



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

U A A A N
RECIBIDO
15 DIC 2017
HORA: 1:32

Proyecto de Investigación 2018

Formulario de datos del proyecto: Unidad: Saltillo, División: Ciencia Animal, Departamento: Ciencia y Tecnología de Alimentos, Tema estratégico: Biotecnología, etc.

Table with 5 columns: Participantes, Adscripción (Clave Depto.), Expediente No., Firma. Rows include Responsable (Dr. Armando Robledo Olivo) and several Collaborators.

Table with 5 columns: Tesista, Programa Docente, Grado por obtener, Matrícula, Firma. Rows include Mariela Chávez García and Dary Celina Zarate Vargas.

Signature section with 'Vo. Bo.' and 'Autoriza' fields, including a stamp of the Department of Food Science and Technology and signatures of Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez and Dr. Armando Robledo Olivo.

Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Producción biotecnológica de ácido kójico y su efecto en germinación en semillas de tomate bola	\$75,000
---	----------

2.- Introducción

Las semillas son la base principal para el sustento humano, no sólo porque constituyen el principal método de propagación de las plantas, sino porque también son importante fuente de alimento. Es por ello por lo que la supervivencia de la semilla es fundamental para alcanzar una exitosa germinación, implantación y posterior crecimiento, que resulte en un buen rendimiento del cultivo.

La semilla una vez madura está sujeta a presiones selectivas de distinta naturaleza; por un lado, debe ser exitosa en la dispersión, en el establecimiento en un ambiente apropiado y en sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables: agua, luz, temperatura, presencia de patógenos, predadores y competidores. Las condiciones desfavorables que deben soportar las semillas durante el proceso de germinación pueden ser mejoradas mediante la aplicación de estimulantes de germinación.

Según datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [1], las plantas representan más del 80% de la dieta y la nutrición humanas. De ellas, 30 especies de plantas son los cultivos que alimentan al mundo (entre ellas el tomate), mientras que sólo cinco cereales (arroz, trigo, maíz, mijo y sorgo) proporcionan el 60% del aporte calórico de la población mundial.

Para 2050, cuando está previsto que el crecimiento de la población mundial lleve a más de 9,000 millones de habitantes en el planeta, debe lograrse un aumento del 60% en la producción de alimentos [1]. Es así como surge la necesidad de un rápido aumento de las áreas de producción y de los rendimientos de los cultivos en la mayoría de los países, basados en una agricultura sustentable.

Las semillas en algunos casos pueden ser consideradas viables, pero ser incapaces de germinar. Esta característica se denomina latencia, y es un mecanismo de supervivencia a condiciones adversas del clima como: temperaturas bajas, alternancias de épocas secas y húmedas y climas desérticos, esto resulta poco ventajoso cuando se pretende cultivarlas.

Diversas sustancias con grupos funcionales determinados pueden favorecer el control y promoción de la germinación de la semilla.

Tal es el caso del ácido kójico, un ácido orgánico y metabolito secundario secretado por varios microorganismos del género *Aspergillus*, *Penicilium* y *Mucor*, que presenta grupos funcionales similares a las giberelinas, sustancias ampliamente utilizadas en la germinación de semillas. En la actualidad, no se han encontrado reportes de la utilización de un extracto crudo que contenga ácido kójico y favorezca la germinación de semillas.

Por lo anterior, la presente investigación se enfocará en producir biotecnológicamente el ácido kójico, y analizar su efecto en la germinación de semillas de tomate.

3.-Objetivos

Objetivo general:

- Producir ácido kójico mediante fermentación en líquido, para su aplicación como estimulante en el proceso de germinación de semilla de tomate.

Objetivos específicos:

- Aislar un microorganismo del género *aspergillus* sp. Con capacidad de producción de ácido kójico.
- Estandarizar y optimizar las condiciones de producción del extracto con el metabolito de interés, empleando residuos de la industria vitivinícola en fermentación en medio líquido.
- Aplicar el extracto de fermentación rico en ácido kójico, en la germinación de semillas de tomate.

