnová y J. Sajbidor. 2006. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with  $\gamma$ -Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. *Food Technol. Biotechnol.* 44(1):75–82 p.

Certik, M. y Z. Adamechova. 2009. Cereal-based bioproducts containing polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology.* 21(11):250-253 p.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 25: 294-306 p.

Chundakkadu, K. 2005. Solid-State Fermentation Systems. An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology.* 25:1–30, 2005 p.

Claus, W. y W. H. Freeman y Company. 2000. *Understanding microbes a laboratory text book for microbiology.* Séptima edición. New York. 547 pp.

Cochrane, V. W. 1958. *Physiology of fungi.* Jonh Wiley and Sons. Inc. Segunda edición. New York. 524 pp.

Conti, E., M. Stredansky, S. Stredanskay F. Zenetti. 2000.  $\gamma$ -Linolenic acid production by solid state fermentation of Mucorales strains on cereals. *Bioresource Technology.* 76(3):283-286 p.

Cook, H. 1996. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. En: D. E. Vance y J. E. Vance (Eds.). *Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes.* Elsevier Science. Amsterdam. 129-152 pp

Corredor, I. 2002. Evaluación del efecto de dos métodos de conservación sobre diferentes microorganismos con interés en control biológico. *Microbiólogo Agrícola y veterinaria.* Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota. 134 pp.

Corry, J. 1987. Relationships of water activity to fungal growth. En: Beuchat L. R. (ed.) Food and Beverage Mycology. Van Nostrand Reinhold, New York. 51-99 pp.

Crawford, R. V. y T. P. Hilditch. 1950. The component fatty acids and glycerides of ground oils. J. Sci. Fd Agric. 1: 372 p.

Cunnif, P. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. Dieciseisava edición. AOAC International. Arlington. 1200 pp.

Das, A. y U. Ghosh. 2009. Solid state fermentation of waste cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for production and characterization of cellulases. Journal of Scientific and Industrial research. 68: 714-718 p.

De Andres, C., M. J. Espuny, M. Robert, M. E. Mercade, A. Manresa y J. Guinea. 1991. Cellular lipid accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Appl Microbiol Biotechnol. 35:813–816 p.

Demirbas, A. 2006. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. Energ.Convers. Manage. 47: 2271–2282 p.

Demirbas, A. y Deremibas I. 2007. Importance of rural Bioenergy for developing countries. Energy Converts Manage. 48:2386-2398 p.

Demirbas, A. 2007. Importance of biodiesel as transportation fuel. Energy Police. 35:4661-4670 p.

Demirbas, A. 2009. Progrees and recent trends in biodiesel fuels. Energy Conversion and Management. 50:14-34 p.

Devem, J. M. y M. S. Manocha. 1976. Effect of various cultural conditions on the fatty acid and lipid composition of *Choanephora cucurbitarum*. Can. J. Microb. 22: 443-449 p.

Devlin, T. M. 2004. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínica. Cuarta edición. Editorial Reverté S. A. de C. V. España. 1216 pp.

Dilip, K. A. 2003. Handbook of Fungal Biotechnology. Marcel Dekker. Segunda edición. Nueva York. 600 pp.

Doelle, H. W., D. A. Mitchell y C. E. Rolz. 1992. Solid substrate cultivation. Elsevier SCI. Publ. Ltd. London y New York. 466 p. Du, J., H. X. Jin, K. L. Yang y X. Y. Zhang. 2007. Fatty acids production by fungi growing in sweet potato starch processing waste water. Chin. J. Bioprocess Eng. 5(1):33-36 p.

Dugan, M. 2006. The identification of fungi. And illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. The American phytopathological society. Primera edición. Minnesota. 176 pp.

Duncan, Bettie. 1973. Nutrition and fat production in submerged cultures of a strain of *Penicillium lilacinum*. Mycology. 65:211-214 p.

Durand, A. 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochem. Eng. J. 13: 113-125 p.

Durand, A. y D. A. Chereau. 1988. A new pilot reactor for solid state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. Biotechnol. Bioeng. 31:486-476 p.

Dyal, S., L. Bouzidi y S. S. Narine. 2005. Maximising the production of  $\gamma$ -linolenic acid in of *Mortierella ramanniana* var. ramanniana as a function of pH, temperature and carbón source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. Food. Res. Int. 38: 815-829 p.

Ennouali, M., M. Ouhssine, K. Ouhssine y M. Elyachioui. 2006. Biotrasformation of algal waste by biological fermentation. African Journal of Biotechnology. 5(13):1233-1237 p.

