

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



FERMENTACION GIBBERELINICA EN  
CULTIVO SOLIDO POR LOTE ALIMENTADO  
UTILIZANDO RESIDUOS  
AGROINDUSTRIALES

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

P R E S E N T A

Q. I. MA. TERESA GARZA GONZALEZ

MONTERREY, N. L.

ABRIL DE 1993.

TM

Z5521

FCQ

1993

G37



1020074479

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**FERMENTACION GIBERELINICA EN  
CULTIVO SOLIDO POR LOTE ALIMENTADO  
UTILIZANDO RESIDUOS  
AGROINDUSTRIALES**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

**P R E S E N T A**

**Q. I. MA. TERESA GARZA GONZALEZ**

**MONTERREY, N. L.**

**ABRIL DE 1993.**

TM  
25521  
F Q  
1 13  
37



**FONDO TESIS**

24281

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES



FERMENTACION GIBERELINICA EN CULTIVO SOLIDO POR LOTE  
ALIMENTADO UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

## TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

PRESENTA:  
**Q.I. MA. TERESA GARZA GONZALEZ**

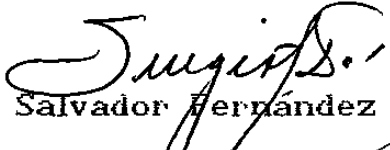
Este trabajo se realizó en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas bajo la asesoría del M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo. Con el apoyo de la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la Secretaría de Educación Pública bajo el Convenio No. 090-01-0343-568-01.

Q.I. ANDRES CERDA ONOFRE  
Director de la Facultad de  
Ciencias Químicas, U.A.N.L.  
P r e s e n t e.-

Mediante este conducto hacemos de su conocimiento que la tesis elaborada por la Q.I. Ma. Teresa Garza González, titulada:  
"FERMENTACION GIBERELINICA EN CULTIVO SOLIDO POR LOTE ALIMENTADO UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES".  
ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el grado académico de:  
MAESTRO EN CIENCIAS, ESPECIALIDAD MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL en virtud de haber cumplido integralmente con el reglamento de tesis vigente.

A T E N T A M E N T E

El Comité Dictaminador:

  
M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo

Asesor

  
Dr. Luis Galán Wong

Sinodal

  
M.C. Heliodoro de la Garza T.

Sinodal

Vo.Bo.

  
Dra. Maribel Suárez Cárdenas

Coordinadora de la Escuela de Graduados  
en Ciencias.



Dedicada con amor a:

Mi esposo: Raúl Carlos

Mis hijos: María Teresa

Raúl Carlos

Laura Verónica

## OBJETIVO.

Realizar fermentaciones utilizando la cepa *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616, aprovechando los subproductos de la industria harinera y de la cervecera para cultivarlo en sustrato sólido y determinar su capacidad productora de ácido giberélico.

Una vez determinada la capacidad productora del hongo, se optimizarán los parámetros de operación en el sistema de lote alimentado para la obtención de ácido giberélico.

## RESUMEN.

El tipo de cultivo seleccionado fue el de fermentación en sustrato sólido utilizando como material soporte masilla de malta y salvado de trigo.

El sistema de operación aplicado para la fermentación fue el de lote alimentado en el cual se utilizaron medios de cultivo limitados nutricionalmente para arrancar la fermentación y a partir del cuarto día se alimentaron nutrientes, hasta el séptimo día de fermentación.

La cepa utilizada fue *Gibberella fujikuroi* (ATCC-12616) a la cual se le probó su capacidad productora de ácido giberélico, dando resultados positivos.

Para la preparación del inóculo se probaron diversos medios de esporulación, siendo el mejor, el de carboximetilcelulosa suplementado con carbonato de calcio al 1%. Se procedió a la preparación y estandarización del inóculo, resultando el más adecuado el de concentración de

$2 \times 10^4$  esporas/ml.

Se probaron para la fermentación seis medios de cultivo donde las principales variantes fueron la fuente de carbono y la fase soporte. Se experimentaron diferentes temperaturas y tiempos de esterilización de los medios de cultivo. Las condiciones seleccionadas para la esterilización fueron temperatura =  $121^{\circ}\text{C}$ , tiempo = 90m presión = 15 lb/pulg.<sup>2</sup>; los nutrientes sensibles al calor fueron esterilizados separadamente por filtración, la solución de sulfato de magnesio se esterilizó por el método tradicional de calor humedo y el aceite de linaza por calor seco.

La fermentación se efectuó en condiciones de aerobiosis a temperatura ambiente y pH controlado. El muestreo se realizó cada 24 hrs. por triplicado.

La estimación del crecimiento del hongo se realizó midiendo la concentración de glucosamina, estableciendo previamente la correlación de la concentración de glucosamina a peso seco.

La separación y purificación del producto, se

realizó por técnicas de extracción con diferentes solventes, siendo el etanol ácido el más eficiente; posteriormente los extractos se concentraron y recuperaron con metanol, después fueron analizados por cromatografía en capa delgada utilizando un estándar de ácido giberélico al 1%.

Finalmente para la cuantificación de GAs se utilizó el método bioensayo, con semillas de cebada para la prueba.

Los resultados de la fermentación fueron los siguientes: el medio de salvado glucosa presentó la máxima concentración de biomasa, obteniéndose un aumento cercano al 100% de la biomasa inicial, sin embargo, la producción de ácido giberélico fue mayor en los medios con masilla, especialmente el que contenía glucosa como fuente de carbono, donde se obtuvo el ácido en una concentración de 1802mg/kg de medio de cultivo. Concluyéndose que la masilla es un buen material soporte para las fermentaciones en sustrato sólido y que además el sistema de lote alimentado favorece la producción de GAs, ya que

se reportan concentraciones inferiores del ácido para el sistema por lote.

## INDICE

	PAGINA
AGRADECIMIENTOS.	ix
LISTA DE TABLAS.	Xii
LISTA DE FIGURAS.	Xvi
I.- INTRODUCCION.	1
II.- ANTECEDENTES.	4
1.- Las Giberelinas.	4
2.- El ácido giberélico	5
3.- Microorganismo productor de GAs.	6
4.- Producción de GAs.	8
5.- Factores que afectan la fermentación giberelínica.	10
6.- Ruta biosintética	12

7.- Otras fermentaciones efectuadas para producir GAs.	13
III.- MATERIAL Y METODOS.	18
1.- Microorganismo y condiciones de mantenimiento.	18
2.- Inóculo.	18
3.- Medios de cultivo.	19
4.- Fermentación.	21
5.- Parámetros de fermentación.	22
A) Crecimiento.-	22
B) Acido giberélico.-	23
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.	28
1.- Determinación de la capacidad productora de GAs por <i>G. fujikuroi</i> ATCC-12616.	28
2.- Fermentación.	29
3.- Determinación de biomasa.	32
4.- Determinación de GAs.	34



5.- Relación crecimiento-producción de GA3.	37
V.- CONCLUSIONES.	40
VI.- BIBLIOGRAFIA.	42
VII.- APENDICE DE TABLAS.	58
VII.- APENDICE DE FIGURAS.	72

A G R A D E C I M I E N T O S

Es tiempo de dar gracias:

A Dios, mi luz y mi guía, fuente de sabiduría, paciencia y fortaleza.

A mis padres, Raúl y Enriqueta, un ejemplo de amor, trabajo, voluntad y rectitud.

A mi esposo Raúl y mis hijos Tere, Raúl y Laura, por su gran cariño, su tiempo y comprensión y por darme día a día un estímulo para seguir adelante.

A mis hermanos, Raúl, Jorge, Oscar, Queta y de manera especial a Carlos por su motivación y cariño.

A mi maestra Célida Luz Hinojosa C. por sus consejos y su constante estímulo.

Al M.C. Sergio Salvador Fernández Delgadillo, por la asesoría prestada desde el inicio del este trabajo y por todos los conocimientos, consejos y facilidades brindadas durante el desarrollo del mismo.

Al Q.I. Andrés Cerda Onofre, Director de la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo prestado para la realización de este trabajo.

Al L.Q.I. Celso I. Rodriguez Flores, por su disposición desinteresada en ayudarme a alcanzar esta meta.

A la Dra. Maribel Suárez Cárdenas, por su colaboración en la elaboración de este manuscrito.

Al M.C. Luis Galán Wong, Dr. Benito Pereyra Alferez y M.C. Heliodoro de la Garza por su participación en la revisión de la tesis.

A la Srita. Cristy, por su interés y disposición para la escritura del trabajo.

A mis compañeros maestros, auxiliares de laboratorio, estudiantes de la F.C.Q., personal técnico, intendente y administrativo, quienes con su afecto, ayuda y entusiasmo colaboraron en la realización de este proyecto.

A todos ellos nuevamente:

**¡Muchas Gracias!**

·  
·

## LISTA DE TABLAS

TABLA	TITULO	PAGINA
1	Características fisicoquímicas de algunas giberelinas.	59
2	Importancia comercial del GAs.	60
3	Nutrientes experimentados en la fermentación giberelínica en sustrato sólido.	61
4	Contenido nutritivo de los medios de esporulación.	62
5	Composición de los medios de cultivo para la fermentación giberelínica.	63
6	Análisis bromatológico de los soportes usados en la fermentación giberelínica.	64

7	Composición de la solución de sales minerales usadas en la formulación de los medios de cultivo para la fermentación giberelínica.	65
8	Reactivos utilizados en la determinación de los parámetros de la fermentación giberelínica.	66
9	Solventes probados para la extracción de GAs en la fermentación giberelínica.	67
10	Eluentes de la fase móvil probados para la identificación de GAs.	68
11	Métodos de revelado de los cromatogramas de los extractos de la masa fermentada.	69

12	Peso seco de biomasa de <i>G. fujikuroi</i> ATCC-12616 en los diferentes medios de fermentación.	70
13	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> ATCC-12616 en los diferentes medios de fermentación.	71



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Estructura química de GAs.	73
2	Aspecto microscópico del hongo <i>Gibberella fujikuroi</i> .	74
3	Aspecto macroscópico del hongo <i>Gibberella fujikuroi</i> .	75
4	Ruta de biosíntesis de GAs por <i>G.</i> <i>fujikuroi</i> .	76
5	Curva de crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-almidón soluble.	77
6	Curva de crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-glucosa.	78

7	Curva de crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-almidón de maíz.	79
8	Curva de crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-almidón soluble.	80
9	Curva de crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-glucosa.	81
10	Curva de crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-almidón de maíz.	82
11	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado.	83

12	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla.	84
13	Comparación del crecimiento de <i>G. fujikuroi</i> en los seis medios de fermentación utilizados.	85
14	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-almidón soluble.	86
15	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-glucosa.	87
16	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-almidón de maíz.	88

17	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-almidón soluble.	89
18	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-glucosa.	90
19	Producción de GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-almidón de maíz.	91
20	Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de GAs por <i>G.</i> <i>fujikuroi</i> en medios con salvado.	92
21	Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de GAs por <i>G.</i> <i>fujikuroi</i> en medios con masilla.	93

22	Comparación de los rendimientos de GAs producido por <i>G. fujikuroi</i> en los seis medios de fermentación.	94
23	Relación entre la producción de biomasa y GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-almidón soluble.	95
24	Relación entre la producción de biomasa y GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con salvado-glucosa.	96
25	Relación entre la producción de biomasa y GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-almidón soluble.	97
26	Relación entre la producción de biomasa y GAs por <i>G. fujikuroi</i> en medios con masilla-glucosa.	98

## I.- INTRODUCCION.

En México, actualmente existen empresas de diversas ramas que utilizan materia prima de importación, lo cual hace que sus costos de producción y, por lo tanto del producto terminado aumenten.

Los procesos biotecnológicos presentan características atractivas tanto en el aspecto económico como operacional por lo que se presentan como una alternativa para la síntesis de diversos productos que pueden sustituir a los de importación. Dichos procesos utilizan células como materia prima principal las cuales biosintetizan productos de importancia industrial utilizando materiales de bajo costo y que en ocasiones son subproductos de otras industrias.

El ácido giberélico es utilizado ampliamente, por ser una potente hormona reguladora de crecimiento vegetal. Por otra parte, este producto es de alto valor en el mercado y 100% de importación, razones por las cuales dicho ácido es un buen prospecto para producirlo en el país.

Algunos hongos del genero *Fusarium* sintetizan ácido giberélico como producto de su metabolismo secundario, ya sea por fermentación sumergida o en un sustrato sólido presentando ésta última rendimientos superiores del ácido.

El cultivo por lote alimentado, "Fed Batch", recientemente ha generado interés en todo el mundo, ya que permite un mejor control de la concentración de nutrientes, evitando así que la eficiencia de la fermentación baje. Este tipo de cultivo ha sido exitosamente explotado en el sector industrial, debido principalmente, a ventajas tales como facilidad de operación y mayor productividad, comparada con el cultivo continuo.

En nuestro país, los volúmenes de importación de ácido giberélico son incrementados día a día. En este proyecto se propone un proceso microbiológico para producir ácido giberélico, utilizando cepas de *G. fujikuroi* y aprovechando los residuos de la industria harinera (salvado de trigo) y cervecera (masilla de



malta), buscando mejorar los rendimientos (mg/kg) mediante la aplicación del sistema de lote alimentado, desarrollando un diseño experimental sencillo y accesible.

## II.- ANTECEDENTES.

### 1.- Las giberelinas.-

Son un grupo de hormonas reguladoras del crecimiento de las plantas, químicamente formadas de diterpenos los cuales están compuestos por cuatro unidades de isopreno comunmente formando tres anillos, además de presentar un puente de lactona.

En la naturaleza, existen gran variedad de giberelinas a las que se les designa como GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub> y así sucesivamente, hasta llegar a GA<sub>79</sub> (24). La diferencia entre éstas, se debe, principalmente, a la presencia y localización de doble ligaduras y al número de grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo dentro de la molécula.

De las setenta y nueve giberelinas descubiertas, 25 son producidas por el hongo *Gibberella*, (33, 34) sesenta y uno por plantas superiores (1, 4, 65) y 14 por ambos (25).

Las giberelinas pueden localizarse en todo el vegetal, pero en las áreas en donde el crecimiento es activo como embriones o tejidos en desarrollo su concentración se incrementa. (32, 18).

Estas hormonas vegetales presentan un espectro de actividad biológica muy variado, con un papel principal en la regulación del crecimiento, pues pueden producir elongación extraordinaria de tallos; además son responsables de la activación de la hidrólisis de reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de semillas (3). Por otro lado la maduración de los frutos y otras características pueden ser afectadas por la presencia de giberelinas.

Algunas de las giberelinas mas estudiadas, entre ellas el ácido giberélico, se muestran en la Tabla 1.

## 2.- Acido Giberélico.-

La giberelina que más atención ha recibido es la GA<sub>3</sub> también conocida como ácido giberélico.

A) Estructura: Fig. 1.

B) Propiedades Fisicoquímicas: Son Cristales blancos fácilmente solubles en metanol, etanol ácido, acetona, bicarbonato de sodio, ácido acético y son ligeramente solubles en agua y éter etílico. Otras

características se muestran en la Tabla 1.

C) Importancia comercial: La producción industrial de ácido giberélico es importante, por ser un potente regulador de crecimiento vegetal, ampliamente utilizado en agricultura, vitivinicultura, horticultura, viveros, invernaderos, etc. así como para una gran variedad de efectos biológicos tales como: la eliminación de letargo en semillas, aceleración de la germinación de semillas, alargamiento marcado de la raíz, promoción de la floración, mejoramiento en el rendimiento de cosechas, etc.

Algunas aplicaciones comerciales de importancia del ácido giberélico se muestran en la Tabla 2. (45, 63,64).

En conclusión, el GA<sub>3</sub> presenta características estructurales complejas, que dificultan su síntesis química. Por otro lado, puede ser utilizado en diversas industrias y no se produce en el país.

### **3.- Microorganismo productor de GA<sub>3</sub>-**

Existen diversos microorganismos capaces de

producir GAs, sin embargo, entre los más estudiados se encuentra *Gibberella fujikuroi* (ATCC 12616).

Es un hongo cuyo estado imperfecto es denominado *Fusarium moniliforme*, su aspecto de cultivo es muy variable y es causante de la enfermedad "Bakanae" en la planta de arroz. (36). Este microorganismo pertenece al orden *Moniliales* familia *Tuberculariaceas*. La característica más importante de este hongo es la formación de macroconidios falciformes de varias células y frecuentemente presenta también microconidios monocelulares. (Fig. 2).

Característicamente es productor de un pigmento color violeta, perteneciente al grupo de las bikaverinas que presenta amplias posibilidades de aplicación en la industria farmacéutica y en cosmetología. (42) (Fig. 3).

Por tanto, se considera que *G. fujikuroi* (ATCC-12616) es el microorganismo más adecuado para la producción de GAs.