Hipótesis

La aplicación de un extracto rico en ácido kójico, permitirá estimular la germinación de semillas de tomate.

3.-Revisión de Literatura

Semillas

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de las plantas superiores terrestres y acuáticas. Ésta desempeña una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas, la regeneración de los bosques y la sucesión ecológica. En la naturaleza la semilla es una fuente de alimento básico para muchos animales. También, mediante la producción agrícola, la semilla es esencial para el ser humano, cuyo alimento principal está constituido por semillas, directa o indirectamente, que sirven también de alimento para varios animales domésticos.

La semilla es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones de plantas, para la reforestación, para la conservación del germoplasma vegetal y para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas. Las semillas pueden almacenarse vivas por largos periodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas.

Germinación y plántula

La germinación de las semillas comprende tres etapas sucesivas que se superponen parcialmente:

- 1) La absorción de agua por imbibición, causando su hinchamiento y la ruptura final de la testa;
- 2) El inicio de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones en crecimiento del embrión.
- 3) El crecimiento y la división celular que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula. En la mayoría de las semillas el agua penetra inicialmente por el micrópilo y la primera manifestación de la germinación exitosa es la emergencia de la radícula.

Cultivo de tomate

La producción de tomate representa cerca del 33 por ciento de la producción hortícola mundial. El área de cultivo de esta hortaliza se ha incrementado en 18.8 por ciento, al pasar de 3'892,820 hectáreas a 4'643,957 hectáreas, los mayores productores son China, Estados Unidos, India y Turquía [2]. El cultivo del tomate, en México es de gran importancia, porque se produce durante todo el año; en los primeros meses, es cuando se genera el tope de producción nacional, en el estado de Sinaloa, que abastece al mercado nacional y la mitad del norteamericano. Durante el verano, la producción de los estados del centro y de Baja California, es la que abastecen la demanda interna y de exportación y finalmente, en los meses de agosto a diciembre, son otras entidades las que cubren la producción [3].

Ácido kójico

El ácido kójico es un ácido orgánico y es un metabolito secundario secretada por varios microorganismos del género *Aspergillus*, tales como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus* [4]. Ha habido 58 cepas diferentes usadas para la producción de ácido kójico son *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* como principales [5]. El ácido kójico también puede ser producido mediante el uso de varias plantas, tales como *Kigella africana* [6].

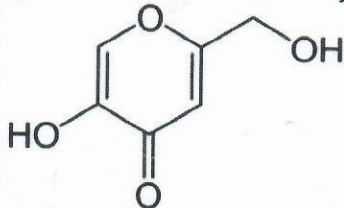
Características principales

El ácido kójico se puede sintetizar artificialmente a partir de la conversión química de diversos sustratos, comercialmente es producido por la fermentación aeróbica por la especie de *Aspergillus* y es una de las mejores prácticas se están llevando a cabo en las industrias.

La estructura química se determinó como 5-hidroxi-2-hidroximetil- δ -pirona por Yabuta en 1924 [7]. Es de múltiples funciones y que tiene débiles propiedades ácidas. El origen natural de ácido kójico no es peligroso, la degradación del esqueleto hace que sea atractiva y rentable para el desarrollo de compuestos biológicos activos por su derivación.

Propiedades físicas del ácido kójico.

1) La estructura del ácido kójico se determina como 5-hidroxi-2-hidroximetil- δ -pirona. [8].



2) La fórmula molecular del ácido kójico es $C_6H_6O_4$ y el peso molecular es 142.11g / mol [9].

3) El ácido kójico cristaliza en forma de agujas incoloras, que subliman bajo prismáticas condiciones de vacío sin ningún cambio. [10]

4) Punto de fusión de cadenas de ácido kójico entre 150-160°C [11,12]

Propiedades químicas.

1) El ácido kójico es soluble en sustancias polares como el agua, etanol, acetato de etilo etc. Pero es menos soluble en cloroformo, éter, etc.

2) La molécula de ácido kójico es reactivo en cada posición en un anillo.