Evans, C. T. y C. Ratledge. 1985. Possible regulatory roles of ATP : citrate lyase, malic enzyme, and AMP deaminase in lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides*. *Can. J. Microbiol.* 31:1000-1005 p.

Fangrui, M. y A. H. Milford. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology.* 70:1-15 p.

Fred, V., S. Soltero y J. Marvin. 1953. The Effect of the Carbohydrate Nutrition on Penicillin Production by *Penicillium chrysogenum* Q-176. *Appl. Environ. Microbiol.* 1(1):52-57 p.

Folch, J., M. Lees y G.H. Sloane Stanley. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J. Bio. Chem.* 226: 497-509 p.

Gad, A. M. y T. K. Walker. 1954. Mycological formation of fat. I. Media conducive to formation of fat from sucrose by *Aspergillus nidulans*, *Penicillium javanicum* and *Penicillium spinulosum*. *Journal of the science of food and agricultura.* 5(7): 339-343p.

Gallmetzer, M. y W. Burgstaller .2001. Citrate efflux in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture of *Penicillium simplicissium*. 79(1):81-87 p.

Ganuja, E., A. J. Anderson y C. Ratledge. 2008. High cell density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH auxostat fed batch system. *Biotechnology letters.* 30(9):1559-1564 p.

García, C. 2007. Exploration of lipid production in solid state fermentation from lignocellulosic biomass. M.Sc. Thesis in Food Technology. Wageningen University (The Netherlands). 180 pp.

García, C. 2008. Producción de biodiesel mediante fermentación en estado sólido de compuestos lignocelulósicos derivados del bagazo de remolacha. *Rev. Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 9(1): 66-72 p.

García-Mena J., C. C. Ramírez, C. G. Orijel, S.R. Canseco y H. M. Varaldo. 2005. A PCR method for the detection and differentiation of *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor* in defined-mixed cultures used for wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 524–531 p.

Gema, H., A. Kavadia, D. Dimou, V. Tsagou, M. Komaitis y G. Aggelis. 2002. Production of  $\gamma$ -linoleic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 303-307 p.

Gilgado, F., J. Cano, J. Gene y J. Guarro. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J.Clin. Microbiol.* 43:4930-42 p.

Glass, N. L. y G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61 (4):1323–1330 p.

Goering, C.E., A. W. Schwab, M. J. Daugherty, E. H. Pryde y A. J. Heakin. 1982. Fuel properties of eleven oils. *Trans. ASAE.* 25:1472-1483 p.

Gowthaman, M. K., C. Krishna y M. Moo-Young. 2001. Fungal solid state fermentation: An overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1: 305-352 p.

Granner, D. K., R. K. Murray, P. A. Mayes y V. W. Roddwell. 2001. *Bioquímica de Harper*. Editorial Manual moderno. Dieciseisava edición. México. 396 pp.

Graboski, M. S y R. L. McCormick. 1998 Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Prog Energy Combust Sci.* 24:125-164p

Gunde, B. G. y T. P. Hilditch. 1940. *J. Soc. chem. Ind.* 59.

Gunstone, D. F., J. L. Harwood y F. B. Padley. 1994. *The lipid Handbook*. Segunda edición. Chapman y Hall. Londres. 564 pp.

Guzmán del Proó, S. A. 1969. Los recursos vegetales marinos de Baja California, México, Proc. Sixth International Seaweed Symposium, Santiago de Compostela, España. 6:685-690p.

Guzmán del Proó, S. A., M. Casas Valdez, A. Díaz Carrillo, M. L. Díaz López, J. Pineda Barrera y M. E. Sánchez Rodríguez. 1986. Diagnóstico sobre las investigaciones y explotación de las algas marinas en México. Investigaciones Marinas CICIMAR. 63 pp.

Hamelinck, N. 2007. Prospects for ethanol from lignocellulosic biomass: technoeconomic performance as development progresses. Copernicus Institute. Science Technology Society. University of Utrecht (The Netherlands). 220 pp.

Hiruta, O. T., F. H. Takebe, A. Satoh, Y. Kamisaka, T. Yokochi, T. Nakahara y O. Suzuki. 1996. Optimization and scale-up of  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM15-1, a high  $\gamma$ -linolenic acid producing mutant. J. Ferment Bioeng. 82: 366-370 p.

Howell, E. E. 1972. Studies on *Mortierella ramanniana*: II. Aspects of the ecology of two varieties. Transactions of the British Mycological Society. 58(2): 197-203 p.