#### 4.- Producción de GAs.-

El unico método de producción a nivel industrial es el de fermentación entre los cuales se encuentran: a) el cultivo sumergido, b) el cultivo en sustrato sólido.

La fermentación sugerida es la de sustrato sólido, sobre todo cuando se usan hongos, ya que éstos producen metabolitos, en la mayoría de los casos con rendimientos mucho más altos que los producidos por cultivo sumergido (12, 29).

La fermentación en sustrato sólido se asemeja al habitat natural del microorganismo en lo concerniente al crecimiento, así como la formación del producto los cuales ocurren cerca de la superficie de los materiales sólidos con bajo contenido de humedad tales como, diferentes productos agrícolas: arroz, trigo, cebada y soya. Por otra parte también pueden ser de interés algunos sub-productos que resultan de diversos procesos industriales, incluyendo desechos agrícolas, forestales y de procesamiento de alimentos, que sirven como soportes y también pueden proporcionar nutrientes al microorganismo. (47, 48, 50, 52, 65).

La biosíntesis de GAs es regulada por represión catabólica (39). Una alternativa para reducir este problema es el cultivo por lote alimentado. Puede ser una herramienta poderosa para vencer restricciones severas sobre la eficiencia de la fermentación tales como: inhibición de sustrato, represión catabólica, concentración celular alta y efecto de glucosa. (40). Esta también proporciona una manera efectiva, para incrementar la fase de producción, reposición de pérdida de agua por evaporación y por disminución de la viscosidad del caldo (41). Este tipo de proceso permite el control de la concentración de nutrientes dentro de el fermentador, modificando a la velocidad de alimentación de los sustratos.

Una fermentación en estado sólido por lote alimentado, implica una estrategia de operación del fermentador, basada en corrientes de alimentación constantes o intermitentes y la retención del producto en el fermentador hasta el final del proceso (39). Este tipo de proceso, presenta una gran atracción comercial

debido, principalmente, a que comparado con técnicas de cultivo continuo y por lote, presenta ventajas de operación y mayor productividad (40 41).

#### 5.- Factores que afectan la fermentación giberelínica.-

Los rendimientos óptimos de una fermentación, dependen de factores como: cepa utilizada, tipo y preparación de inóculo, concentración y tipo de nutrientes, temperatura, pH y suministro de oxígeno por lo que el conocimiento de dichos factores es primordial. (43)

a) Selección de la cepa: se hace en base a su capacidad productora de ácido giberélico y existen diferentes técnicas para el mejoramiento de dichas cepas, como los procesos naturales (conjugación sexual), tratamiento con agentes mutágenos (U.V., HNO<sub>2</sub>, etc.) y recientemente mediante ingeniería genética. (12, 63).

b) Inóculo: para el caso de hongos existen diversos tipos de inóculos (micelio, esporas), sin embargo, las esporas fúngicas presentan características de tamaño, forma y estado fisiológico más uniforme y se manejan más fácilmente que la masa micelial. (63)



c) Diseño de medios de cultivo: las características del medio de fermentación son fundamentales para la obtención de buenos rendimientos de ácido giberélico, siendo clave, la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales minerales y factores de crecimiento.

d) Aireación: el oxígeno tiene un efecto marcadamente importante cuando las células están en crecimiento, ya que la demanda de oxígeno, se incrementa y si existen restricciones del gas por un período largo decrece la producción de GAa.

e) Temperatura y pH: la velocidad de crecimiento y la acumulación de producto, también son afectados por fluctuaciones de pH y temperatura, por lo que la selección y mantenimiento de estos parámetros impacta fuertemente en los rendimientos de la fermentación.

En suma, lo anterior confirma que la selección de los factores de fermentación debe ser cuidadosa para garantizar una buena fermentación.

## 6.- Biosíntesis de GAs.-

La ruta metabólica para la síntesis de GAs ocurre en cuatro etapas: (12, 23, 50)

1) Formación de la unidad isopreno o su equivalente biológico, a partir de acetil CoA o leucina.

2) Deshidratación y descaboxilación del mevalonil 5 fosfato para dar un isopreno activo, seguida de la condensación de unidades de isopreno para formar terpenos alicíclicos.

3) Ciclación de las estructuras alicíclicas.

4) Posteriores modificaciones de la estructura ciclizada, que conducen a la formación de las distintas giberelinas.

Las reacciones involucradas en la ruta biosintética de GAs se muestran en la Figura 4.

El análisis de la biosíntesis de GAs, revela que existe una gran similitud con el anabolismo de grasas, lo que hace pensar que la presencia de éstas en el medio de cultivo puede alterar la producción de GAs.

## 7.- Otras fermentaciones efectuadas para producir GAs.-

Kurosawa (1926) demostró que el filtrado estéril, proveniente de un cultivo del hongo *G. fujikuroi* contiene el principio activo que causa la estimulación del crecimiento de semillas de arroz; posteriormente Yabuta aisló el principio activo (68).

Yabuta y Sumuky (1935) produjeron el ácido giberélico por fermentación superficial en medio líquido (69).

Investigadores japoneses e ingleses (1953) aplicaron técnicas de cultivo sumergido utilizando el sistema por lote, "Batch". (36).

Posteriormente, Holme y Zacharías (1965) también trabajaron el proceso continuo, mejorando rendimientos de GAs pero aún con costos altos (29). Años más tarde, en la India (1976) reportaron los investigadores el uso de la fermentación en sustrato sólido para producción de giberelinas, aunque los resultados no fueron muy alentadores (22).

Por otro lado se sigue trabajando sobre el cultivo

continuo tratando de optimizar el proceso, sin embargo, en 1976 se llegó a la conclusión de que este proceso estaba al punto de saturación y que las mejoras no eran factibles desde el punto de vista económico.

Kumar y Lonsane (1985) en la India reportaron que la fermentación en estado sólido ha generado gran interés comercialmente por ser un proceso más productivo y fácil de operar (39).

Por otro lado Hesseltine mencionó que las fermentaciones en estado sólido podían realizarse en recipientes relativamente pequeños y que debido al bajo contenido de humedad en que se trabaja, se reduce marcadamente el problema de contaminación y de separación del producto.

De acuerdo a las aportaciones anteriores se puede concluir que la fermentación en sustrato sólido para producir GAs presenta mejores ventajas que otros procesos estudiados.

Diversos factores se han estudiado en la

fermentación giberelínica en estado sólido por lote y por lote alimentado:

a) Tipos de nutrientes.- Con el objeto de explorar la posibilidad de mejoramiento en los rendimientos de GAs se ha experimentado con diversos nutrientes como se muestra en la Tabla 3 donde se utiliza salvado como soporte. (33).

b) Oxígeno.- El O<sub>2</sub> tiene un efecto marcadamente importante tanto en el crecimiento del hongo como en el rendimiento de GAs, sin embargo, se reporta que en este tipo de proceso, la aireación se facilita por los espacios que hay entre las partículas de sustrato y de material soporte (39).

c) Temperatura.- Borrow y col. (1964), observaron que la temperatura óptima de crecimiento de *G. fujikuroi* se encuentra entre 31 y 32°C, mientras que la mayor producción de ácido giberélico se obtuvo a 29°C; a temperatura superiores se acumulan otras giberelinas como la A<sub>4</sub> y A<sub>7</sub> (8).

d) pH.- Fuska y otros demostraron que a pH de

2.0-3.0 se acumulan mezclas de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> (33), sin embargo a pH de 3.0-5.5 la velocidad de acumulación del GA<sub>3</sub> es mayor (9). Así mismo, Cross y Norton observaron a pH cercano a 7.0 se puede detectar un incremento en la acumulación de otras giberelinas.

Por otro lado investigadores como Sweig y Devory seguidos por Mertz y Henson sugirieron que la luz visible puede aumentar el crecimiento y la producción de ácido giberélico. (33)

e) Cinética de fermentación.- Los parámetros utilizados para determinar la cinética de la fermentación giberelinica son: crecimiento fúngico y determinación de GA<sub>3</sub>.

Kumar y Lonsane describieron la estimación directa de biomasa fúngica basada en la medición de acumulación de glucosamina (59). Holme y Zacharias mencionaron la aplicación del método microKjeldahl para determinación de nitrógeno total como una medida del crecimiento. (29).

Para la purificación del GA<sub>3</sub> se han descrito

diversos métodos (25, 26) en donde se incluyen: adsorción con carbón activado seguido de elución con metanol (65), extracción con solventes (38, 71), cromatografía de capa delgada (30, 47, 61), cromatografía en columna (21, 46, 71).

Para la determinación cualitativa y cuantitativa se han experimentado los siguientes métodos: bioensayos (3, 5, 17, 68) Yabuta y Hayashi 1939, fluorometría (37) Kavmagh y Kuzel 1958, ultravioleta (31) Holbrouk y col. 1961, infrarrojo (10,62) Borrow et al 1964, espectrometría de masas (7, 10, 22, 31) Weelfson y col. 1965, cromatografía líquida de alta resolución (6, 30, 31) Barendse, Vande Werken 1980, espectrofluorodensitometría (37) Kumar y Lonsane 1986

### III.- MATERIAL Y METODOS.

#### 1.- Microorganismo y condiciones de mantenimiento.-

La cepa seleccionada para ser utilizada en el experimento fue *G. fujikuroi* ATCC-12616. Esta se mantuvo viable realizando resiembras periódicas en medio conteniendo agar dextrosa papa e incubando a 28°C por 48 a 72 h. Posteriormente, los cultivos se conservaron a 4°C.

#### 2.- Inóculo.-

a) Selección del inóculo: Los inóculos se prepararon a partir de esporas, éstas presentan mayor uniformidad en cuanto a tamaño, forma y estado fisiológico, resultando así, más sencillo la estandarización del inóculo.

b) Inducción a la esporulación de *G. fujikuroi*: A cultivos de agar inclinado de *G. fujikuroi* se les adicionaron 7 ml de solución salina estéril, la cual fue agitada con una asa estéril para generar una suspensión fúngica.

La esporulación fue inducida en diferentes medios



de cultivo, (Tabla 4) encontrándose el mayor número de esporas en el medio de carboximetilcelulosa (según Capellini) suplementando con  $\text{CaCO}_3$  al 1.0% (13, 56, 57). Para la inducción se transfirieron 2 ml del cultivo suspendido a 3 ml del medio de esporulación seleccionado. Se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  por 96h en agitación constante.

c) Cuantificación del inóculo: para la estimación del número de esporas en el inóculo se aplicó el método de dilución y siembra en placa, realizando la prueba por triplicado. Se probaron 3 medios de cultivo: Foster, Martin, y papa dextrosa agar a pH 3.5, seleccionándose éste último. El medio se acidificó con ácido tartárico diluido al 10% y la temperatura de incubación fue de  $28^\circ\text{C}$ .

### **3.- Medios de cultivo.-**

En la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron como materiales soporte, salvado de trigo y masilla de malta con el fin de encontrar nuevas formas de aprovechamiento de estos subproductos.

Se probaron seis medios de cultivo cuya composición se muestra en la Tabla 5 así como también el análisis bromatológico de los materiales soporte en la Tabla 6.

Se pesaron los componentes secos y se mezclaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad total, posteriormente se humedecieron con la solución de sales minerales (tabla 7) y se procedió a homogenizarlos.

Los matraces tapados se esterilizaron a  $121^{\circ}\text{C}$ , presión de  $15\text{ lb/pulg.}^2$ , por 90 m. (42), el aceite de linaza se esterilizó por calor seco a  $170^{\circ}\text{C}$  por 2 h, la solución de sales minerales fue esterilizada en autoclave  $15\text{lb/pulg.}^2$ , a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 m. y los componentes del medio, sensibles al calor, fueron esterilizados por el proceso de filtración. Finalmente se mezclaron en condiciones de asepsia todos los constituyentes del medio estériles.

Así mismo, se prepararon los tubos conteniendo la fracción de medio correspondiente a la alimentación de cada día.

#### 4.- Fermentación.-

Los medios de cultivo estériles fueron inoculados con 3ml de cultivo esporulado de *G. fujikuroi* en caldo Czapek Dox modificado según Capellini (13).

Los primeros tres días se manejó la fermentación por lote y a partir del cuarto día se inició la alimentación misma que continuó hasta el séptimo día.

La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se incubaron a temperatura ambiente, en aerobiosis, bajo condiciones de humedad y pH controlados, durante ocho días.

Nuevamente el experimento se efectuó por triplicado y el muestreo se realizó cada 24 h, sacrificando un matraz por día ya que resultaba impráctico tomar una muestra pequeña de cada matraz, pues en cultivos en sustrato sólido, es difícil separar la masa micelial del material soporte ya que se adhieren fuertemente. En cada una de las muestras se determinó la concentración de biomasa y GA<sub>3</sub>.

## 5.- Parámetros de fermentación.-

A) Crecimiento: Para ésto se probaron métodos como: determinación de proteínas, peso seco y cuantificación de glucosamina, optándose por este último ya que proporcionaba resultados más reproducibles. Esta técnica, está basada en la medición del contenido de N-acetil glucosamina (27), compuesto que es la unidad monomérica de la quitina, la cual es un polímero que se encuentra frecuentemente en la pared celular de hongos filamentosos (2). Dicha técnica consiste en: a) tratamiento de la muestra, b) determinación de glucosamina

a) Tratamiento de la muestra: las muestras fueron sometidas a una hidrólisis ácida, con 25 ml de HCl 6.0 N y posteriormente, se homogenizaron y calentaron en baño de agua a temperatura de ebullición por 15 h. Una vez terminada la digestión, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y los sólidos residuales se eliminaron mediante filtración rápida.

b) Determinación de glucosamina: la preparación de los reactivos se muestra en la tabla 8.

Fundamento: Reacción Elson Morgan (5, 58).

Procedimiento: En un tubo de ensayo se colocaron 2.5 ml del filtrado, y una gota de fenolftaleína al 0.5% en etanol. Se neutralizó con solución 1.0 N de NaOH hasta vire del indicador, el volumen se llevó a 5 ml con agua bidestilada. Se adicionaron 2.5 ml de reactivo de acetilacetona, se mezcló y se tapó con gasa, se calentó en baño de agua a 90°C por 45 m y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 12.5 ml de etanol absoluto y después, 2.5 ml de reactivo de Erlinch (p-dimetilaminobenzaldehído); posteriormente se aforó a 25 ml con etanol y se mezcló suavemente. Los tubos de reacción fueron colocados en baño de agua a 65-70°C durante 10 m y se reposó de 1 a 2 h a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 530 nm.

Por otro lado se determinó la correlación de glucosamina a peso seco. Se realizó un experimento donde se midió la concentración de glucosamina a una muestra conocida de peso seco de *G. fujikuroi* y se determinó, que un mg de glucosamina correspondía a 37 mg de peso seco.

B) Acido giberélico: Para la determinación de GAs se

realizaron los siguientes pasos: a) separación y purificación del ácido, b) determinación cualitativa, c) determinación cuantitativa.

a) Separación y purificación: Para esto se ensayaron diferentes solventes (Tabla 9), encontrándose mejor el etanol ácido.

Los matraces muestreados fueron sometidos a extracción con solución de etanol al 10% acidificado con ácido clorhídrico a pH de 2.5. La relación medio de cultivo a solvente fue de 1:5. Los matraces fueron homogenizados y agitados a 25°C durante una h. Se filtró a través de gasa y posteriormente en papel Whatman # 41. Se evaporaron los extractos a sequedad a vacío utilizando un rotavapor. El residuo fue recuperado con 5 ml de metanol y se conservó a 4°C.

b) Determinación cualitativa: Para esto, se aplicó la técnica de cromatografía en capa delgada utilizando placas de acrílico con sílica gel G (Whatman 60 F 254) de 0.2 mm de espesor. Las placas fueron activadas a 110°C por 1 h. Se aplicaron 5 µl de cada uno de los extractos

concentrados de las muestras y de soluciones estándar de ácido giberélico a 1%. Se ensayaron diferentes mezclas de eluentes como fase móvil para la cromatografía (Tabla 10), seleccionándose el de cloroformo, acetato de etilo, ácido acético en proporciones (5:4:1) (36). Se probaron 2 técnicas de revelado (Tabla 11) dando mejores resultados con vapores de ácido clorhídrico concentrado por 30 m (30). Se sometieron a calentamiento a 110°C por 10 m y se observaron bajo luz U.V. (46).

c) Determinación cuantitativa: Se experimentaron varios métodos de cuantificación optándose por el bioensayo, el cual está basado en la medición de la actividad amilolítica de semillas de cebada pretratadas. La presencia de giberelinas, especialmente GAs, estimula de alguna manera a las células de aleurona presentes en el grano, a secretar enzimas hidrolíticas, particularmente  $\alpha$ -amilasa. La actividad de la  $\alpha$ -amilasa fue determinada mediante la cuantificación de los azúcares reductores, producto de la hidrólisis del almidón de la semilla, por el método del DNS (52). Para esto se procedió al

pretratamiento de la semilla de cebada. Los granos de cebada proporcionados por Cervecería Cuauhtémoc S.A., se remojaron por 2 h en solución acuosa de hipoclorito de sodio 0.1% a pH 3.5. Estas se lavaron con agua destilada y se dejaron reposar 18 h a 12°C. Posteriormente, se procedió a eliminar el embrión fraccionando con bisturi, longitudinalmente la semilla en 2 partes. Las fracciones obtenidas fueron utilizadas para la determinación.