El ácido kójico tiene muchas aplicaciones industriales y su demanda está aumentando a medida que se aplica a las diversas áreas relativas a la salud, la agricultura, procesamiento de alimentos, industrias cosméticas y muchas otras industrias químicas, etc.

Aplicaciones

El ácido kójico tiene muchas aplicaciones industriales y su demanda está aumentando a medida que se aplica a las diversas áreas relativas a la salud, la agricultura, procesamiento de alimentos, industrias cosméticas y muchas otras industrias químicas.

El ácido kójico tiene varios usos económicos en diversos campos. En el campo **médico**, el ácido kójico se utiliza como un agente antibacteriano y anti fúngico. En las industrias **químicas** de que ha sido utilizado con éxito para hacer colorantes azoicos y algunos otros compuestos importantes y bio-degradables. En la industria **alimentaria**, el ácido kójico se usa como un anti-mota y anti-melanosis (ennegrecimiento de producto) agente de los productos agrícolas.

El ácido kójico podría ser económicamente importante en el proceso de post cosecha. Además, el ácido kójico también se utiliza como un agente quelante y el activador de la producción de insecticidas.

En la **industria alimentaria**, el ácido kójico se utiliza como un agente para prevenir la melanosis indeseable (Ennegrecimiento) de productos agrícolas, tales como verduras, frutas y crustáceos durante almacenamiento. El ácido kójico tiene la capacidad de inhibir la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO) cuando estos productos están expuestos al oxígeno [13].

El ácido kójico es ampliamente utilizado en la **agricultura** como un agente quelante y activador para la producción de

insecticidas. Se han diseñado dos ligandos compuestos de moléculas de vaniline y O-vaniline, cada molécula con dos moléculas de ácido kójico que se unieron con el grupo metileno, han demostrado ser potentes quelantes de hierro y aluminio [14].

La adición de ácido kójico 5% aumenta la toxicidad de los insecticidas nicotina de 5 a 35% [15,16]. Los compuestos naturales que presentan efectos secundarios significativos en el medio ambiente o medicinales son fuentes potenciales de agentes antifúngicos en la agricultura, ya sea en forma normal o como una espina dorsal estructural de derivados orgánicos más eficaces y eficientes.

Fuentes de obtención

El ácido kójico es producido industrialmente por especies de *Aspergillus* en fermentación aeróbica. La producción de ácido kójico incluye las siguientes principales tres etapas:

- 1) El desarrollo del inóculo
- 2) Bio- producción de ácido kójico
- 3) Extracción y Purificación de ácido kójico

Hay algunos factores que afectan a la fermentación de ácido kójico incluyen: los microorganismos que producen, los medios de producción, el tipo de operación de la fermentación, condiciones, la aireación y la agitación y minerales.

Los factores fisiológicos que afectan a la producción del ácido kójico son:

1. pH
2. Temperatura
3. Humedad

Fermentación en medio líquido

La fermentación en estado líquido o fermentación sumergida (FEL) es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir que hay una solución de los nutrientes [17]. Es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencillo, pueden controlarse muchas más variables que en la fermentación en estado sólido (FES) y el producto final es mucho más fácil de recuperar. En ella los microorganismos se desarrollan flotando en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliales, éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas "pellets" cuando hay agitación, de otra forma, crecen en la superficie. En la FEL el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, dando origen a una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y la última, la fase de muerte. La FEL a su vez puede dividirse en continua, por lote y alimentada, según la entrada y salida tanto del sustrato como del producto, respectivamente.

Uso de residuos agroindustriales en fermentación

En la agroindustria, las materias primas son sometidas a procesos de adecuación o transformación para darle valor agregado, mediante la implementación de operaciones unitarias para facilitar su consumo; generando una de las principales problemáticas ambientales en nuestro medio, la alta producción de residuos. En algunos casos estos residuos son tratados; hasta reducir el impacto negativo que su emisión, vertimiento o disposición pudiera generar; convirtiéndolos en un producto útil y de mayor valor agregado que solucione una problemática y genere ingresos económicos adicionales.