Jarle, J. H. 2000. Bioenergy from brown seaweeds. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the academic title *Doktor ingeniør*. Department of Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology NTNU. Trondheim, Norway. 93 pp.

Jensem, A. y A. Haug. 1956. Geographical and seasonal variation in the chemical composition of *Laminaria hyperborea* and *Laminaria digitata* from the Norwegian coast. Norwegian Institute of Seaweed Research. University of Trondheim. Norway. Report No. 14. 20 pp.

Jacobs, A., A. Botha y W. H. Van Zyl. 2009. The production of eicosapentaenoic acid by representatives of the genus *Mortierella* grown on brewers' spent grain. Section Cellular and Molecular Biology. 64(5): 1-6 p.

Ji, Y., K. Zhu, H. Qian y H. Zhou. 2007. Effect of water activity and temperature on growth of *Penicillium citreoviride* and *Penicillium citrinum* on MiGao (rice cake). Can. J. Microbiol. 53(2):231-236 p.

- Kalscheuer, R., T. Stölting y A. Steinbüchel. 2006. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*. 152:2529-2536 p.
- Karleskint, G., R. Turner y J. W. Small. 2010. *Introduction to Marine Biology*. Cengage learning. Tercera edición. 565 pp.
- Kassim, M. Y. y K. Shamsheer. 1996. Effect of Temperature on Growth of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum candidum* on Agar and on citrus fruit and chemical control of post-harvest rot caused by the two fungusources. *Journal of King Saud University.Science*. 8(1): 33-38 p.
- Kavadia, A., M. Komaitis, I. Chevalot, F. Blanchard, I. Marc y G. Aggelis. 2001. Lipid and  $\gamma$ -linolenic acid accumulation in strain of Zygomycetes growing on glucose. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78, 341-346 p.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi Biology and applications*. John Wiley and sons. Primera edición. Inglaterra. 297 pp.
- Kendrick, A., y C. Ratledge. 1992. Lipid fromation in the oleaginous mould *Entomophthora exitialis* grown in continuous cultura: efectos of growth rate, temperatura and disolved oxygen tensión on polyunsaturated fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:18-22 p.
- Kim, S. W., H. J. Hwang, C. P. Xu, Y. S. Na, S. K. Song y J. W. Yun. 2002. Influence of nutritional condicions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairri*. *Applied Microbiology*. 34: 389-393 p.
- Knothe, G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on thestructure of fatty acid alkyl esters.*Fuel Processing Technology*. 86: 1059-1070 p.

Koike, Y., H. J. Cai, K. Higashiyama, S. Fujikawa y E. Y. Park. 2001. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpina*. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 382-389 p.

Krawczyk, T. 1996. Biodiesel Alternative Fuel Makes Inroads But Hurdles Remain. *American Oil Chemists Society.* 7(8): 801-815 p.

Lacey, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement.* 11 - 25 p.

Laoteng, K., C. Anjard, S. Rachadawong, M. Tanchicharoen, B. Maresa y S. Cheevadhanarak. 1999. *Mucor rouxii*: D9 desaturase gene is transcriptionally regulated during cell growth and by low temperatura. *Mol Cell. Biol. Res Com.* 1:36-43 p.

Larone, D. H. 1995. *Medically Important Fungi - A Guide to Identification.* American Society Microbiology. Tercera edición Washington, D.C. 400 pp.

Laukevics, J. J., A. F. Aspite, H. E. Viesturs y R. P. Tengerdy. 1984. *Biotechnology and Bioengineering.* 26: 2465-2474 p.

Lee, I., L. A. Johnson y E. G. Hammond. 1995. Use of branched-chain esters to reduce the crystallization temperature of biodiesel. *JAOCS.* 72:1155-1160 p.

Lekha, P. K. y B. K. Lonsane. 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid state, liquid surface and submerged fermentation. *Process Biochem.* 29, 497-503 p.

Li Q. y M. Y. Wang. 1997. Use food industry waste to produce microbial oil. *Science and Technology of Food Industry.* 6:65-69 p.

Libkind, D., M. T. Arts y M. Van Broock. 2008. Fatty acid composition of cold-adapted carotenogenic basidiomycetous yeasts. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 193-197 p.

Lomascolo, E., E. Dubreucq, V. Perrier y P. Galzy. 1994. Mycelial lipid composition of tree *Penicillium* strains. *J. Dairy Sci.* 77:2160-2167 p.