Los fragmentos de semilla pretratada, se colocaron en un tubo de ensayo y se adicionaron 0.1 ml de solución acuosa de estreptomicina y 0.9 ml de muestra. La mezcla se incubó a 30°C por 72 h; posteriormente se molieron en un mortero y la mezcla se aforó a 11 ml, se le adicionaron 0.5 g de amberlita y se agitó continuamente durante 5 m. La mezcla se filtró con papel Whatman # 41. La determinación de la concentración de azúcares reductores se realizó por el método del ácido 3,5- dinitro salicílico (DNS) (52). El análisis se realizó por triplicado.



La técnica consiste en mezclar 3 ml de muestra con 3ml de reactivo DNS; dejar reposar 5 min. Calentar en baño de agua a temperatura de 100°C por 15 min. y dejar a enfriar a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a  $\lambda$  de 540 nm.

## V.- RESULTADOS Y DISCUSION.

Ante la creciente demanda de GAs en el mundo y especialmente en México es importante diseñar procesos de producción de este ácido que satisfagan dicha necesidad, en consecuencia el presente trabajo se enfoca hacia el estudio de diferentes factores que permitan optimizar el proceso microbiológico para producir el GAs.

Inicialmente se realizó un análisis bibliográfico del cual se obtuvieron importantes datos acerca del hongo *G. fujikuroi* productor del ácido giberélico y otras giberelinas.

### 1.- Determinación de la capacidad productora de GAs por *G. fujikuroi* (ATCC-12616).

Basándose en datos bibliográficos donde se menciona la producción de GAs en sustrato sólido en medios en que se utiliza salvado como soporte, almidón como fuente de carbono, suplementado con urea y sales minerales, se corrió una fermentación por lote de siete días.

Posteriormente, se obtuvieron los extractos del cultivo fermentado en los cuales la presencia de GAs, fue demostrada mediante cromatografía en placa delgada contra un estándar de ácido giberélico al 1%. Se observó la fluorescencia emitida bajo luz U.V. y se encontró que aparecieron varias manchas fluorescentes entre las cuales se encontraba la correspondiente a GAs, por lo que se certificó la capacidad del hongo para producir esta giberelina.

## 2) Fermentación.

Se decidió utilizar la fermentación en sustrato sólido debido a que en esta técnica falta mucho por investigar, mientras que en el cultivo sumergido los estudios realizados son mucho más completos.

Los materiales seleccionados como soporte fueron subproductos agroindustriales, tanto de la industria harinera (salvado de trigo), como cervecera (grano agotado o masilla). La selección de dichos materiales se realizó en función de: costo, disponibilidad y contenido nutritivo. Ambos soportes son baratos, abundantes y

pueden proporcionar algunos nutrientes al microorganismo. La literatura reporta la utilización de salvado de trigo como soporte en procesos de fermentación pero no se menciona nada acerca de la masilla.

Buscando optimizar el proceso de producción de GA<sub>3</sub> se optó por el sistema de lote alimentado "Fed batch" ya que de acuerdo a estudios previos este proceso es más eficiente que el sistema por lote.

Antes de proceder al proceso de fermentación fue necesario realizar un cuidadoso estudio acerca del tipo y preparación del inóculo para garantizar una buena fermentación.

Se probaron diferentes medios de esporulación (Tabla 4) dando el mejor resultado el medio de carboximetilcelulosa (13), sin embargo, la esporulación fue lenta y escasa, pues comenzó a esporular después de diez días de incubación. Dicho medio se modificó suplementándolo con carbonato de calcio al 1% y la esporulación mejoró de manera importante, de tal forma que al cuarto día de incubación el examen microscópico del cultivo, reveló un aumento del 100% de esporas.

La proporción de inóculo fue cuantificada, resultando adecuada una concentración de  $2 \times 10^4$  de esporas por ml, ya que inóculos más pequeños, ocasionaban crecimiento lento y más grandes provocaban disminución de la producción de GAs.

Se prepararon seis medios de cultivo (tabla 5), tres con salvado y tres con masilla como soporte. El salvado fue utilizado sin pretratamiento, sin embargo, la masilla debido a su alto contenido de humedad, se sometió a un tratamiento de secado ya que la humedad es un factor importante a controlar en la fermentación y además se facilita su manejo y conservación.

Para la preparación de los medios, fue necesario primeramente, pesar los ingredientes secos y colocarlos en matraces Erlenmeyer de 250 ml y posteriormente mezclarlos y adicionar los ingredientes húmedos termoestables; luego se homogenizaron para evitar la formación de grumos.

La esterilización de la mezcla se dificultó debido a que la transferencia de calor en la pasta era muy lenta, por lo que fue necesario probar diferentes tiempos de

calentamiento hasta lograr la esterilización. Las condiciones aplicadas para esta etapa fueron: temperatura 121°C, tiempo 90 minutos, presión 15 lbs/pulg<sup>2</sup>. El resto de los componentes se esterilizaron por otros métodos como se explicó anteriormente.

Se procedió a correr la fermentación, durante los primeros tres días se manejó la fermentación por lote y a partir del cuarto se inició a la alimentación. Para esto, se prepararon las porciones individuales de medio de cultivo correspondientes a cada uno de los días de alimentación. Se adicionaron dichas porciones cada 24 h, hasta el séptimo día. La fermentación concluyó al octavo día. El muestreo se realizó cada 24 h y se determinó la concentración de biomasa y GAs en cada muestra.

### **3.- Determinación de biomasa.-**

Después de ensayar diferentes técnicas para la cuantificación de biomasa se optó por la de glucosamina, ya que proporcionaba mayor reproducibilidad.

Los resultados del crecimiento del hongo durante la fermentación en los diferentes medios de cultivo se

localizan en la Tabla 12 y las curvas de crecimiento se encuentran en las Figuras de la 5 a la 13. Se observa en general que el crecimiento no presenta diferencias apreciables al variar la fuente de carbono y el material soporte.

A las 24 h de incubación se puede notar que la concentración de biomasa en todos los medios de cultivo es similar, siendo más alta en los medios de salvado glucosa y la más baja en medios con masilla almidón de maíz. Se puede observar que los incrementos de biomasa en el transcurso de la fermentación son similares en todos los medio de cultivo. La máxima acumulación de biomasa se obtuvo en los medios con glucosa tanto en masilla como en salvado aunque fue un 7.5% mayor en este último.

Por otro lado la observación macroscópica de los cultivos, reveló la presencia de mayor concentración de pigmento en los medios con salvado que en los de masilla (Figura 3).

#### **4.- Determinación de GAs.-**

En las muestras tomadas también se analizó el

contenido de producto. Para ésto se procedió a la separación del ácido giberélico de la masa fermentada.

Se probaron diferentes solventes para la extracción (Tabla 9) con un estándar de ácido giberélico, resultando ser el mejor el etanol ácido.

Para lograr una mejor extracción fue necesario homogenizar cada una de las muestras con el solvente y probar diferentes tiempos de contacto con el mismo.

En la identificación del GAs se aplicó la cromatografía en capa delgada.

Se probaron 6 sistemas de eluentes como fase móvil (Tabla 10) y la mejor separación se obtuvo en los sistemas que contenían: cloroformo-acetato de etilo-ácido acético y en los de metanol-acetona. Así mismo, se experimentaron dos formas distintas de revelar los cromatogramas (Tabla 11) siendo más eficiente con vapores de ácido clorhídrico concentrado. Se visualizaron varias manchas fluorescentes bajo luz U.V., entre ellas la correspondiente al GAs.



Para la determinación cuantitativa de GA<sub>3</sub>, se se utilizó el bioensayo, ya que en esta técnica se mide la giberelina activa biológicamente, además de que se disponía de lo necesario para realizar el experimento.

En las pruebas preliminares del bioensayo se presentaron problemas de contaminación microbiana por lo que fue necesario esterilizar todo el material requerido para la prueba; así mismo, la solución utilizada para la pregerminación de la semilla de cebada fue cambiada por hipoclorito de sodio al 0.1%, pH 3.5, en lugar de hidróxido de sodio 1N, pH 9 que era el que se reportaba en la literatura.

La eliminación del embrión de la semilla se hizo en forma manual para lo cual se requirió de una estricta asepsia.

Como se mencionó anteriormente, la técnica del bioensayo se basa en la estimulación que produce el GA<sub>3</sub> en la síntesis de enzimas amilasas en la semilla, lo cual conlleva a la generación de azúcares reductores, producto de la hidrólisis de las reservas de almidón de la misma.

Posteriormente los azúcares son cuantificados. Resulta fundamental por lo tanto, hacer una buena extracción de dichos azúcares para obtener resultados reales.

En la Tabla 13 se muestran las concentraciones de ácido giberélico durante la fermentación en los diferentes medios de cultivo utilizados. Se observa que la producción inicia entre el segundo y tercer día de incubación.

Las Figuras de la 14 a la 19 muestran la acumulación de GA<sub>3</sub> durante la fermentación. Así mismo, la comparación de los rendimientos del ácido en los tres medios de cultivo con salvado se muestran en la Figura 20 donde se observa que la mejor producción se tiene con el medio con almidón de maíz como fuente de carbono, (1380 mg/kg) comparando con el medio con almidón soluble se observa que la acumulación de GA<sub>3</sub> es un 7% menor, sin embargo, en los medios con glucosa se puede notar una disminución aproximada del 17% en la producción del ácido. Esto puede deberse a que el metabolismo es dirigido mayormente hacia el crecimiento del hongo y producción del

pigmento, que hacia la producción de GA<sub>3</sub>. Kumar y col. (41) reportan resultados similares a los obtenidos en este trabajo, solo que sus resultados son más bajos, posiblemente se deba a la cepa utilizada.

Por otro lado, en la Figura 21, se compara los rendimientos de GA<sub>3</sub> obtenidos en los medios con masilla, observándose que en los tres medios se obtienen mayor concentración que con los de salvado. La mayor acumulación de GA<sub>3</sub> se da en los medios con glucosa como fuente de carbono (1802 mg/kg), lo cual posiblemente se deba a efectos metabólicos ya que, el contenido nutritivo de la masilla es menor que el de salvado y esto hace que el metabolismo sea desviado principalmente hacia la síntesis del producto y en menor proporción hacia el crecimiento y producción del pigmento.

Si comparamos los rendimientos máximos de GA<sub>3</sub> en los dos tipos de soportes (Fig. 22) se pueden observar incrementos hasta de un 30%.

#### **5.- Relación, crecimiento, producción de GA<sub>3</sub>.-**

Las Figuras 23 a la 27 muestran la relación de

crecimiento y producción en los medios en que los rendimientos de GAs fueron más elevados.

Si comparamos los resultados obtenidos en los mismos medios de cultivo en proceso por lote (66) con los de lote alimentado observamos que en este último hay un aumento considerable en la producción de GAs, sin embargo este efecto no es tan marcado en el caso de la biomasa.

El pequeño incremento en la biomasa, comparado con el de GAs, posiblemente está relacionado con la naturaleza del metabolito secundario. Esto también indica que solo una pequeña fracción de lo alimentado se convierte a biomasa, probablemente durante las primeras 96 h de fermentación. El resto de la porción alimentada es utilizado para el mantenimiento de la biomasa formada y para la síntesis del producto. La acumulación de GAs aumenta rápidamente después de las 96 h.

Estos resultados confirman el abatimiento de la inhibición de sustrato y la extensión de la fase de producción en el proceso de lote alimentado comparado con el proceso batch.

En suma: mediante este trabajo se logró mejorar los rendimientos de GAs en la fermentación en sustrato sólido, aprovechar subproductos de la industria harinera y cervecera y la formación de recursos humanos, ya que de este proyecto se derivaron seis tesis de Licenciatura.

Una aportación importante de este trabajo es la reutilización de la masilla para procesos de fermentación en sustrato sólido, ya que es un subproducto de la industria cervecera muy abundante y de bajo costo.

Se recomienda que continúen las investigaciones para el diseño de un reactor que permita llevar a cabo el escalamiento de este proceso y la producción industrial de GAs.

Finalmente, los objetivos planteados al inicio de este proyecto fueron logrados, ya que, se demostró la capacidad de *G. fujikuroi* ATCC-12616 para producir GAs. Así mismo, se optimizó el proceso a nivel laboratorio mediante el cultivo en sustrato sólido por lote alimentado.

## V.- CONCLUSIONES.

El hongo *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 es capaz de producir ácido giberélico bajo las condiciones experimentadas.

Este trabajo presenta una alternativa para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, pudiendo extenderse a otros tipos de subproductos sólidos, lo cual es atractivo desde el punto de vista económico.

Las características fisicoquímicas de la masilla favorecen la producción de GAs. Por otro lado, estos materiales son abundantes y de "bajo" costo, razones por lo cual es factible su uso en este proceso.

De acuerdo a este estudio los medios de cultivo que mayor acumulación de GAs presentaron fueron masilla-glucosa y salvado-almidón soluble.

Factores como la temperatura, aerobiosis, humedad, concentración y tipo de nutrientes; afectan de manera importante los rendimientos de GAs.

La contaminación con hongos filamentosos es un

problema que se presenta comúnmente en este tipo de procesos por lo que el diseño del proceso de esterilización, así como las condiciones de control microbiológico deben ser seleccionados cuidadosamente.

La adición semicontinua de nutrientes favorece la producción de GAs.

La homogenización en los procesos de separación, cuantificación de GAs afecta fuertemente la eficiencia de los métodos aplicados.

La cuantificación biológica de GAs es un método aceptable ya que miden la concentración de giberelina activa.

## VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aharoni N., Back A., Ben-Yehoshua S., and Richmond A.E. 1975. Exogenous gibberellic acid and the cytokininisopentenyladenine retardants of senescence in romaine lettuce. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 4-6.
- 2.- Aidoo, K.E.; Hendry, R. Wood, B.J.B. 1981 Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 12: 6-9.
- 3.- Aniche G.N. and Palmer G.H. 1992. Influence of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) on the development of amyolytic activities in rice during germination. Proc. Biochem. 27: 291-297.
- 4.- Asakawa Y., Tamari K., Shoji A. and Kaji J. 1974. Metabolic Products of Gibberellin A<sub>3</sub> and their interconversion in dwarf kidney bean plants. Agr.



Biol. Chem. 38:719-725.

- 5.- Ashwell G. Colorimetric analysis of sugars. Methods in Enzymol. 3: 96-97.
- 6.- Barendse, G.W.M.; Van de Werken, P.H. 1980. High-Performance liquid chromatography of gibberellins. J. of Chromatog. 198: 449-455.
- 7.- Binks R., MacMillan J. and Pryce R.J. 1969. Combined gas chromatography-mass spectrometry of the methyl esters of gibberellins A<sub>1</sub> to A<sub>24</sub> and their trimethylsilyl ethers. Phytochemistry. 8: 271-284.
- 8.- Borrow, A.; Brown, S.; Jefferys, E.G.; Kessell, R.H.J. 1964. The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. Can. J. of Microbiol. 10: 445-466.

- 9.- Borrow, A.; Brown, S.; Jefferys, E.G.; Kessell, R.H.J. 1964. kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.*, **10**: 407-444.
  
- 10.- Bowen D.H., Crozier A., MacMillan J. and Reid D.M. 1973. Characterization of gibberellins from light-grown *Phaseolus coccineus* seedlings by combined GC-MS. *Phytochemistry*. **12**: 2935-2941.
  
- 11.- Brian P.W. and Grove J.F. 1957. The Gibberellic acid. *Endeavour*. **63**: 161-171.
  
- 12.- Brückner Betting and Blechschmidt, D. 1991. The gibberellin fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*. **11**: 163-192.
  
- 13.- Capellini, R.A.; and Peterson J.L. 1965. *Mycologia Plant Pathological Methods Fungi and Bacteria*. **57**: 962-966. John Tuite. Ed. Burges Publishing Company.

