

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS



POSGRADO

Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

TESIS

Desarrollo de un bioproceso para la producción de jasmonatos a partir de *Botryodiplodia theobromae*

QUE PRESENTA

M.C. Gerardo Rodríguez Cutiño

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre del 2018.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS

La Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila a través del comité de tesis hace constar que la tesis titulada:

Desarrollo de un bioproceso para la producción de jasmonatos a partir de *Botryodiplodia theobromae*

Presentada por el
M.C. Gerardo Rodríguez Cutiño

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

DIRECTORES

Dr. José Luis Martínez Hernández
Nanobiociencia-FCQ, Universidad Autónoma de Coahuila

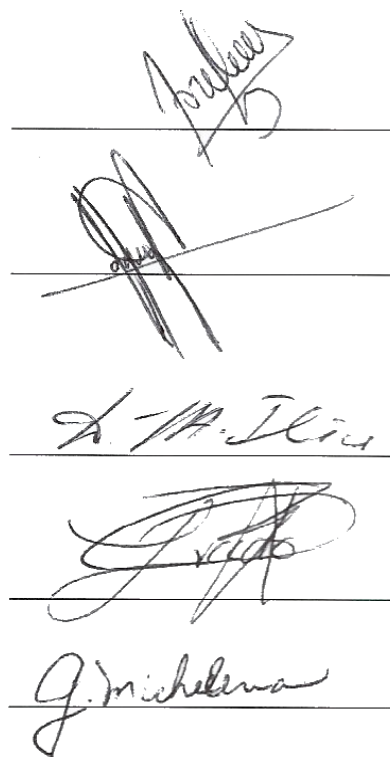
Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
DIA-FCQ, Universidad Autónoma de Coahuila

ASESORES

Dra. Anna Iliná
Nanobiociencia-FCQ, Universidad Autónoma de Coahuila

Dra. Lilia Arely Prado Barragán
Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Georgina Michelena Álvarez
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar



The image shows four handwritten signatures, each placed above a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the following individuals: José Luis Martínez Hernández, Cristóbal Noé Aguilar González, Anna Iliná, and Georgina Michelena Álvarez. The signatures are written in dark ink and are somewhat stylized.

El presente trabajo se ha desarrollado en el marco de las actividades establecidas por el Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila, el cual está incluido en el programa de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (PNPC) con número de registro: 002290.

La beca otorgada por el CONACYT durante el periodo de estudio corresponde al becario número 722895.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS

La Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila a través del jurado examinador hace constar que la tesis titulada:

Desarrollo de un bioproceso para la producción de jasmonatos a partir de
Botryodiplodia theobromae

Presentada por el
M.C. Gerardo Rodríguez Cutiño

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

En virtud de haber cumplido íntegramente los requisitos de la Comisión de Tesis y Monografías

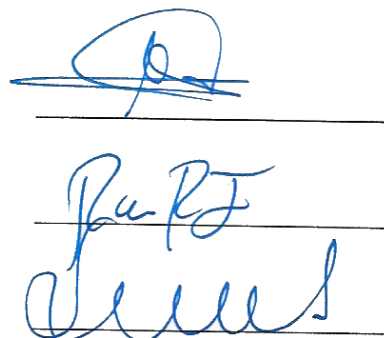
ATENTAMENTE

“EN EL BIEN FINCAMOS EL SABER”

Dr. Héctor Arturo Ruiz Leza
PRESIDENTE

Dra. Rosa María Rodríguez Jasso
SECRETARIA

Dr. José Sandoval Cortés
VOCAL



The image shows three handwritten signatures in blue ink, each positioned above a horizontal line. The top signature is a stylized, cursive 'H' or similar character. The middle signature appears to be 'R.M. Rodríguez Jasso'. The bottom signature is a cursive signature, likely 'J. Sandoval Cortés'.

DECLARACIÓN DE INTEGRIDAD

Por este medio yo declaro haber concluido mi tesis con integridad. Confirmando que no he recurrido al plagio o cualquier forma de falsificación de los resultados en el proceso de elaboración de la tesis.

Nombre completo: Gerardo Rodríguez Cutiño

Firma: 

Autor: Gerardo Rodríguez Cutiño

E-mail: geradorodriguezcutino@gmail.com

Teléfono: 8441891560

Pasaporte/IFE: I614147

Título de tesis: Desarrollo de un bioproceso para la producción de jasmonatos a partir de *Botryodiplodia theobromae*

Directores y asesores: Dr. José Luis Martínez Hernández, Dr. Cristóbal Noé Aguilar González, Dra. Anna Iliná, Dra. Lilia Arely Prado Barragán, Dra. Georgina Michelena Álvarez.