Luppi, M. M. 1960. Sobre la microflora del terreno de un bosque de *Pinus nigra* Arnold, var. Laricio Poir. Trabajo No. 30 del Centro di Studio per la Micologia del terreno del Consiglio Nazionale delle Ricerche, dirigido por el Prof. Beniamino Peyronel en el Instituto y Orto Botánico de la Universidad de Turin. 91-108 p.

Ma, Y. L. 2006. Microbial oils and its research advance. *Chin J. Bioprocess Eng.* 4(4):7 -11 p.

Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 1999. Brock Biología de los microorganismos. Prentice Hall Iberia. Octava edición. Madrid. 1,064 pp.

Malthus, T. 1798. Principle of population. Primera edición. Library of economics and liberty. Londres. 22 p.

Meesters, P. A., G. N. Huijberts y G. Eggink. 1996. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 45: 575-579 p.

Meng, X., J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie y M. Xian. 2008. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy xxx*: 1-5 p.

Michell, D. A., Z. Targonski, J. Rogalski y A. Leonowicz. 1992. Substrates for processes. En: Doelle H. W., D. A. Mitchell y C. E. Rolz (eds.). *Solid substrate cultivation*. Elsevier. Applied science. Londres. 29-52 p.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar, *Anal. Chem.* 31(3): 426-428p.

Mittelbach, M. y P. Tritthart. 1988. Diesel Fuel Derived from Vegetable Oils, III. Emission Tests Using Methyl Esters of Used Frying Oil. *JAOCS*. 65(7): 1185-1187 p.

Mueller, G., G. Bills y M. Foster. 2004. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. Londres. 777 pp.

Müller, H. M., K. M. Wolf y A. Stachow. 1990. Effect of temperature on the growth of *Penicillium* from moldy feed. *Arch Tierernahr*. 40(9):861-869 p.

Nagao, K., T. Ota, A. Tanikawa, Y. Takae, T. Mori, S. Udagawa y T. Nishikawa. 2005. Genetic identification and detection of human pathogenic rhizopus species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of RNA gene. *J Dermatol Sci*. 39:23-31p.

Nuero, O.M. y F. Reyes. 2002. Enzymes for animal feeding from *Penicillium chrysogenum* mycelial wastes from penicillin manufacture. *Letters in Applied Microbiology*, 34:413-416 p.

Otto, J. H. y A. Towle. 1995. *Biología Moderna*. McGraw Hill Interamericana de México S. A. de C. V. Onceava edición. México, D. F. 205 - 209 pp.

Pandey, A., C. R. Soccol, J. A. Rodriguez-Leon y P. Nigam. 2001. *Solid-State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications*. Asiatech Publishers, Inc. Primera edición. New Delhi. 221 pp.

Papanikolaou, S., I. Chevalot, M. Komaitis, I. Marc y G. Angelis. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivate of animal fat in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 58: 308-312 p.

Papanikolaou, S., M. Komaitis y G. Aggelis. 2004. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*. 95: 287-291 p.

Paulson, N. D y R. G. Ginder. 2007. The growth and direction of the biodiesel industry. Working Paper 07-WP 448, Center for Agricultural and Rural Development, Iowa State University. 29 pp.

Pazouki, M., G. Najafpour y R. H.Mohammad. 2008. Kinetic models of cell growth, substrate utilization and bio-decolorization of distillery wastewater by *Aspergillus fumigates* UB260. African Journal of Biotechnology. 7(9):1369-1376 p.

Peberdy, F. J. 1937. Biotechnology handbooks. *Penicillium* and *Acremonium*. Plenum Press. Primera edición. New York. 307 pp.

Pitt, J. I. 1981. Food spoilage and biodeterioration. En: G. T. Cole y B. Kendrick. Biology of conidial fungi. Volumen 2. Academic Press. Nueva York. 111-142 p.

Pitt, J. I. y Hocking. 1997. Fungi and food spoilage. Segunda edición. Blackie Academic Professional. Londres. 593 pp.

Poggi-Varaldo, H. M. y N. S. Rinderknecht. 1990. Manual de técnicas analíticas para residuos sólidos. CINVESTAV del IPN. 26 pp.

Prill, E. A., P. R. Wenck y W. H. Peterson. 1935. The chemistry of the mold tissue. Factors influencing the amount and nature of the fat produced by *Aspergillus fischeri*. Biochem J. 29:21-33 p.

Quiang, Li., D. Wei y L. Dehua. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. Appl Microbial Biotechnol. 80:749-756 p.

Raimbault, M. 1998. General and microbial aspects of solid state fermentation. Electronic Journal of Biotechnology. 1(3): 174-188 p.