- 14.- Carito, S.L.; Pisano, M.E. 1966. Production of Alanine by *Fusarium moniliforme*. Appl. Microbiol. **14**: 39-44.
- 15.- Carreón Chávez, L.M. 1993 - Introducción a la esporulación de *G. fujikuroi*. Tesis. Químico Farmacético Biólogo. F.C.Q., U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 16.- Casas Campillo C. and Bautista M. 1965. Microbiological aspects in the hydroxylation of estrogens by *Fusarium moniliforme*. Appl. Microbiol. **13**: 977-984.
- 17.- Chary, S.J. and Reddy, S.M. 1985. Starch-Degrading Enzymes of two species of *fusarium*. Folia Microbiol. **30**: 452-457.
- 18.- Corgan, J.N. and Widmoyer, F.B. 1971. The effects of gibberellic acid on flower differentiation, date of bloom and flower hardness of peach. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **96**: 54-57.

- 19.- Detroy, R.W. and Hesseltine C.W. 1978. Availability and utilization of agricultural and agroindustrial wastes. Proc. Biochem.
- 20.- Durand A., De la Broise D. and Blachere H. 1988. Laboratory scale bioreactor for solid state process. J. Biotechnol. 59-66.
- 21.- Durley, R.C.; Crozier, A.; Pharis, R.P. and McLaughlin, G.E. 1972. Chromatography of 33 gibberellins on a gradient eluted silica gel partition column. Phytochemistry. 11: 3029-3033.
- 22.- Durley R.C., MacMillan J. and Pryce R.J. 1971. Investigation of gibberellins and other growth substances in the seed of Phaseolus multiflorus and of Phaseolus vulgaris by gas chromatography and by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochemistry. 10: 1891-1908.

- 23.- Gohlwar, G.S., Sethi, R.P., Marwaha, S.S. and Seghal, V.K. 1984. Gibberellic acid biosynthesis from whey and simulation of cultural parameters. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 312-316.
- 24.- Grove, J.F. Gibberellins. In "Biochemistry of Industrial Microorganisms" 320-340. Ed. Rainbow C. and Rose, A.H. Academic Press, London and N. Y.
- 25.- Harada H. and Nitsch J.P. 1967. Isolation of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>9</sub> and of a fourth growth substance from *Althaea rosea* cav. *Phytochemistry.* **6**: 1695-1703.
- 26.- Harrison D.M. and MacMillan J. 1971. Two new gibberellins, A<sub>24</sub> y A<sub>25</sub>, from *Gibberella fujikuroi*, their isolation, structure, and correlation with gibberellins A<sub>13</sub> and A<sub>15</sub>. *J. Chem. Soc. (C)* 631-636.
- 27.- Hebert D., Phipps P.J., Strange R.E. 1972. *Methods*

in Microbiology, Ribbons W. and Norris J.R. Ed. Vol  
5b. Academic Press, N. Y.

- 28.- Hesseltine C.W. 1977. Solid state fermentation part.  
1 Proc. Biochem. 24-31.
- 29.- Holme T., Zacharias, B. 1965. Gibberellic acid  
formation in continuous culture. Biotechnol. and  
Bioeng. 7: 405-415.
- 30.- Holt Sackett, P. 1984. High-Performance thin-layer  
chromatography of gibberellins in fermentation  
broths. Anal. Chem. 56: 1600-1603.
- 31.- Horgan, R. and Kramers, M.R. 1979. High-performance  
liquid chromatography of cytokinins. J. Chromatog.  
173: 263-270.
- 32.- Jacobs W.P. and Pruett P.E. 1973. The time-course  
of polar movement of gibberellin through zea roots.

Amer. J. Bot. 60: 896-900.

- 33.- Jefferys, E.G. 1970. The Gibberellin Fermentation  
in Hartman, P.A. Adv. in Appl. Microbiol. 13:  
283-316.
- 34.- Jones K.C., West .C.A. and Phinney B.O. 1968.  
Isolation, identification and biological properties  
of gibberellin A<sub>14</sub> from *Gibberella fujikuroi*.  
Phytochemistry. 7: 283-291.
- 35.- Kahlon, S.S. and Malhotra, S. 1986. Production of  
gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in  
sodium alginate. Enzyme Microb. Technol. 8: 613-616.
- 36.- Kitamura, H.; Kwarada, A.; Seta, Y. and Sumiki, Y.  
Biochemistry of the bakanae fungus XXVII. The  
production of gibberellins by sumerged culture. 1953.  
J. Agric Chem. Soc. Japan 27: 545-549.

- 37.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1986. Spectrofluorodensitometric estimation in thin-layer chromatography of gibberellic acid produced by solid state fermentation. *J. Chromatog.* **369**: 222-226.
- 38.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987. Extraction of Gibberellic acid from dry mouldy bran produced under solid state fermentation *Proc. Biochem.* 139-143.
- 39.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987. Gibberellic acid by solid state fermentation: Consistent and improved yields. *Biotechnol. and Bioeng.* **30**: 267-271.
- 40.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987. Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnol. Letters.* **9**: 179-182.



- 41.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1988. Batch and Fed Batch solid state fermentation: Kinetics of cell growth, hydrolytic enzymes production, and gibberellic acid production. Proc. Biochem. 43-47.
- 42.- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. 1988 Immobilized growing cells of *Gibberella fujikuroi* P-3 for production of gibberellic acid and pigment in batch and semi-continuous cultures. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 28: 537-542.
- 43.- Kumar, P.K.R. and Lonsane B.K. 1990. Solid state fermentation: physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 145-148.
- 44.- Lindenfelden L.A., Ciegler A. 1975. Solid substrated fermentor for schratoxin a production. Appl. Microbiol. 323-327.

- 45.- Macey A., Stowell K.G. 1979. Practical studies on scientific control in commercial maltings. In *Brewing Science*. 1: 108-109.
- 46.- Macmillan, J. and Wels C.M. 1973. Partition chromatography of gibberellins and related diterpenes on columns of Sephadex LH-20. *J. Chromatog.* 87: 271-276.
- 47.- Macmillan J., Suter P.J. 1963. Thin layer chromatography of the gibberellins. *Nature* 790.
- 48.- Macris, B.J. and Markakis, P. 1981. Characterization of extracellular  $\beta$ -D- galactosidase from *Fusarium moniliforme* grown in whey. *Appl. and Environ. Microbiol.* 41: 956-958.
- 49.- Maddox, I.S. and Richert, S.H. 1977. Production of gibberellic acid using a dairy waste as the basal medium. *Appl. and Environ. Microbiol.* Jan. 1977, 33: 201-202.

- 50.- Malik V.S. 1982. Genetic and biochemistry of secondary metabolism. Adv. and Appl. Microbiol. 28: 27-107.
- 51.- Mandels M., Hontz L. and Nystrom J. 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. Biotechnol. and Bioeng. 16: 1471-1493.
- 52.- Miller, G.L. 1959. The 3,5 Dinitrosalicylic Acid Method. Anal. Chem. 1959. 31: 426.
- 53.- Moll M. 1979. Analysis and composition of barley and malt. In Brewing Science. 1: 54-56.
- 54.- Mudgett R.E. 1986. Solid state fermentations. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology ASM. Washington, D.C. 66-83.
- 55.- Murofushi N., Durley R.C. and Pharis R.P. 1974. Preparation of radioactive Gibberellins A<sub>20</sub>, A<sub>5</sub> y A<sub>8</sub>. Agr. Biol. Chem., 38: 475-476.

- 56.- Nagai S., Nishio N. 1980. Biochemical Engineering problems on solid state culture. "Proceedings of the oriental fermented foods". Foods Industry Research and Development Institute, Hsinchu Taiwan, Republic of China.
- 57.- Nava Saucedo J.E., Barbotin J-N, and Thomas, D. 1989. Physiological and morphological modifications in immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelia. Appl. Environ. Microbiol. Sep. 1989, 55: 2377-2384.
- 58.- Nava Saucedo, J.E., Barbotin, J-N and Thomas, D. 1989. Continous production of gibberellic acid in a fixed-bed reactor by immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi* in calcium alginate beads Appl. Microbiol. Biotechnol, 30: 226-233.
- 59.- Phillipps H.D., Strange F.J. 1972. Methods in Microbiology. Ribbons W. and Morris J.R. Ed. Vol. 5B Academic Press, New York.

- 60.- Pitel, D.W.; Vining, L.C. and Arsenault, G.P. 1971.  
Biosynthesis of Gibberellins in *Gibberella fujikuroi*.  
The sequence after Gibberellin A<sub>4</sub>. Can. J. Biochem.  
49: 194-200.
- 61.- Powell L.E. and tautvydas K.J. 1967. Chromatography  
of gibberellins on silica gel partition columns.  
Nature. 292-293.
- 62.- Rivier,L.; Gaskin, P.; Albone, K-Y.-S. and MacMillan,  
J. 1981 GC-MS Identification on endogenous  
gibberellin conjugates as their permethylated  
derivatives. Phytochemistry, 20: 687-692. Rhodes  
R.A. and Orton W.L. 1975.
- 63.- Smith-Berry. 1974. An Introduction to Biochemistry of  
fungal Development Academic Press, 282-308.
- 64.- Sosa-Coronel J. and Motes J.E. 1982. Effects of  
gibberellic acid and seed rates on pepper seed

- germination in aerated water columns. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 290-295.
- 65.- Stodola, F.H.; Raper, K.B. 1955. The microbial production of gibberellins A and X. Arch. Biochem. Biophys, 54: 240.
- 66.- Suárez Herrera, M.A. 1993. Tesis Maestría. Giberelinas: Efecto de la fuente de carbono sobre su producción por *G. fujikuroi* ATCC-12616 utilizando un sistema de fermentación sólido por lotes preparado a base de residuos agroindustriales. F.C.Q., U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 67.- Weiner B.A. 1977 Characteristics of Aerobic, solid substrate fermentation of swine waste-corn mixtures. European J. Appl. Microbiol. 4: 51-57.
- 68.- Weiner B.A. 1977. Characteristics of aerobic, solid substrate fermentation of swine waste-corn mixtures. European J. Appl. Microbiol. 4: 51-57.

- 69.- Yabuta, T. and Hayashit. 1939. J. Agric. Chem. Soc. Japan 15: 257.
- 70.- Yabuta, T.; Sumuki Y.; Uno, S. 1939. J. Agric. Chem. Soc. Japan 15: 1209.
- 71.- Yamaguchi, I.; Fujisawa, S. and Takahashi, N. 1982. Qualitative and Semi-quantitative analysis of gibberellins. Phytochemistry, 21: 2049-2055.

VII.- APENDICE DE TABLAS.



**TABLA 1. Características fisicoquímicas de algunas giberelinas**

GIBERELINA	FORMULA	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR	PUNTO FUSION (°C)	ROTACION OPTICA ( ) <sub>D20</sub>
GA <sub>1</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>		348	255-258	+ 38°
GA <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>		346	234-236	+ 92°
GA <sub>4</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>		332	214-216	- 3°
GA <sub>7</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>		330	169-172	+ 20°
GA <sub>9</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>		316	208-211	- 22°
GA <sub>13</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>		334	194-196	- 48°

**TABLA 2. Importancia comercial del GA<sub>3</sub>**

<b>CULTIVO</b>	<b>EFEKTOS</b>	<b>APLICACION</b>	<b>PAIS</b>
<b>CAÑA DE AZUCAR</b>	<b>INCREMENTAR EL RENDIMIENTO DE LA COSECHA A MAS DE 5 TON. POR ACRE Y LA OBTENCION DE AZUCAR DE 0.2 A 0.5 TON. POR ACRE</b>	<b>62 GRS. DE GA<sub>3</sub>, APLICACION COMO CALDO GIBERILINAS SEMIPURIFICADAS Y CRISTALINAS</b>	<b>ESTADOS UNIDOS (HAWAI)</b>
<b>SEMILLAS DE PAPA</b>	<b>ESTIMULAR LA GERMINACION (PARTICULARMENTE UTIL EN CLIMAS CON DOS O TRES COSECHAS EN UNA ESTACION)</b>	<b>SUMERGIR INMEDIATAMENTE ANTES DE QUITAR LOS BROTES O PLANTAR</b>	<b>INDIA</b>
<b>ALCACHOFAS</b>	<b>INCREMENTAR EL NUMERO DE FRUTAS POR PLANTA; ADELANTANDO LA COSECHA POR VARIAS SEMANAS</b>	<b>120 ppm POR APLICACION FOLIAR</b>	<b>CHIPRE ESPAÑA ISRAEL ITALIA</b>
<b>RUIBARBO</b>	<b>ESTIMULAR LA GERMINACION EN CULTIVOS TEMPRANOS, INCREMENTANDO EL RENDIMIENTO DE LOS TRONCOS</b>	<b>APLICACION DE SOLUCION DE GA<sub>3</sub> A LA CORONA DE LAS PLANTAS DE RUIBARBO</b>	<b>REINO UNIDO</b>
<b>LUPULO</b>	<b>INCREMENTAR RENDIMIENTOS ARRIBA DEL 40%</b>	<b>5 A 15 ppm POR APLICACION POR ATOMIZACION EN LAS ETAPAS DE ESCOBILLA O ANTES</b>	<b>AUSTRALIA E.U.</b>
<b>TOMATE</b>	<b>INCREMENTAR RENDIMIENTOS</b>	<b>40 GRS. POR HECTAREA POR ATOMIZACION (2 A 3 VECES) EN LA FLORACION</b>	<b>CHECOSLOVAQUIA</b>

**TABLA 3. Nutrientes experimentados en la fermentación giberelínica en sustrato sólido**

<b>MATERIAL SOLIDO :</b>	<b>SALVADO</b>
<b>FUENTE DE CARBONO</b>	<p>GLICEROL Y ALMIDON KITAMURA (1953)          GLICEROL Y GLUCOSA KITAMURA (1953)          GLICEROL DARK Y OTROS (1959)          MELASA SHKLYAR Y GLOBUS (1961-63)          SACAROSA LAB ABBOTT (1963)          SACAROSA Y GLUCOSA LAB ABBOTT (1963)          ACEITES NATURALES AGNISTAKOVA (1964)          LEROKHINA (1967)          MUROMTSEY (1968)</p>
<b>FUENTE DE NITROGENO</b>	<p>NITRATOS          SALES INORGANICAS          CLORURO DE AMONIO STODOLA Y OTROS (1955)          HARINA DE SEMILLA I.C.I. (1960)          DE ALGODON          LIQUIDO DE REMOJO PODOJIL Y RICICOVA (1965)          DE MAIZ          HARINA DE SOYA PODOJIL Y RICICOVA (1965)          GLICINA FUSOKA Y OTROS (1960-62)</p>
<b>OTROS COMPUESTOS</b>	FOSFATOS, SULFATOS, $\overset{++}{Mg}$ , $\overset{+}{K}$ , $\overset{++}{Zn}$ , $\overset{++}{Mo}$ y $\overset{++}{Cu}$

**TABLA 4. Contenido nutritivo de los medios de esporulación**

M D E	pH	F D N	F D C	S M
CALDO CZAPECK	7.3	$N_aNO_3$	SACAROSA	Mg <sup>++</sup> Y K <sup>+</sup>
GORODKOWA	5.0	PEPTONA	GLUCOSA	Fe <sup>++</sup> Y Mg <sup>++</sup>
H. MAIZ	6.0	PROTEINAS	DEXTROSA	Ca <sup>++</sup> Y Fe <sup>++</sup>
H. ARROZ	6.0	PROTEINAS	DEXTROSA	Ca <sup>++</sup> Y Fe <sup>++</sup>
PAN	7.0	PROTEINAS	ALMIDON	Ca <sup>++</sup> Y Fe <sup>++</sup>
GIS	7.0	N	N	Ca <sup>++</sup>
M. MALTA	6.0	PROTEINAS	DEXTROSA	Ca <sup>++</sup> Y Na <sup>+</sup>
M. ARROZ	6.0	PROTEINAS	DEXTROSA	Ca <sup>++</sup> Y Fe <sup>++</sup>
M. TRIGO	6.0	PROTEINAS	DEXTROSA	Ca <sup>++</sup> Y Fe <sup>++</sup>
CMC	6.0	$NH_4NO_3$	CELULOSA	K <sup>+</sup> Y Mg <sup>++</sup>

MDE ▪ MEDIO DE ESPORULACION

FDN ▪ FUENTE DE NITROGENO

FDC ▪ FUENTE DE CARBONO

SM ▪ SALES MINERALES

N ▪ NO CONTIENE

CMC ▪ CARBOXIMETILCELULOSA

**TABLA 5. Composición de los medios de cultivo para la fermentación giberelínica**

COMPONENTES	S-AS	S-G	S-AM	M-AS	M-G	M-AM
SALVADO DE TRIGO (g/matraz)	16	16	16	0	0	0
MASILLA (g)	0	0	0	16	16	16
ALMIDON SOLUBLE (g)	4	0	0	4	0	0
GLUCOSA (g)	0	4	0	0	4	0
ALMIDON DE MAIZ (g)	0	0	4	0	0	4
ACEITE DE LINAZA (ml)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
SOLUCION DE SALES MINERALES (ml)	16.2	16.2	16.2	16.2	16.2	16.2
SULFATO DE MAGNESIO AL 35% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
UREA AL 17.5% (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