Año de conclusión: 2018

Facultad de Ciencias Químicas

ES AUTORIZADA LA REPRODUCCIÓN INTEGRAL DE ESTA TESIS/TRABAJO APENAS PARA EFECTOS DE INVESTIGACIÓN, MEDIANTE LA DECLARACIÓN ESCRITA DEL INTERESADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidad Autónoma de Coahuila, diciembre de 2018.

RESUMEN

La necesidad de contar con productos amigables con el medio ambiente, que pueden contribuir en la protección de las plantas, el aumento de rendimientos agrícolas, la formulación de alimentos, medicamentos y productos cosméticos es una demanda de la sociedad actual. Uno de estos productos son los jasmonatos a los que durante muchos años se le han encontrado múltiples beneficios en estos sectores. Sin embargo, se requieren nuevos procesos con mayor productividad y menores costos que permitan el uso extensivo de los jasmonatos. La vía microbiana a partir del hongo *Botryodiplodia theobromae* y mediante un proceso de fermentación en medio sólido ofrece la oportunidad de desarrollar procesos más productivos y el aprovechamiento de residuos industriales que en muchos casos constituyen problemas medioambientales. Teniendo lo anterior el presente estudio tiene como objetivo diseñar un biorreactor en columna a escala de banco que permita evaluar los sistemas cinéticos y transporte de calor y masa de un proceso de producción de jasmonatos por *Botryodiplodia theobromae* en fermentación sólida utilizando un residuo industrial.

Para esto inicialmente se desarrolló un proceso de recuperación de jasmonatos, para su uso en fermentos sólidos. Se evaluaron como solventes el metanol, acetona, y el acetato de etilo para la recuperación de ácido jasmónico (AJ). Para el estudio se utilizaron como matriz residuos de naranja a los que se le adicionó AJ estándar y se le ajustó la humedad al 70 %. Los parámetros estudiados fueron el tiempo de extracción, la relación líquido-sólido, la velocidad de agitación, la temperatura y el número de extracciones. Como variable respuesta se cuantificó el AJ mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se obtuvieron las condiciones más favorables utilizando el acetato de etilo, con un tiempo de contacto 30 min, relación líquido-sólido 5 mL/g, velocidad de agitación 120 rpm, temperatura 30 °C y 3 extracciones. Estas condiciones fueron validadas obteniendo un rendimiento en el proceso de recuperación de 97 %.

Se utilizaron residuos de naranja, bagazo de caña de azúcar y espuma de poliuretano los que fueron secados, molidos, tamizados y se les determinó la capacidad de absorción de agua. Se realizó un análisis bromatológico al bagazo de caña y a los residuos de naranja con las metodologías reportadas por la A.O.A.C. y además se le determinaron los elementos químicos

presentes. Se realizó un estudio previo para evaluar la capacidad invasiva de microorganismo y posteriormente a los seleccionados se le estudió la influencia del tamaño de partícula y el porcentaje de humedad inicial en la productividad de AJ, el cual se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se obtuvo que el residuo de naranja, con tamaño de partícula de 1 mm, humedad del 60% y enriquecido con el medio Mierch modificado, es el soporte que ofrece las mejores condiciones para la producción de ácido jasmónico mediante fermentación en medio sólido, a partir del hongo *Botryodiplodia theobromae*.

Se diseñó un biorreactor teniendo en cuenta las experiencias reportadas en la literatura y se prestó especial interés en los componentes del equipo, involucrados en garantizar el desarrollo eficiente de los fenómenos de transferencia de calor y masa, para el desarrollo del microorganismo. Se construyó el biorreactor en columna con un volumen efectivo de 0.002 m^3 , se estudió la cinética de crecimiento del microorganismo y se desarrolló el proceso de fermentación, obteniéndose extractos donde se identificaron el metil jasmonato y el ácido jasmónico, alcanzándose concentraciones de ácido jasmónico de $40.53 \pm 0.7 \text{ mg/g}$ de materia seca en un período de 8 días, con una velocidad específica máxima de crecimiento del hongo de 0.04 h^{-1} y una generación máxima de calor metabólico de $0.047 \text{ kcal / kg h}$.