Rasheva, T., A. Kujumdzieva y J. N. Hallet. 1997. Lipid production by *Monascus purpureus* albino strain. Journal of Biotechnology. 56 (3): 217-224 p.

Ratledge, C. 1987. Lipid Biotechnology, a wonderland for the microbial physiologist. J. Am. Oil Chem. Soc. 64:1647-1656 p.

Ratledge C. 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. En Kamel B. S. y Y. Kakuda. Technological advances in improved and alternative source of lipids. Blackie academic and profesional. Londres. 235-291 p.

Ratledge, C. 1997. Microbial lipids. En: H. J. Rehm y G. Reed (eds.). Biotechnology. Segunda edición. Volumen 7. Alemania. 133-197pp.

Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Biochemical Society Transactions. 30: parte 6.

Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. Biochimie. 86: 807-815 p

Ratledge, C. y J. Wynn. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Adv Appl Microbiol. 51:1-51 p.

Redondo, C., J. Cubero y P. Melgarejo. 2009. Characterization of *Penicillium* species by ribosomal DNA sequencing and BOX, ERIC and REP-PCR analysis. Mycopathologia. 168:11-22 p.

Rockwell, T. K., D. R. Muhs, G. L. Kennedy, M. E. Hatch, S. H. Wilson y R. E. Kingler. 1989. Uranium-series ages, faunal correlations and tectonic deformation of marine terraces within the Agua Blanca fault zone at Punta Banda, Northern Baja California, México. En: P.L. Abbott (ed.). Geologic studies in Baja California: Society of Economic Paleontologists and Mineralogists Pacific Section, Los Angeles, California. 1-16 p.

Rodríguez, C. S., M. A. Longo, C. Cameselle y A. Sanromán. 1999. Ligninolytic enzymes from corn cob cultures of *Phanerochaete chrysosporium* under semi-solid-state conditions. Biotechnol. Lett. 19(1):17-25 p.

Rodríguez, Z., A. Elías, R. Bocourt y O. Nuñez. 2001. Efecto de niveles de nitrógeno ureico en la síntesis proteica durante la fermentación de mezcla de caña (*Saccharum officinarum*) y boniato (*Ipomea batata* Lam.). Rev cubana. Cienc. agric. 35:29 p.

Rozman, D., E. Pertot, I. Belic y R. Komel. 1985. Soybean peptones as nutrients in the fermentative production of Clavine ergot alkaloids with *Claviceps fusiformis*. 7 (8): 563-566 p.

Ruiz, L. H., R. M. Rodríguez, R. R. Herrera, J. C. Contreras y C. N. Aguilar. 2007. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista mexicana de Ingeniería Química*. 6(1):33-40 p.

Ruiz, N., N. Duboisb, G. Wielgosz-Collina, T. Robiou du Ponta, J. P. Bergéb, Y. F. Pouchusa y G. Barnathan. 2007. Lipid content and fatty acid composition of a marine-derived *Trichoderma longibrachiatum* strain cultured by agar surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry*. 42(4) 676-680 p.

Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4(4):406 – 425 p.

Saksena, R. K., F. N. Krishna y A. K. Sarbhoy. 1966. Ecology of the soil fungi of Uttar Pradesh. II. Soils of the Himalayan forest and their microfungi. 33: 144-153 p.

Sato, K. y S. Sudo. 1999. Small scale solid state fermentations. En: A. L. Demain y J. E. Davies (eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press. Segunda edición. Washington D. C. 61-79 p.

Sattler, L. y F. W. Zerban. 1948. The phenol reaction affected by carbohydrate structures. *Sciences*. 108-207 p.

Saucedo-Castañeda, G., B. K. Lonsane, M. M. Krishnaiah, J. M. Navarro, S. Roussos y M. Raimbault. 1992. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry* 27:97-107 p.

Saucedo-Castañeda, G., B. K. Lonsane, J. M. Navarro, S. Roussos y M. Raimbault. 1992a. Potential of using a simple fermenter for biomass built up, starch hydrolysis and ethanol

production: Solid state fermentation system involving *Schwanniomyces castellii*. Applied Biochemistry and Biotechnology 36:47-61 p.

Scott, J. 2004. Genotypic variation in *Penicillium chrysogenum* from indoor environments. Mycologia. 96(5):1095-1105.

Sergeeva, Y. E., L. A. Galanina, D. A. Andrianova y E. P. Feofilova. 2008. Lipids of filamentous fungi as a material for producing biodiesel fuel. Applied Biochemistry and Microbiology. 44(5): 523-527 p.