**S-AS MEDIO DE SALVADO - ALMIDON SOLUBLE**  
**S-G MEDIO SALVADO - GLUCOSA**  
**S-AM MEDIO DE SALVADO - ALMIDON DE MAIZ**  
**M-AS MEDIO DE MASILLA - ALMIDON SOLUBLE**  
**M-G MEDIO DE MASILLA - GLUCOSA**  
**M-AM MEDIO DE MASILLA - ALMIDON DE MAIZ**

**TABLA 6. Análisis bromatológico de los soportes sólidos usados en la fermentación giberelínica**

<b>COMPONENTE</b>	<b>MASILLA</b>	<b>SALVADO</b>
<b>PROTEINA</b>	<b>23.4%</b>	<b>16.9%</b>
<b>GRASA</b>	<b>6.4%</b>	<b>4.6%</b>
<b>FIBRA</b>	<b>16.1%</b>	<b>10.0%</b>
<b>EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO</b>	<b>42.5%</b>	<b>55.0%</b>
<b>GENIZAS</b>	<b>3.9%</b>	<b>5.0%</b>

**TABLA 7. Composición de la solución de sales minerales usada en la formulación de los medios de cultivo para la fermentación giberelínica**

$\text{ZnSO}_{4.7} \text{H}_2\text{O}$	70 PPM
$\text{CuSO}_{4.5} \text{H}_2\text{O}$	70 PPM
$\text{FeSO}_{4.7} \text{H}_2\text{O}$	70 PPM
HCl	16.9%

**TABLA 8. Reactivos utilizados en las determinaciones de los parámetros de la fermentación gibberelínica**

REACTIVOS	PREPARACION
ACETILACETONA	COLOCAR 2.5 ml DE ACETILACETONA REDESTILADA EN 50 ml. DE AMORTIGUADOR DE CARBONATOS
REACTIVO DE ERLICH	DISOLVER 3.2 g. DE P-DIMETILAMINO BENZALDEHIDO EN 60 ml. DE ETANOL Y 60 ml. DE ACIDO CLORHIDRICO
SOLUCION AMORTIGUADORA DE CARBONATOS pH 9.6	MEZCLAR VOLUMENES IGUALES DE $\text{NaHCO}_2$ 1.0M Y $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1.0M
SOLUCION DE FENOLFTALEINA	DISOLVER 5.0g DE FENOLFTALEINA EN 100 ml. DE ETANOL
REACTIVO DEL DNS	DISOLVER 1g. DE ACIDO 3, 5 DINITRO SALICILICO EN 20 ml. DE HIDROXIDO DE SODIO 2N Y 50ml. DE AGUA, SEGUIDOS POR LA ADICION DE 30g. DE TARTRATO DE SODIO Y POTASIO. DILUIR A 300ml. CON AGUA DESTILADA



**TABLA 9. Solventes probados para la extracción de GA<sub>3</sub> en la fermentación giberelínica**

<b>ACETATO DE ETILO</b>
<b>METANOL</b>
<b>ACETONA</b>
<b>ETANOL ACIDO (pH 2.5)</b>

**TABLA 10. Eluentes de la fase móvil probados para la identificación cromatográfica de GA<sub>3</sub>**

<b>CLOROFORMO: ACETATO DE ETILO: ACIDO ACETICO</b>	<b>(5: 4: 1)</b>
<b>ETER ISOPROPILICO: ACIDO ACETICO</b>	<b>(9.5: 0.5)</b>
<b>BENCENO: ACIDO ACETICO: AGUA</b>	<b>(8: 3: 5)</b>
<b>METANOL: ACETONA</b>	<b>(8: 2)</b>
<b>CLORURO DE METILENO: METANOL</b>	<b>(7: 3)</b>
<b>BENCENO: ACIDO PROPIONICO: AGUA</b>	<b>(8: 3: 5)</b>

**TABLA 11. Métodos de revelado de los cromatogramas de los extractos de la masa fermentada**

REVELADOR	FORMA DE APLICACION	TRATAMIENTO FINAL DE LAS PLACAS
ACIDO SULFURICO CONC. CON ETANOL AL 5%	ATOMIZADO	CALENTAMIENTO A T=100 C/30 MIN.
ACIDO CLORHIDRICO CONC.	VAPORES	CALENTAMIENTO A T=110 C/10 MIN.

**TABLA 12. Peso seco de biomasa de G. fujikuroi en los diferentes medios de fermentación**

TIEMPO DE FERMENTACION ( DIAS )	PESO SECO DE BIOMASA (mg)					
	S-AS	S-G	S-AM	M-AS	M-G	M-AM
1	75.8	90	80.2	83.6	96.2	86.8
2	85.5	100.8	85.2	86.7	103.9	93.3
3	106.5	111.2	104.8	102.3	116.9	103.1
4	114.8	117.2	111.8	116.9	123.8	112.9
5	125.4	139.5	122.3	121.8	136.9	118.7
6	136.2	150.1	136.5	129.4	142.5	129.4
7	143.6	161.5	148.4	135.2	150.4	131.7
8	158	172.2	151.3	140.9	159	135.1

**S-AS - MEDIO DE SALVADO - ALMIDON SOLUBLE**

**S-G - MEDIO DE SALVADO - GLUCOSA**

**S-AM - MEDIO DE SALVADO - ALMIDON DE MAIZ**

**M-AS - MEDIO DE MASILLA - ALMIDON SOLUBLE**

**M-G - MEDIO DE MASILLA - GLUCOSA**

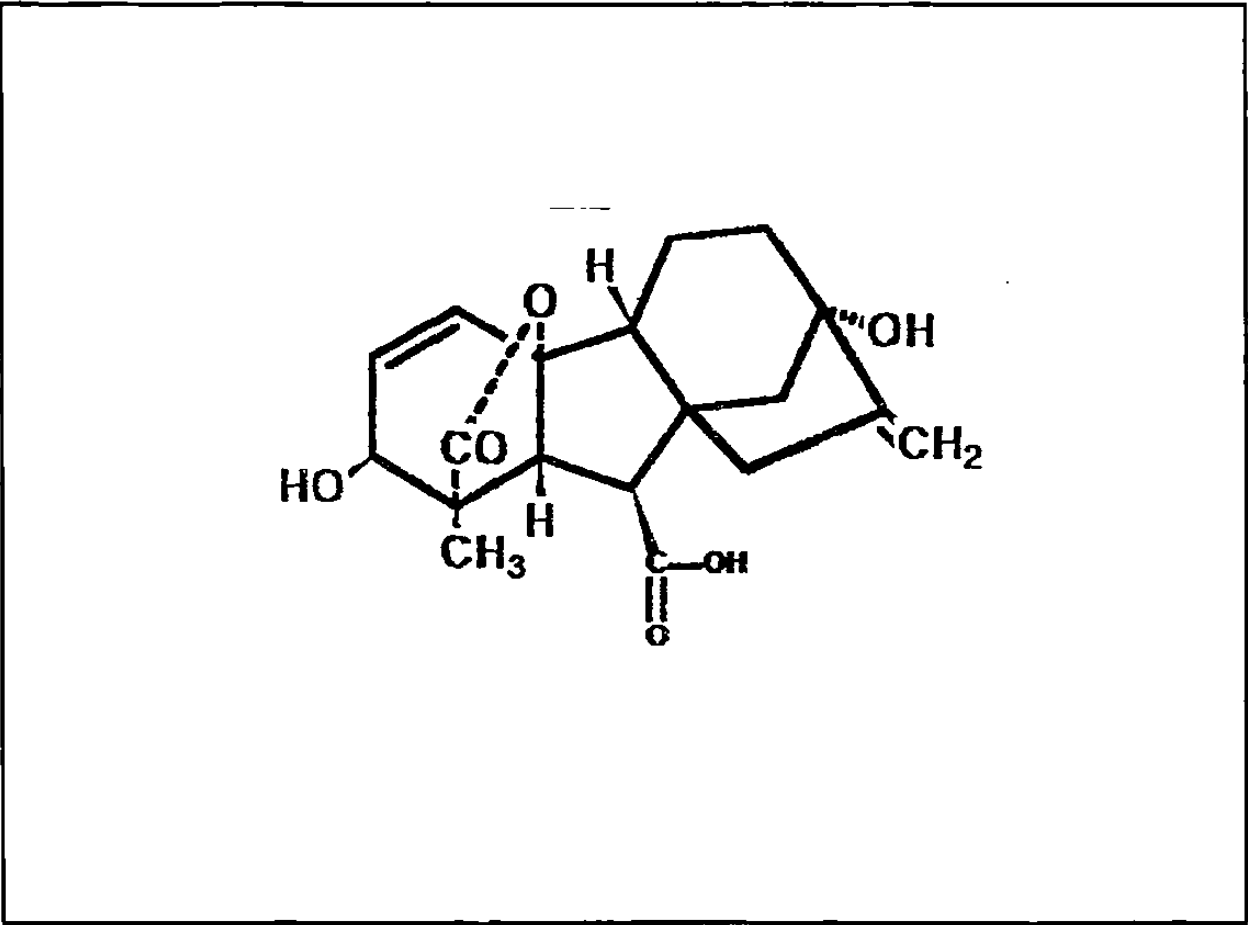
**M-AM - MEDIO DE MASILLA - ALMIDON DE MAIZ**

**TABLA 13. Producción de GA<sub>3</sub> por G. fujikuroi en los diferentes medios de fermentación**

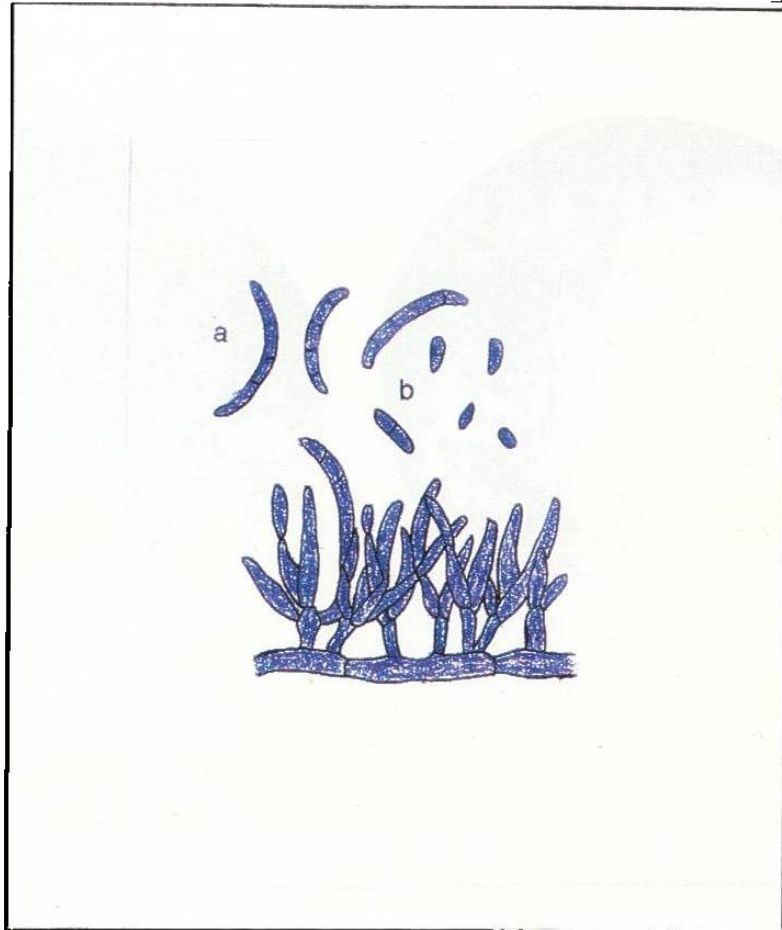
TIEMPO DE FERMENTACION ( DIAS )	Mg DE ACIDO GIBERELICO / Kg MEDIO DE CULTIVO					
	S-AS	S-G	S-AM	M-AS	M-G	M-AM
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	80	103	90	180	220	135
4	188	282	244	355	606	312
5	332	378	571	619	860	435
6	572	753	1132	1115	1048	561
7	1294	1054	1218	1235	1379	905
8	1380	1178	1280	1669	1802	1379

**S-AS - MEDIO DE SALVADO - ALMIDON SOLUBLE**  
**S-G - MEDIO DE SALVADO - GLUCOSA**  
**S-AM - MEDIO DE SALVADO - ALMIDON DE MAIZ**  
**M-AS - MEDIO DE MASILLA - ALMIDON SOLUBLE**  
**M-G - MEDIO DE MASILLA - GLUCOSA**  
**M-AM - MEDIO DE MASILLA - ALMIDON DE MAIZ**

VIII.- APENDICE DE FIGURAS.