Las pocas alternativas, desde el punto de vista económico, social y nutricional, que en la actualidad se presentan para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales, aunado a la falta de conciencia en la protección del medio ambiente provocan que estos sean mal manejados y se conviertan en fuentes de contaminación de los recursos naturales; suelo, agua y aire [18].

Los residuos agroindustriales presentan características fisicoquímicas adecuadas para utilizarse como sustratos en procesos de fermentaciones. En general tienen un alto contenido de polisacáridos de glucosa, como celulosa y hemicelulosa, esto es de suma importancia para que actúen como fuente de carbono para el crecimiento de los microorganismos.

Ubicación

El desarrollo de la investigación "Producción biotecnológica de ácido kójico y su efecto en germinación de semillas de tomate bola" se realizará en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos y en el Departamento de Horticultura.

Aislamiento de microorganismos

El microorganismo a utilizar será una cepa

- *Aspergillus* (DCTA-UAAAN)
- Aislada de zarzamora
- Aislada de pan

Identificación de microorganismos

La identificación de los microorganismos se realizará bajo tres métodos:

• Microscópica (Tinción con Lactofenol)

- 1.- Propagar la cepa mediante un asa metálica para hongos.
- 2.- Sellar la caja con plástico, abarcando la tapa y la base de la caja Petri, para evitar deshidratación del agar.
- 3.- Colocar las cajas en incubación a 30 °C con la tapa hacia abajo, para evitar condensación.
- 4.-Dejar en incubación de 6 a 7 días.
- 5.-Colocar una pequeña muestra del microorganismo con un asa metálica en un porta objeto, agregarle una gota de azul de algodón y cubrirlo con un cubre objetos.
- 6.-Observar al microscopio con un aumento de 40x cuidadosamente cada substrato infectado y determine el tipo de colonia que desarrolla.
- 6.-Describir el aspecto externo de las colonias de hongos.
- 7.-Comparar con la literatura.

• Macroscópica

- 1.- Propagar la cepa mediante un asa metálica para hongos.
- 2.- Sellar la caja con plástico, abarcando la tapa y la base de la caja Petri, para evitar deshidratación del agar.
- 3.- Colocar las cajas en incubación a 30 °C con la tapa hacia abajo, para evitar condensación.
- 4.-Dejar en incubación de 6 a 7 días.
- 5.-Observar cuidadosamente cada substrato infectado y determine el tipo de colonia que desarrolla.
- 6.-Describir el aspecto externo de las colonias de hongos.
- 7.-Comparar con la literatura.

• Identificación Molecular

Se empleará la secuenciación del gen 18s ribosomal y la comparación en el banco de genes NCBI, de los fragmentos amplificados de ADN por PCR en punto final.

Residuos de industria vitivinícola

- 1.-Obtener el bagazo de uva de una empresa vinícola de parras
- 2.-Realizar una deshidratación a 60°C por 48Horas
- 3.-Realizar una molienda
- 4.-Tamizar con mallas de diferentes tamaños #18, #30, #12
- 5.-Clasificar por tamaño de partícula

Proceso de fermentación en líquido

Producción utilizando residuos

- Propagar la cepa en agar PDA, incubando a 30°C durante 6-7 días. Cosechar con una solución de glicerol 20% (v/v)
- Realizar conteo de esporas para inocular 1×10^6 esporas por mL de medio.

- **Pre-tratar el material (molerlo y tratarlo térmicamente)**
- El medio para la fermentación consistirá en 100 g/L de **RESIDUO**, 5 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de fosfato de potasio monobásico y 0.5 g/L de sulfato de manganeso. El medio se ajustará a un pH de 3.0 [19].
- La fermentación se realizará en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de medio, tapados con algodón y gasa. La agitación será de 200 rpm y la temperatura a 30°C [19].

Optimización del proceso fermentativo

Optimización de la producción de ácido kójico

- En esta etapa se realizará un diseño de experimentos Taguchi L-8, analizando 4 factores (tamaño de partícula del sustrato, pH, relación glucosa-residuo y agitación durante la fermentación) en 2 niveles cada uno.
- Con los resultados obtenidos se realizará una última fermentación (por triplicado), confirmando los valores optimizados por el diseño.