Serviere-Zaragoza, E. D., A. Mazariegos-Villareal, G. Ponce-Díaz y S. Montes-Magdalón. 2001. Growth of juvenile abalone, *Haliotis fulgens* Philippi, fed different diets. Journal of Shellfish Research. 20(2): 689-693 p.

Serviere-Zaragoza, E. D., F. Gómez-López y G. Ponce-Díaz. 2002. Gross chemical composition of three common macroalgae and sea grass on the Pacific coast of Baja California, México. Hidrobiológica. 12(2): 113-118 p.

Shih, C. N. y E. H. Marth. 1974. Some cultura conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. Applied microbiology. 27(3):452-456 p.

Shimi, I. R., J. Singh y T. Walker. 1959. The Component Fatty Acids of *Penicillium spinulosum*. Fat. Biochem J. 72:184-187 p.

Shimp, J. L. y J. E. Kinsella. 1977. Lipids of *Penicillium roqueforti*. Influence of culture temperature and age on unsaturated fatty acids. J. Agric. Food Chem. 25 (4):793-798 p.

Shriner, C. K., T. C. Hermann, D. Y. Morrill y R. C. Curtin. 1997. The Systematic Identification of Organic. Wiley & Sons, Inc. Séptima edición. New York. 656 pp.

Shomashekar, D., G. Venkateshwaran, K. Sambaiah y B. R. Lokes. 2003. Effect of culture conditions on lipid and  $\gamma$ -linoleic acid production by mucoraceous fungi. *Proc. Biochem.* 38:1719-1724 p.

St-Germain, G. y R. Summerbell. 1996. *Identifying Filamentous Fungi. A Clinical Laboratory Handbook.* Star Publishing Company. Primera edición. Belmont, California. 314 pp.

Stredansky, M., E. Conti, S. Stredanska y F. Zanetti. 2000.  $\gamma$ -Linolenic acid production whit *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on Apple pomace. *Bioresource Technology.* 73(1):41-45 p.

Stylianou, F., M. Certik, S. Papanikolaou, M. Komaitis y M. G. Panayotou. 2008.  $\gamma$ -linoleic production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology.* 99(13):5986-5990 p.

Stylianou, F., S. Papanikolaou, A. Batsos, M. G. Panayotou, A. Mallouchos y G. Angelis. 2009. Evaluating renewable carbón sources as substrates for single cell oil by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy.* 33(4):573-580 p.

Sukanya, J., K. Laoteng, M. Tanticharoen y S. Cheevadhanarak. 2006. Comparative fatty acid profiling of *Mucor rouxii* under different stress conditions. *FEMS. Microbiol Lett* 259: 60-66 p.

Sumner, J. L., E.D. Morgan y H. C. Evans. 1969. The effect of temperatura on the fatty acid composition of fungi in the order Mucorales, *Can. J. Microbiol.* 15:515-520 p.

Tauk-Tornisielo, S. M., M. J. Vieira, M. Cecília, V. S. Carneiro y J. S. Govone. 2007. Fatty acid production by four strains of *Mucor hiemalis* grown in plant oil and soluble carbohydrates. *African Journal of Biotechnology.* 6 (15): pp. 1840-1847 p.

Tauk-Tornisielo, S. M., L. S. Arasato, A. F. De Almeida, J. S. Govone y E. N. Malagutti. 2009. Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40:342-345 p.

Thanh, N. C. y R. E. Simar. 1973. Biological treatment of domestic sewage by fungi. *Mycopathol. Mycol. Applicata*. 51: 223-232 p.

Trejo, H. M., B. K. Lonsanne, M. Raimbault y S. Roussos. 1993. Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029c in solid-state fermentation system: influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar-cane pith bagasse. *Process Biochemistry*. 28(1): 23-27 p.

Van Etten, J. L. y D. Gottlieb. 1965. Biochemical changes during the growth of fungi: II. Ergosterol and fatty acids in *Penicillium atrovirens*. *Journal of Bacteriology*. 89(2):409-414 p.

Vázquez, D. A. 2000. *Diccionario de Ciencias*. Complutense. Primera edición. España. 1126 pp.

Veerapagu, M., K. R. Jeya, K. Ponmurugan. 2008. Mutational effect of *Penicillium chrysogenum* Antibiotic Production. *Advanced Biotech*. 23:16- 19 p.

Vega, E., B. A. Glatz y E. G. Hammond. 1988. Optimization of Banana Juice Fermentation for the Production of Microbial oil. *Applied and environmental microbiology*. Mar. 54(3): 748-752 p.