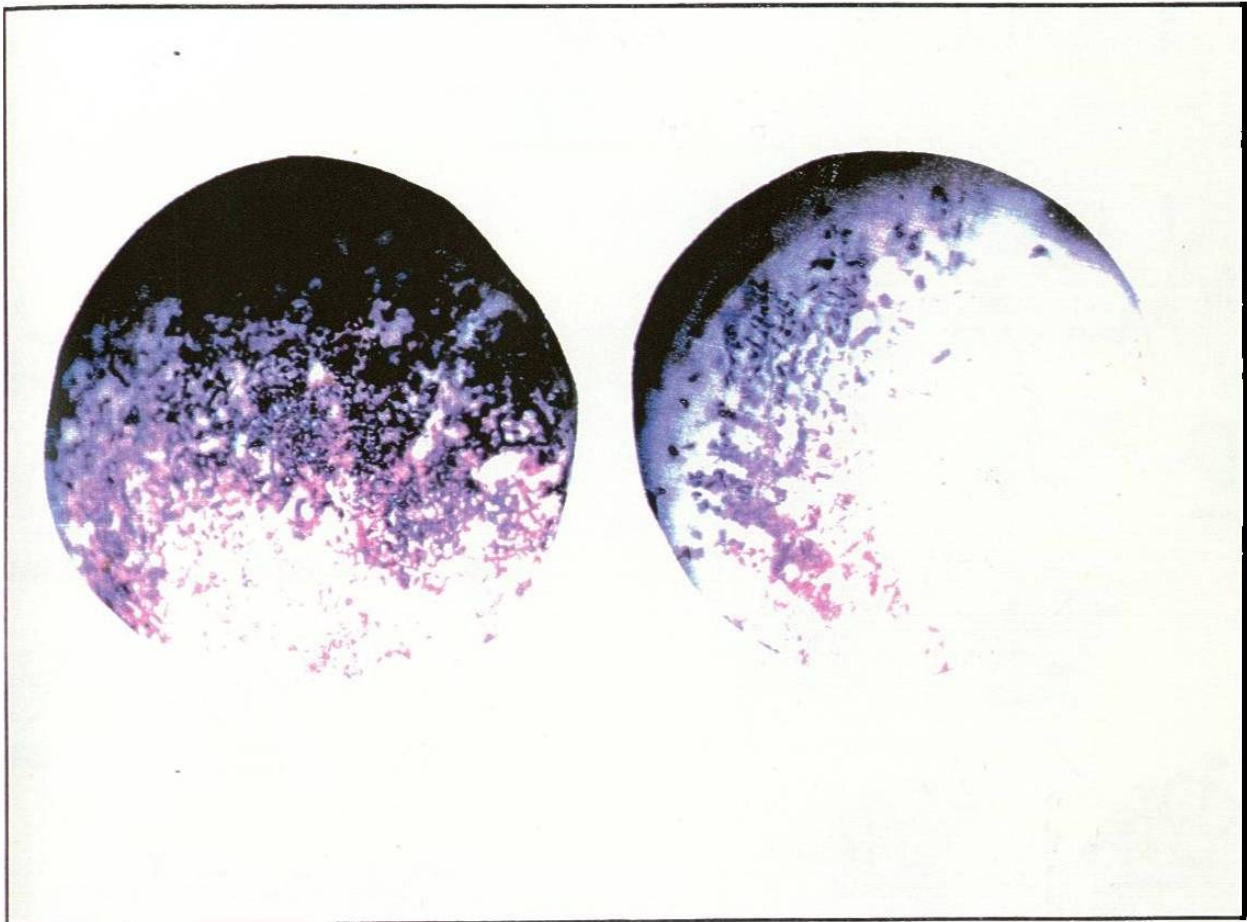


**FIGURA 1. Estructura química del ácido giberélico**

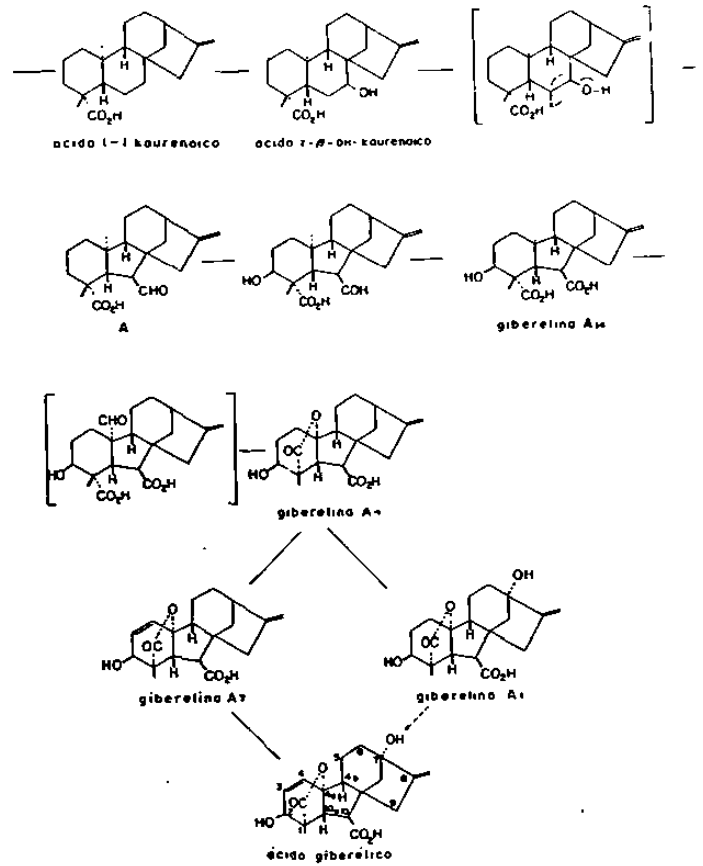
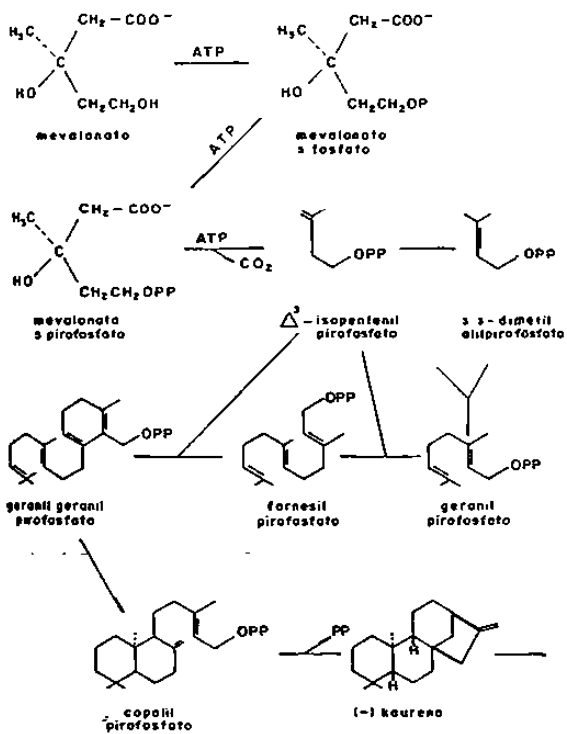
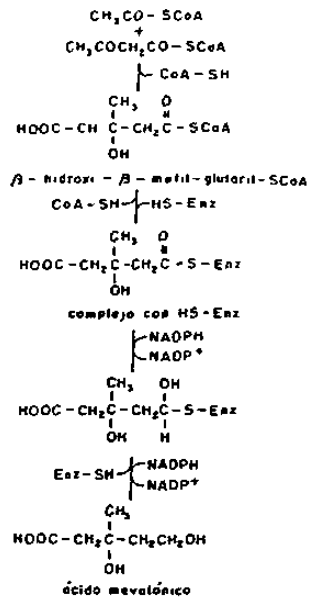


**FIGURA 2. Aspecto microscópico del hongo Gibberella fujikuroi**





**FIGURA 3. Aspecto macroscópico del hongo Gibberella fujikuroi**



**FIGURA 4. Ruta de biosíntesis de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi***

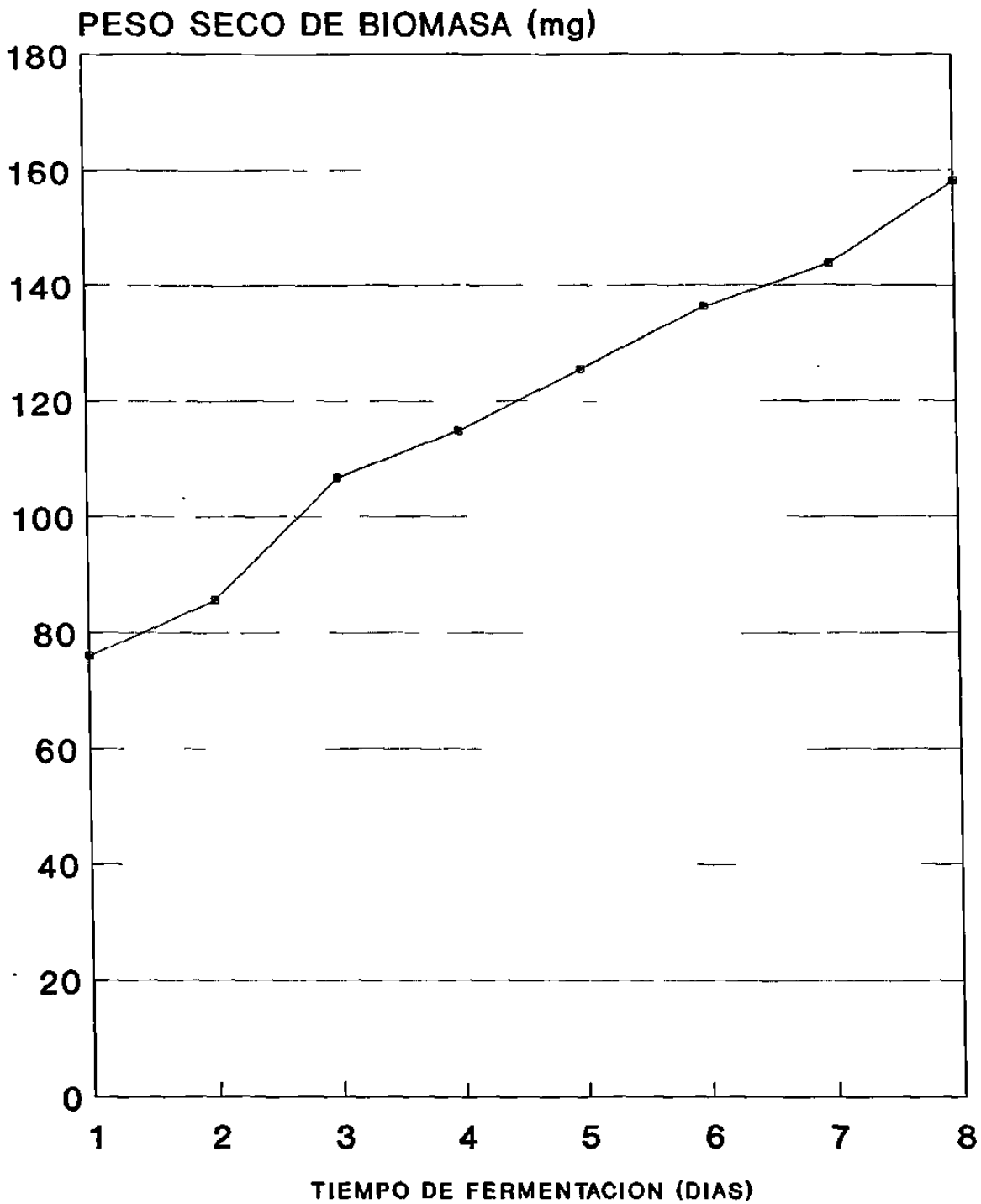


FIGURA 5. Curva de crecimiento de G. fujikuroi en medio de salvado - almidón soluble

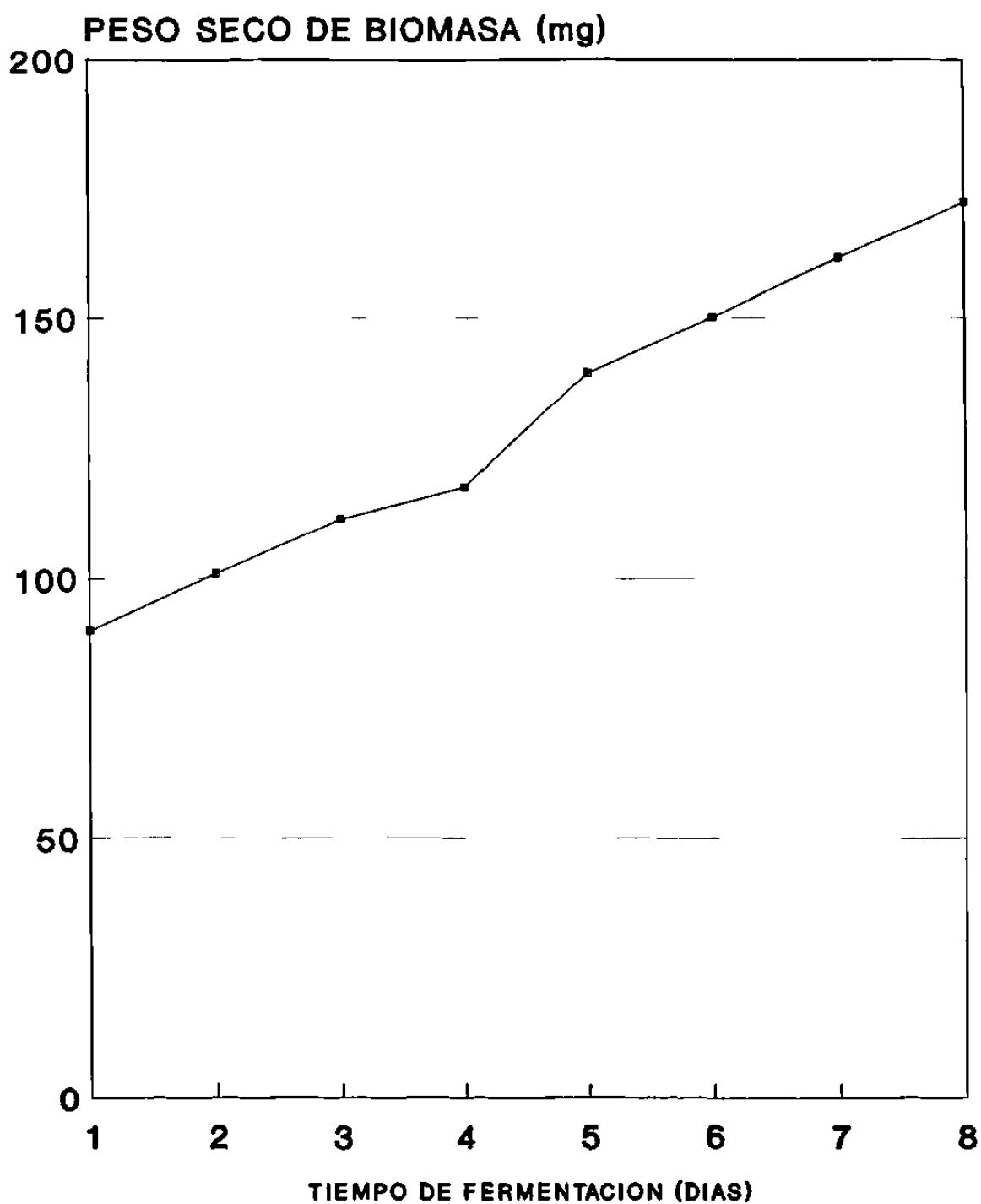
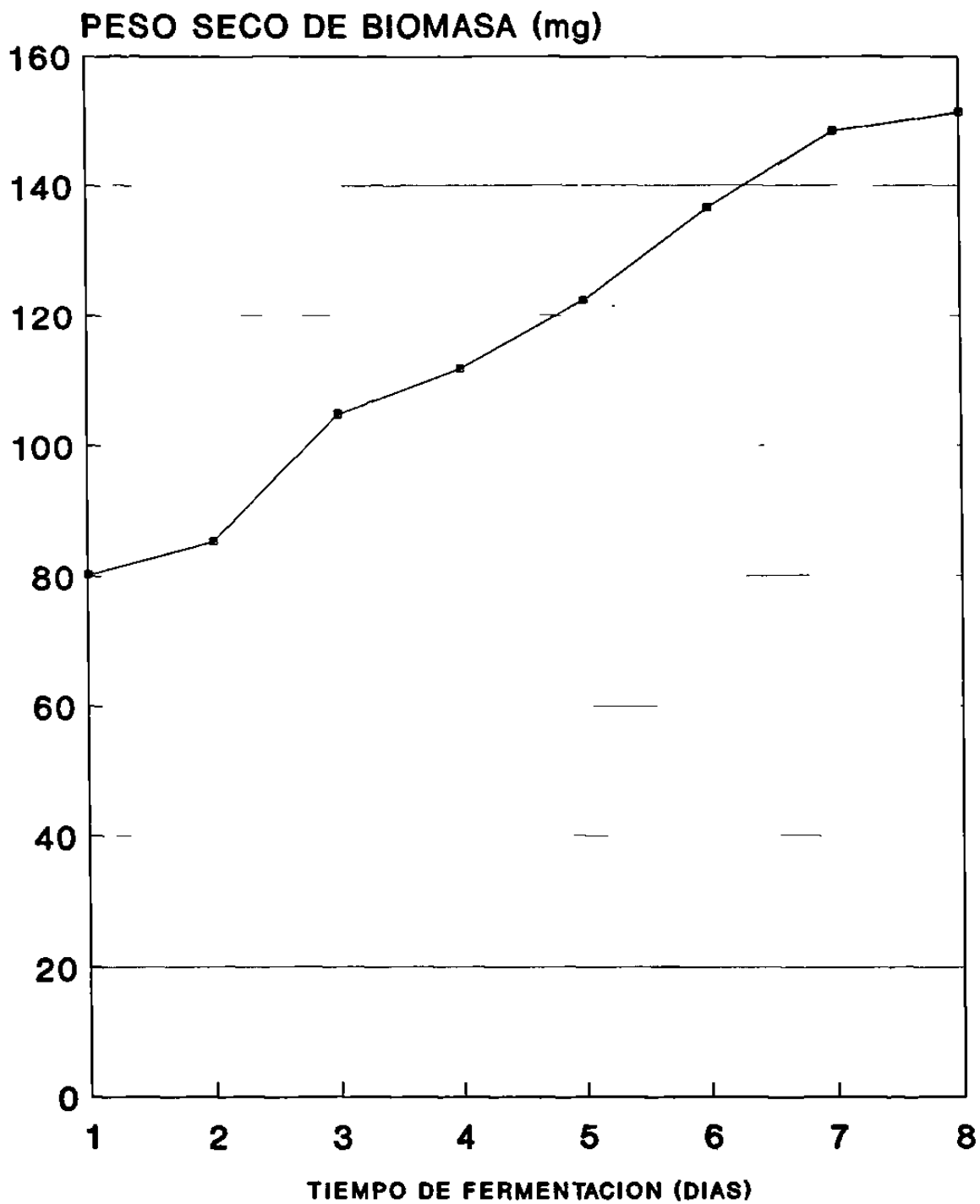
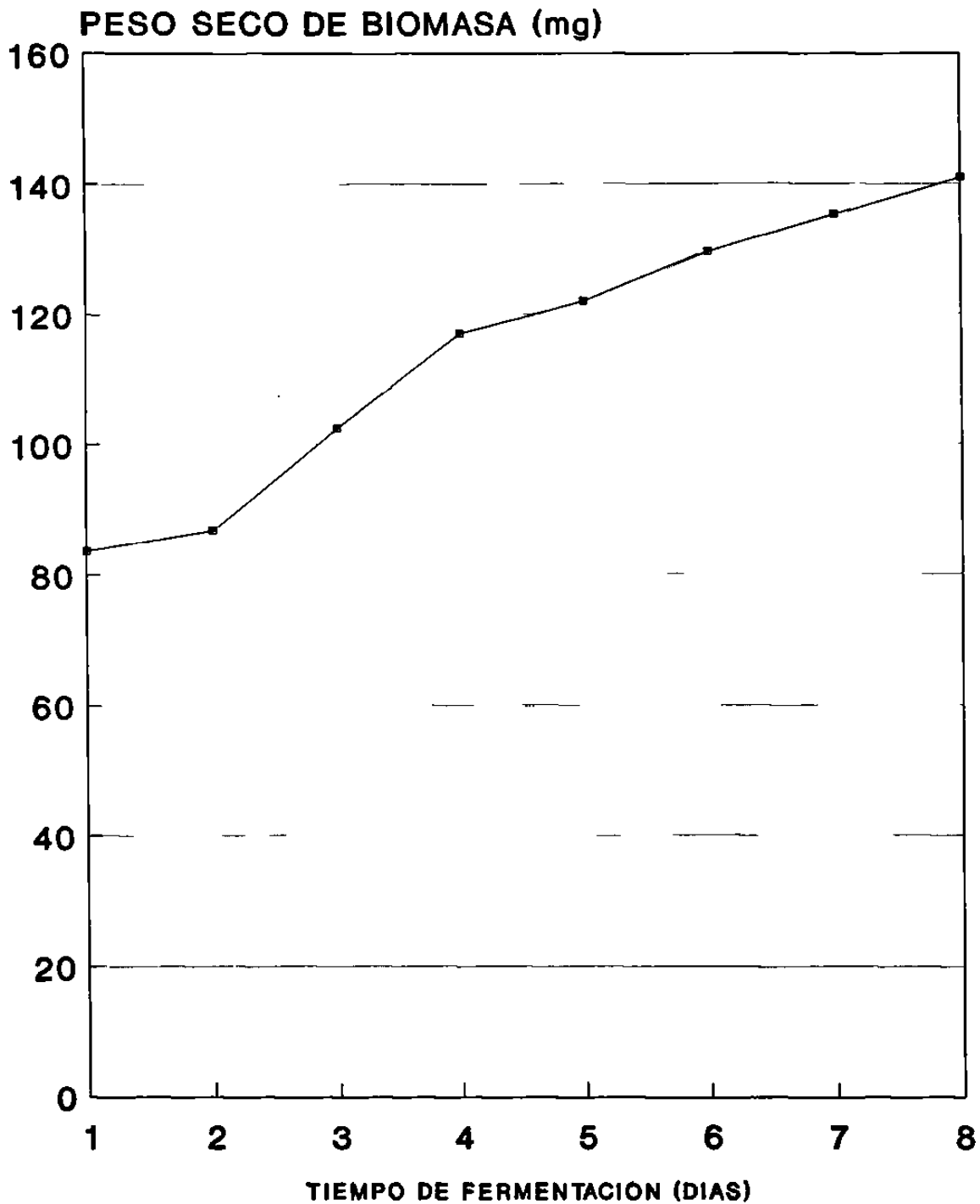