Se desarrolló un modelo matemático para describir el calor acumulado, durante el proceso de fermentación en medio sólido en el biorreactor en columna. El modelo se desarrolló a partir de los balances de masa y energía, la ecuación logística para el crecimiento microbiano y una ecuación auxiliar para la velocidad específica de crecimiento en función de la temperatura teniendo en cuenta el hongo *Botryodiplodia theobromae*. El modelo matemático permite determinar el comportamiento de la temperatura generada por el sistema, producto del calor metabólico y los mecanismos principales que intervienen en la remoción del calor en el biorreactor, durante el tiempo total de fermentación. Se compararon además los resultados de la modelación con los datos reales de la fermentación con residuos de naranja, con lo cual se demostró la eficacia.

Como conclusión general, se desarrolló un bioproceso compuesto por un biorreactor en columna para la producción de jasmonatos empleando residuos de naranjas y un modelo matemático que describe los perfiles de temperatura durante el proceso de FMS que permitirá la simulación y el desarrollo de estrategias para aumentar la producción y disponibilidad de los jasmonatos, potencializando su uso en diferentes sectores como la agricultura, la cosmética, los alimentos y la medicina.

ABSTRACT

The need to have environmentally friendly products, which can contribute to the protection of plants, the increase of agricultural yields, the formulation of food, medicines and cosmetic products is a demand of today's society. One of these products are the jasmonates to which for many years multiple benefits have been found in these sectors. However, new processes with higher productivity and lower costs that allow the extensive use of jasmonates are required. The microbial pathway from the fungus *Botryodiplodia theobromae* and through a fermentation process in solid medium offers the opportunity to develop more productive processes and the use of industrial waste, which in many cases constitute environmental problems. Taking this as a starting point, the aim of this study is to design a bench-scale bioreactor that allows to evaluate the kinetic systems and heat and mass transport of a process of jasmonates production by *Botryodiplodia theobromae* in solid state fermentation using an industrial waste. For this, a process of recovery of jasmonates was developed initially, for its use in fermented solids. Methanol, acetone, and ethyl acetate were evaluated as solvents for the recovery of jasmonic acid (JA). For the study, orange residuals were used as a matrix to which standard JA was added and the humidity was adjusted to 70%. The parameters studied were the extraction time, the liquid-solid ratio, the stirring speed, the temperature and the number of extractions. As a response variable, the JA was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The most favorable conditions were obtained using ethyl acetate, with a contact time of 30 min, liquid-solid ratio 5 mL / g, stirring speed 120 rpm, temperature 30 ° C and 3 extractions. These conditions were validated obtaining a yield in the recovery process of 97%.

Orange waste, sugarcane bagasse and polyurethane foam were used, which were dried, milled, sieved and the water absorption capacity was determined. A bromatological analysis was carried out on sugarcane bagasse and orange waste with the methodologies reported by A.O.A.C. and in addition, the chemical elements present were determined.

A previous study was carried out to evaluate the invasive capacity of the microorganism and

afterwards the selected ones were studied the influence of the particle size and the percentage of initial humidity in the productivity of JA, which was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC).

It was obtained that the orange residue, with particle size of 1 mm, humidity of 60% and enriched with the modified Mierch medium, is the support that offers the best conditions for the production of jasmonic acid by means of fermentation in solid medium, from of the fungus *Botryodiplodia theobromae*.

A bioreactor was designed taking into account the experiences reported in the literature and special attention was paid to the components of the equipment, which are involved in guaranteeing the efficient development of the heat and mass transfer phenomena, for the development of the microorganism. The bioreactor was built in column with an effective volume of 0.002 m³, the growth kinetics of the microorganism was studied and the fermentation process was developed, obtaining extracts where methyl jasmonate and jasmonic acid were identified, reaching concentrations of 40.53 ± 0.7 mg jasmonic acid / g of dry matter in a period of 8 days, with a maximum specific growth speed of the fungus of 0.04 h⁻¹ and a maximum generation of metabolic heat of 0.047 kcal / kg h.

A mathematical model was developed to describe the accumulated heat, during the fermentation process in solid medium state in the column bioreactor. The model was developed from the mass and energy balances, the logistic equation for microbial growth and an auxiliary equation for the specific rate of growth as a function of temperatura, considering the fungus *Botryodiplodia theobromae*. The mathematical model allows to determine the behavior of the temperature generated by the system, product of the metabolic heat and the main mechanisms involved in the heat removal in the bioreactor, during the total fermentation time. The results of the modeling were also compared with the experimntal data of the fermentation with orange residues, with which the efficacy was demonstrated.

As a general conclusion, a bioprocess was developed consisting of a column bioreactor for the production of jasmonates using orange waste and a mathematical model that describes the temperature profiles during the FMS process that will allow the simulation and development of strategies to increase the production and availability of jasmonates, enhancing its use in different sectors such as agriculture, cosmetics, food and medicine.