Walpole, R. E. 1999. *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Sexta Edición. México, D.F. pp. 565-567.

Watson, K. 1984. Membrane lipid adaptation in yeast. En: M. Kates y L. Manson (eds.). *Membrane fluidity*. Plenum Publ. Corp. 517 pp.

Wheeler, K. A., B. F. Hurdman, J. I. Pitt, K. A. Wheeler, B. F. Hurdman y J. I. Pitt. 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int. J. Microbiol.* 12 (2-3):141- 149 p.

Whistler, L. R. y M. L. Wolfrom. 1964. *Methods in carbohydrate chemistry*. Academic Press. New York. 393 p.

White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee y J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics. En: M. A. Innes, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (eds.). *PCR Protocols: a guide to the methods and applications*. New York: Academic Press. 315–322 p.

Uraguchi, K. 1969. Mycotoxic origin of cardiac beriberi. *Journal of Stored Products Research.* 5(3):227-236 p.

Wynn, P. J., A. Kendrick y Ratledge C. 1997. Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids.* 32(6): 605-610 p.

Ying, Z., P. Ian, R. Adams y C. Ratledge. 2007. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology.* 153:2013-2025 p.

Ykema, A., E. C. Verbree, M. M. Kater y H. Smit. 1988. Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 29:211-218 p.

Yun-Hua, H., W. Tian-Hong, L. Hao y Z. Hui-Yuan. 2006. Novel Cold-adaptive *Penicillium* strain FS010 secreting thermo-labile xylanase isolated from yellow Sea. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 38(2):142-149 p.

Zandrazil, F. y H. Brunert. 1981. Investigation of physical parameters important for solid-state fermentation of straw by white rot fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11, 183-188 p.

Zar, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Tercera edición. New Jersey. 662 pp

Zhang, Y., M. A. Dube, D. D. McLean y M. Kates. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil. Process design and technology assessment. *Bioresour. Technol.* 89 (1): 1-16 p.

Zohar, K., D. Friesem y Y. Hadar. 1992. Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 58(4): 1121-1127 p.

Zor, T. y Z. Selinger. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 236: 302-308 p.

Zhu, H. 2002. Utilization of rice bran by *Pythium irregulare* for lipid production. A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of therequirements for the degree of Master of Science in Biological and Agricultural Engineeringin The Department of Biological and Agricultural Engineering. 79 pp.

Zyska, B. 1997. Fungi isolated from library materials: a review of literature. *Int. Biodet. and biodeg.* 40(1): 43-51 p.

## VII. ANEXOS

### VII.1 Caracterización del sustrato.

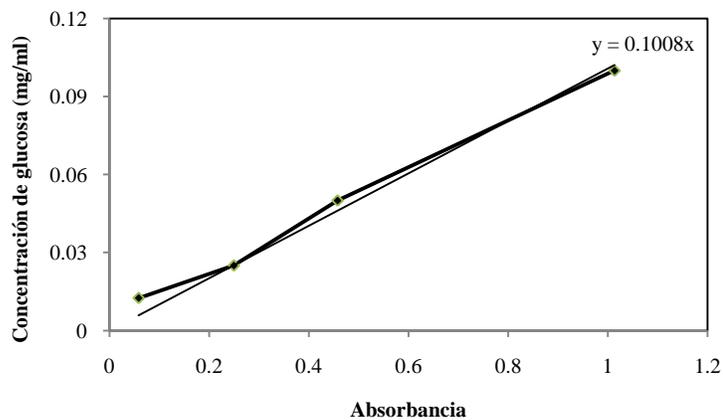


Figura A 1 Curva de calibración para la evaluación de Carbohidratos totales por el método Fenol.

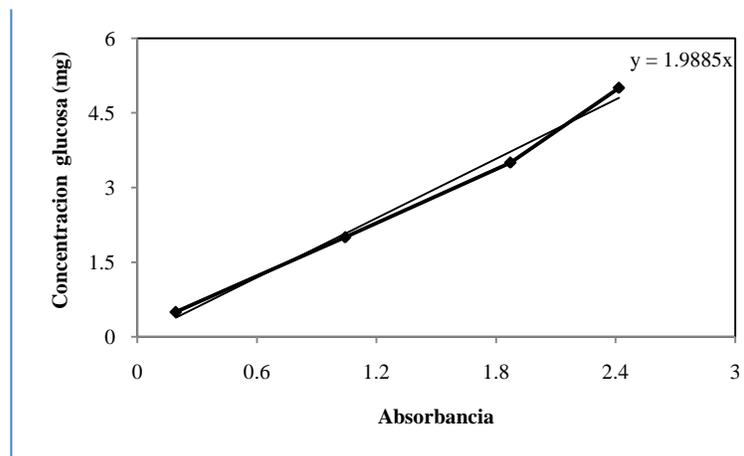


Figura A 2 Curva de calibración para la evaluación de Azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalísílico.