FIGURA 6. Curva de crecimiento de G. fujikuroi en medio de salvado - glucosa



**FIGURA 7. Curva de crecimiento de G. fujikuroi en medio de salvado - almidón de maíz**



**FIGURA 8.** Curva de crecimiento de G. fujikuroi en medio de masilla - almidón soluble

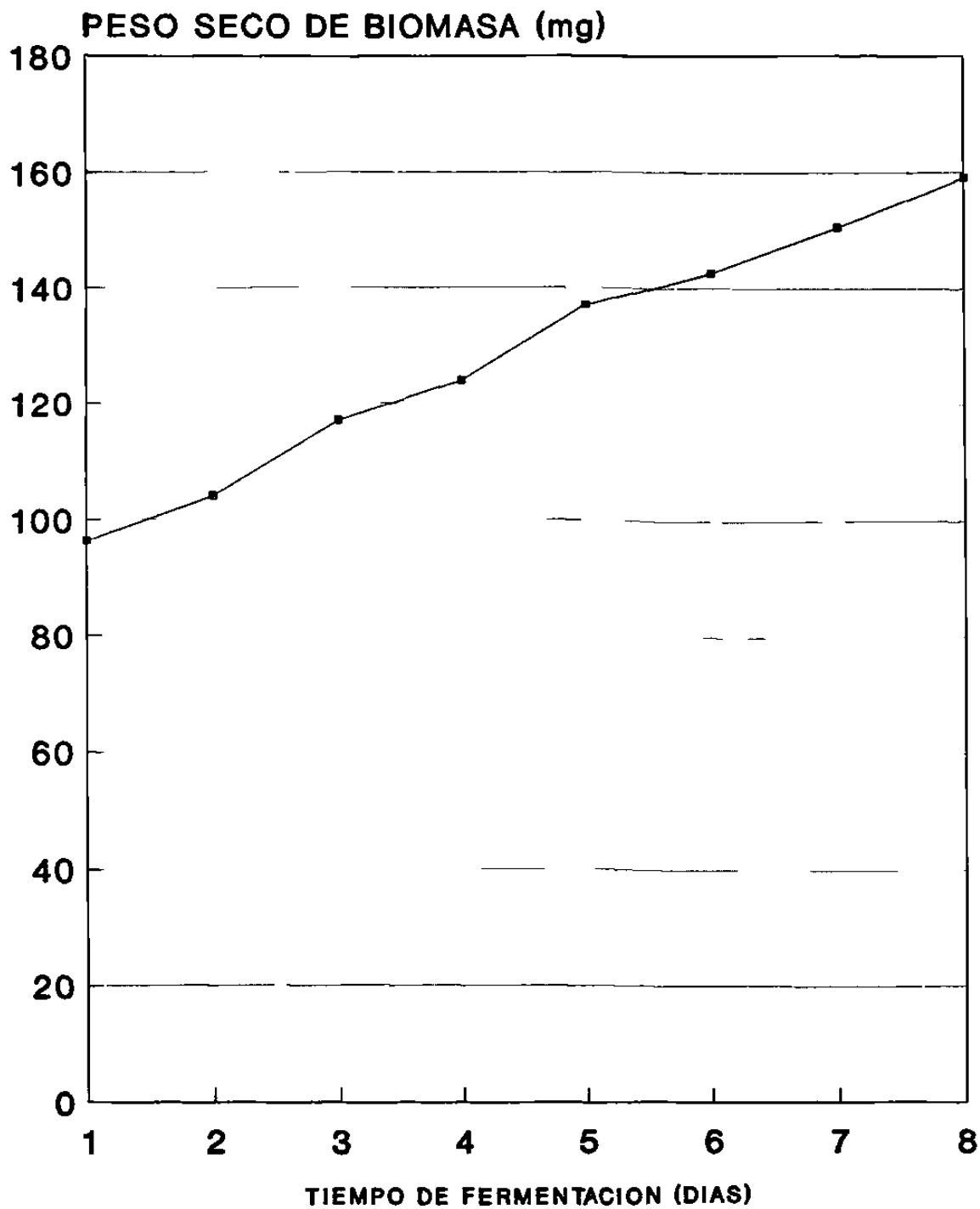


FIGURA 9. Curva de crecimiento de G. fujikuroi en medio de masilla - glucosa

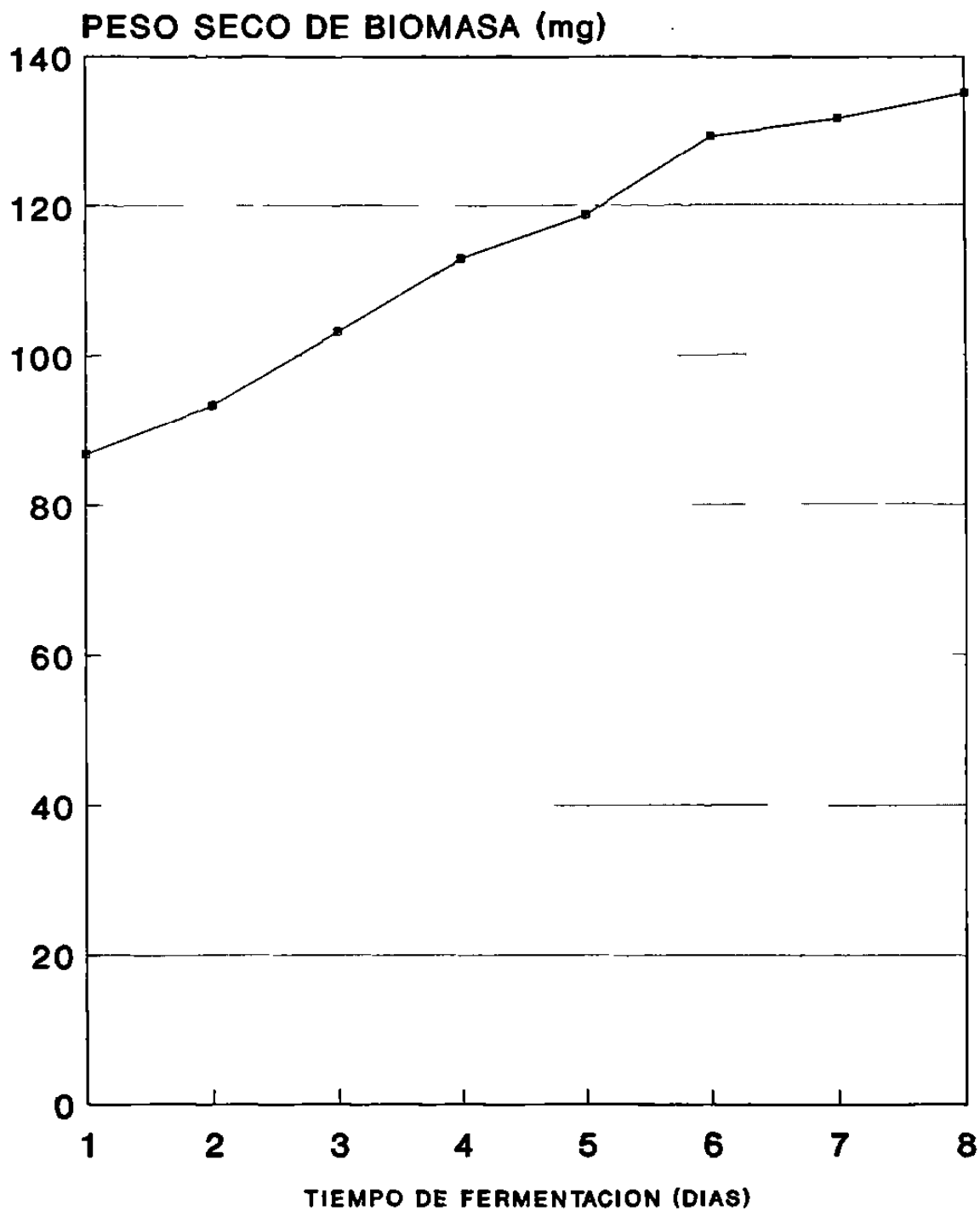
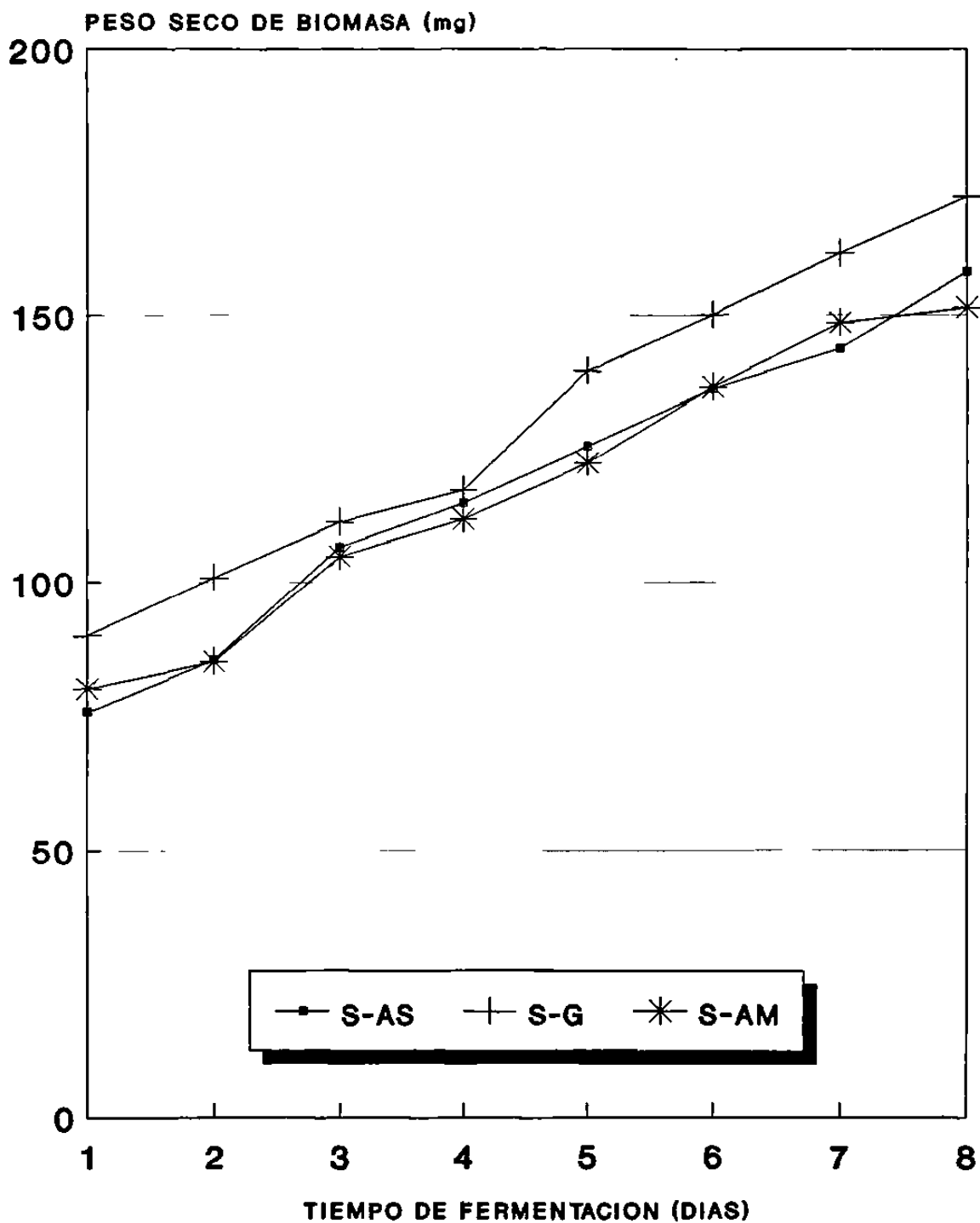


FIGURA 10. Curva de crecimiento de G. fujikuroi en medio de masilla - almidón de maíz