Estudio de germinación en semillas

Germinar utilizando: ácido kójico estándar, AK de fermentación, ácido giberélico y un control. Se emplearán condiciones ideales y condiciones de baja humedad y de altas y bajas temperaturas (hacer diseño de experimentos)

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Revisión de literatura	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aislar e Identificar el microorganismo	x	x	x	x								
Estandarizar y optimizar					x	x	x	x	x	x	x	x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Revisión de literatura												
Aislar e Identificar el microorganismo		x	x									
Estandarizar y optimizar				x	x	x						

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- 1 artículo científico
- 2 tesis de Licenciatura
- 1 participación en un Congreso Nacional

6.-Literatura Citada

- 1.Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Semillas, 2017
- 2.Food and Agricultural Organization Statistical,FAOSTAT,2016).
- 3.Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA, 2010.
- 4.Rosfarizan M, Mohamed MS, Nurashikin S, Saleh MM, Ariff AB. Kojic acid: Applications and development of fermentation for production. Biotechnology and Molecular Biology. 2010;5(2):24-37.
- 5.El-Aziz ABA. Improvement of kojic acid production by a mutant strain of Aspergillus Flavus. Journal of Natural Sciences Research. 2013;3(4):31-41.

6. Eyong KO, Ambassa P, Yimdjo MC, Sidjui LS, Folefoc GL. A new source of kojic acid isolated from kigelia Africana: A possible precursor for quinine biosynthesis. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2012;5(4):477-480
7. Yabuta T. The constitution of kojic acid: A d-pyrone derivative formed by *Aspergillus flavus* from carbohydrates. *Journal of Chemical Society Transaction*. 1924;125:575-587.
8. Uchino K, Nagawa M, Tonosaki Y, Oda M, Fukuchi A. Kojic acid as an anti-spec agent. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1988;52(10):2609-2670.
9. Brtko J, Rondahl L, Fickova M, Hudecova D, Eybl V, Uher M. Kojic acid and its derivatives: History and present state of art. *Central European Journal of Public Health*. 2004;12:16-18.
10. Arnstein HRV., Bentley R. The biosynthesis of kojic acid: the incorporation of labeled small molecules into kojic acid. *Biochemistry*. 1953;54:517-522.
11. Kitada M, Ueyama H, Fukimbara T. Studies on kojic acid fermentation: Cultural condition in submerged culture. *Journal of Fermentation Technology*. 1967;45:1101-1107.
12. Kitada M, Kenaeda J, Miyazaki K, Fukimbara T, Studies on Kojic Acid (VI) production and recovery of kojic acid on industrial scale. *Journal of Fermentation Technology*. 1971;49(2):343-349.
13. Son SM, Moon KD, Lee CY. Inhibitory effects of various anti-browning agents on apple slices. *Food Chemistry*. 2000;73:23-30.
14. Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Murgia S, Arca M, Pintus A, Gans P, Gutierrez JN, Martin AD, Castineiras A, Remelli M, Szewczuk Z, Lis T. Kojic acid derivatives as powerful chelators for iron(III) and aluminium(III). *International journal of inorganic, organo-metallic and bioinorganic chemistry*. 2011; 22:59845998
15. Beelik A, Purves CB. Some new reactions and derivatives of kojic acid. *Canadian Journal of Chemistry*. 1955;33(8):1361-1374.
16. Buchta K. Organic acids of minor importance. In: Rehm HJ, Reed GH, Editors. *Biotechnology: A comprehensive treatise*. Weinheim: Verlag Chemie. 1983;3.
17. C. Suárez, I. Nieto. (2012), Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (Shiitake), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional, 2012. 122
18. K. Cury R, Y. Aguas M, A. Martinez M *et al.* Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de ciencia Animal –Recia*. 2017. 9,122.
19. Liu, J. M., Yu, T. C., Lin, S. P., Hsu, R. J., Hsu, K. D., & Cheng, K. C. (2016). Evaluation of kojic acid production in a repeated-batch PCS biofilm reactor. *Journal of biotechnology*, 218, 41-48.