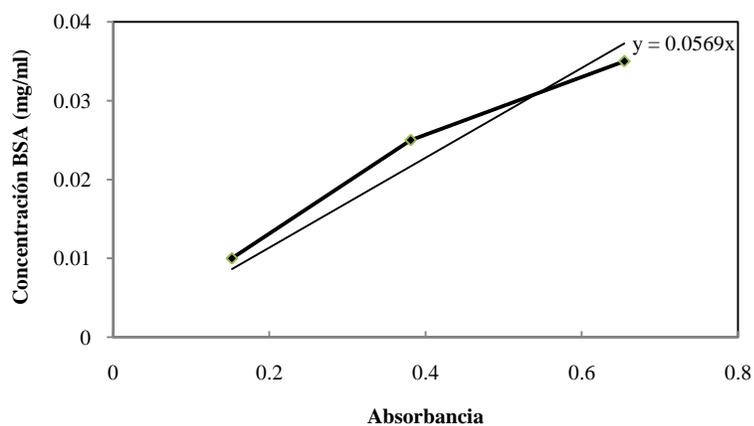


Figura A 3 Curva de calibración para la evaluación de Proteínas por el método Bradford.

## VII.2. Determinación de condiciones óptimas de crecimiento

Tabla A I. Análisis de Varianza para evaluar la temperatura y pH óptimos de crecimiento de la cepa M7.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>	Valor P
Modelo	120.21	5	24.04	72.12	0.0137
A: Temperatura	14.74	1	14.74	44.22	0.0219
B: pH	26.33	1	26.33	78.98	0.0124
A <sup>2</sup>	9.04	1	9.04	27.13	0.0349
B <sup>2</sup>	23.04	1	23.04	69.12	0.0142
Interacción: AB	42.20	1	42.20	126.60	0.0078
Pure Error	0.67	2			
Total	120.88	7			

**Tabla A II. Análisis de Varianza para evaluar la temperatura y pH óptimos de crecimiento de la cepa M11.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F<sub>0</sub></b>	<b>Valor P</b>
Modelo	70.21	5	14.04	42.13	0.023
A: Temperatura	0.15	1	0.15	0.46	0.569
B: pH	0.32	1	0.32	0.96	0.429
A <sup>2</sup>	22.48	1	22.48	67.43	0.014
B <sup>2</sup>	11.57	1	11.57	34.71	0.027
Interacción: AB	39.68	1	39.68	119.0	0.008
Error	0.67	2	0.33		
Total	70.88	7			

### VII.3. Fermentación en sustrato sólido.

Tabla A III. Análisis de Varianza para evaluar el efecto de la temperatura, humedad, relación C/N y oxígeno sobre la producción de ácidos grasos.

Fuente	Suma de cuadrados	DF	Media cuadrática	Valor de F	Prob>F
Modelo	0.056	15	3.77E-003	8.16	<0.0001
A:C/N	4.63E-003	1	4.63E-003	10.01	0.006
B:Oxígeno	3.78E-006	1	3.78E-006	8.17E-003	0.929
C:Humedad	0.041	1	0.041	89.16	<0.0001
D:Temperatura	2.86E-003	1	2.86E-003	6.200	0.024
Interacción AB	4.43E-004	1	4.43E-004	0.960	0.343
InteracciónAC	2.26E-004	1	2.26 E-004	0.490	0.495
InteracciónAD	3.32 E-004	1	3.32 E-004	0.720	0.410
InteracciónBC	6.04 E-004	1	6.04 E-004	1.300	0.270
InteracciónBD	2.28 E-005	1	2.28 E-005	0.049	0.828
InteracciónCD	3.76 E-003	1	3.76 E-003	8.13	0.012
InteracciónABC	1.19 E-003	1	1.19 E-003	2.57	0.129
InteracciónABD	9.35 E-004	1	9.35 E-004	2.02	0.174
InteracciónACD	2,82 E-004	1	2,82 E-004	0.61	0.446
InteracciónBCD	4.75 E-005	1	4.75 E-005	0.10	0.753
InteracciónABCD	5.28 E-006	1	5.28 E-006	0.011	0.916
Error	7.40 E-003	16	4.63 E-004		
Total	0.064	31			