**FIGURA 11. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de G. fujikuroi en medios con salvado**

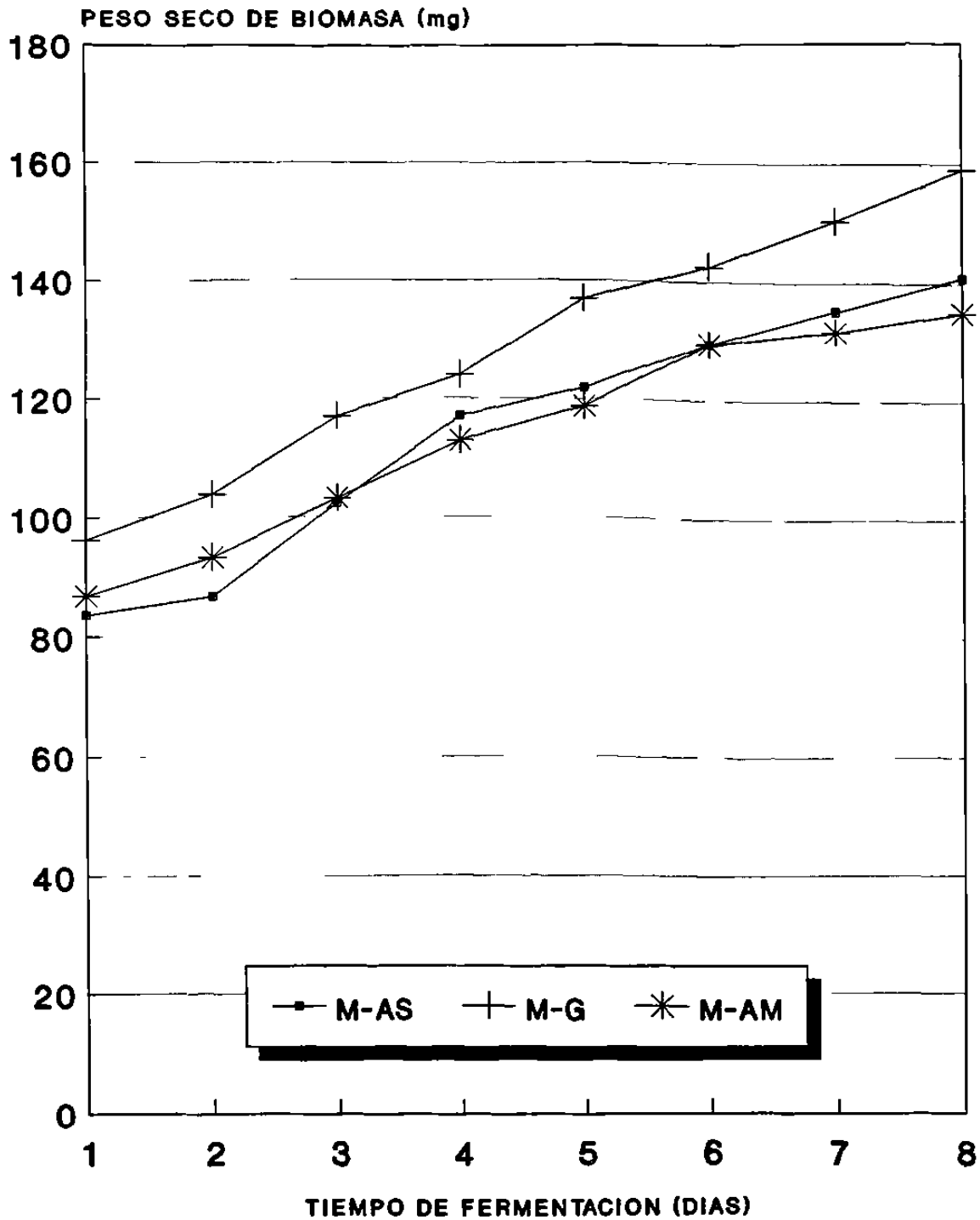
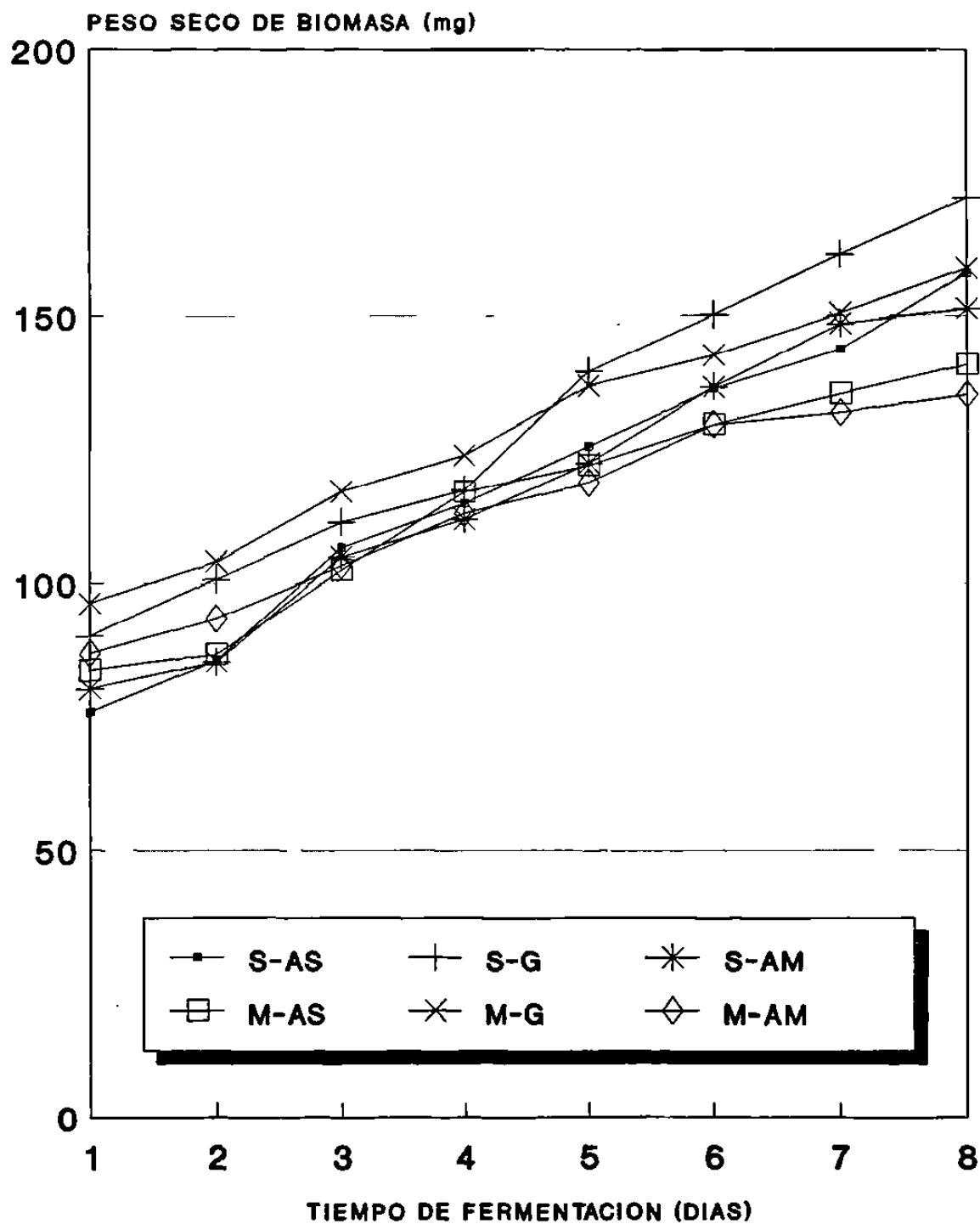


FIGURA 12. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento de G. fujikuroi en medios con masilla



**FIGURA 13. Comparación del crecimiento de *G. fujikuroi* en los medios de fermentación utilizados**

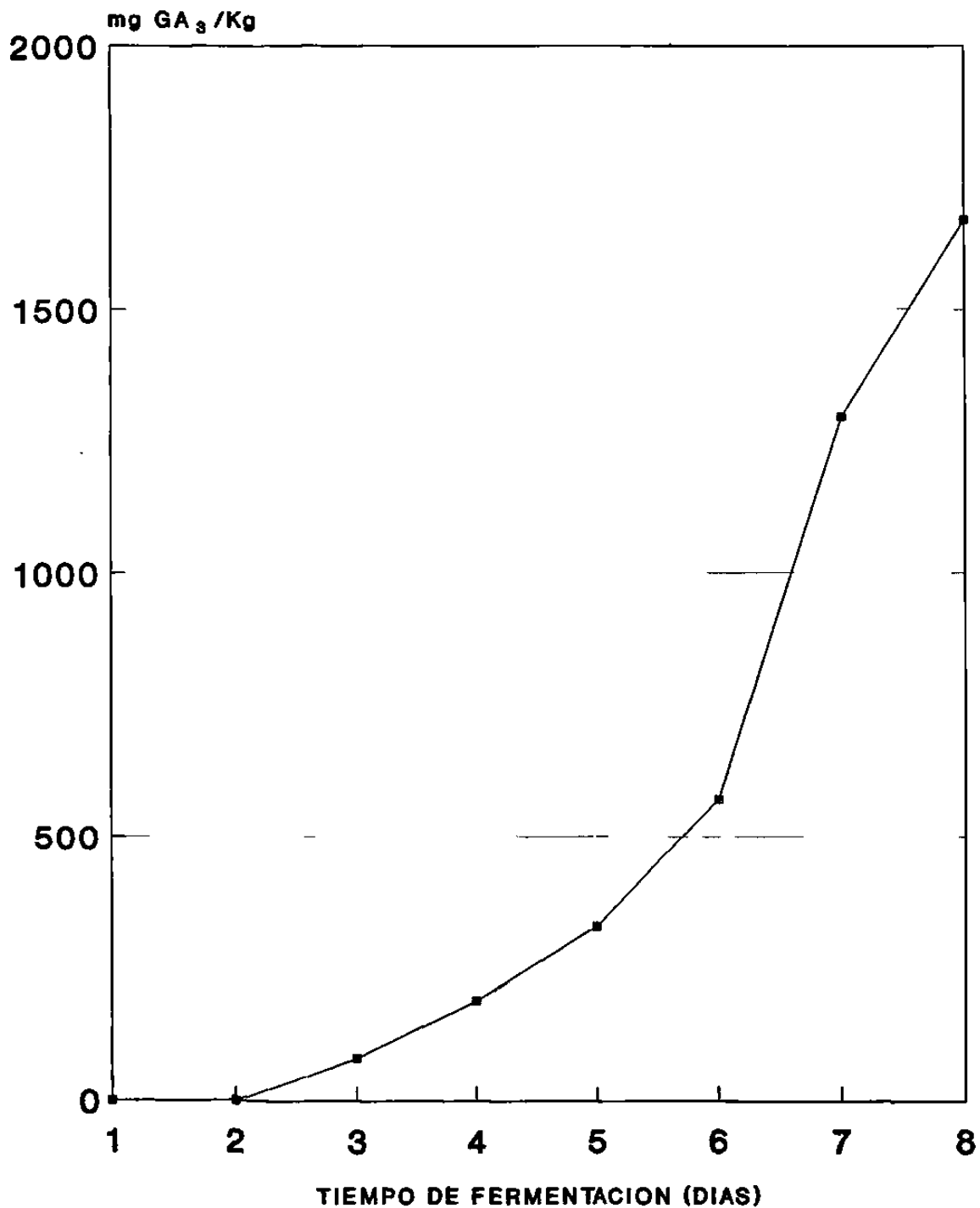
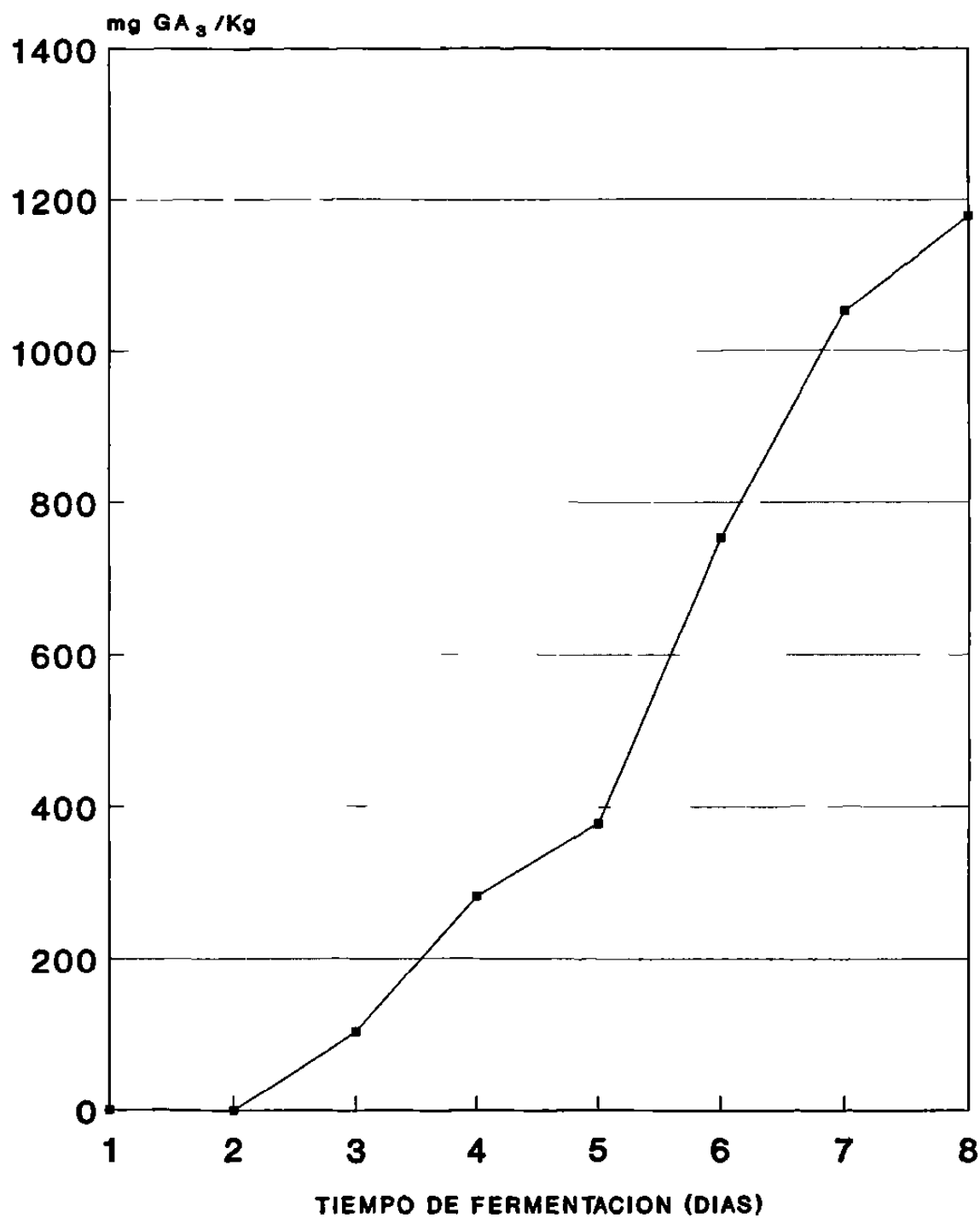


FIGURA 14. Producción de GA<sub>3</sub> en medio de salvado - almidón soluble por G. fujikuroi



TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)  
**FIGURA 15. Producción de GA<sub>3</sub> en medio de salvado - glucosa por G. fujikuroi**

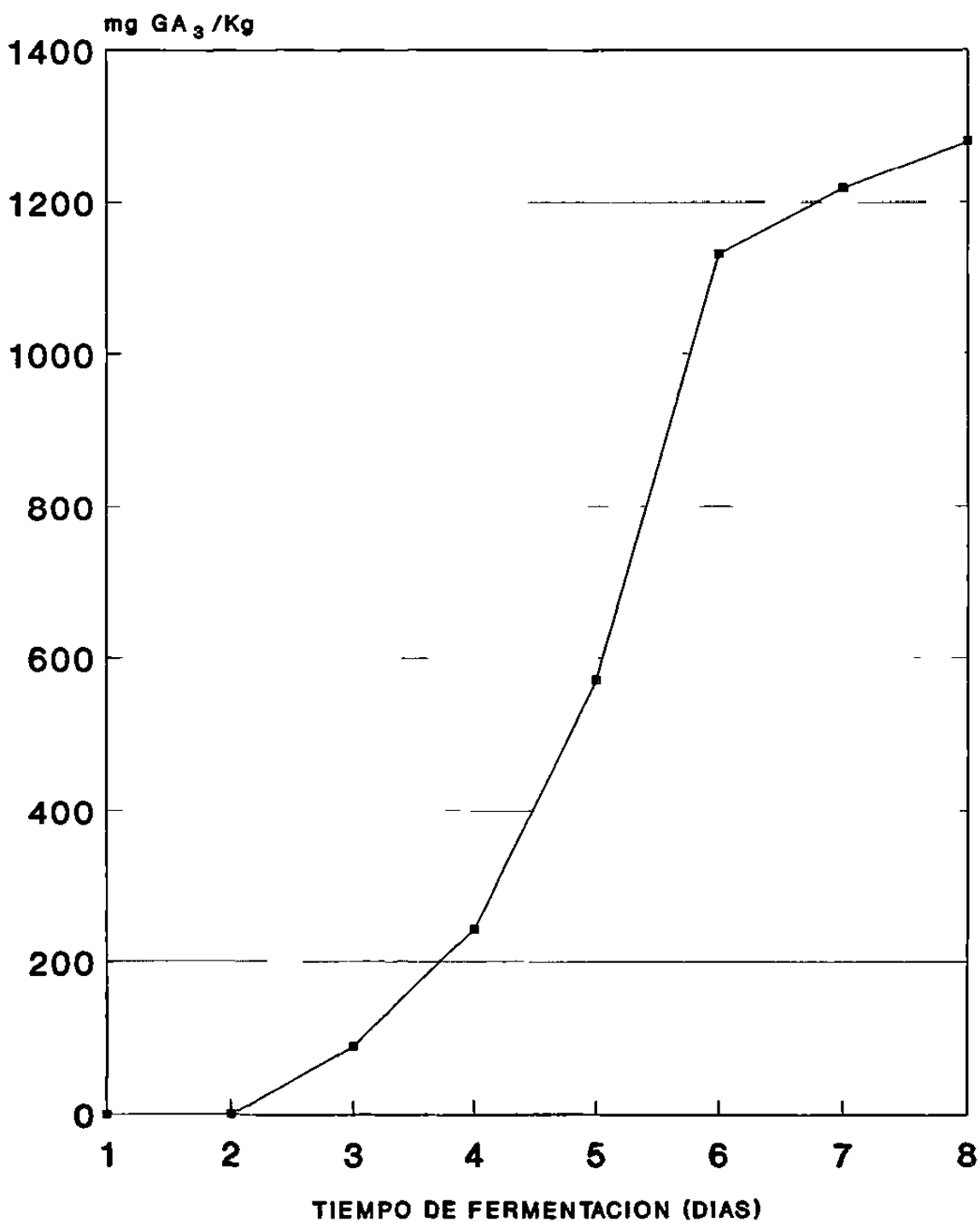
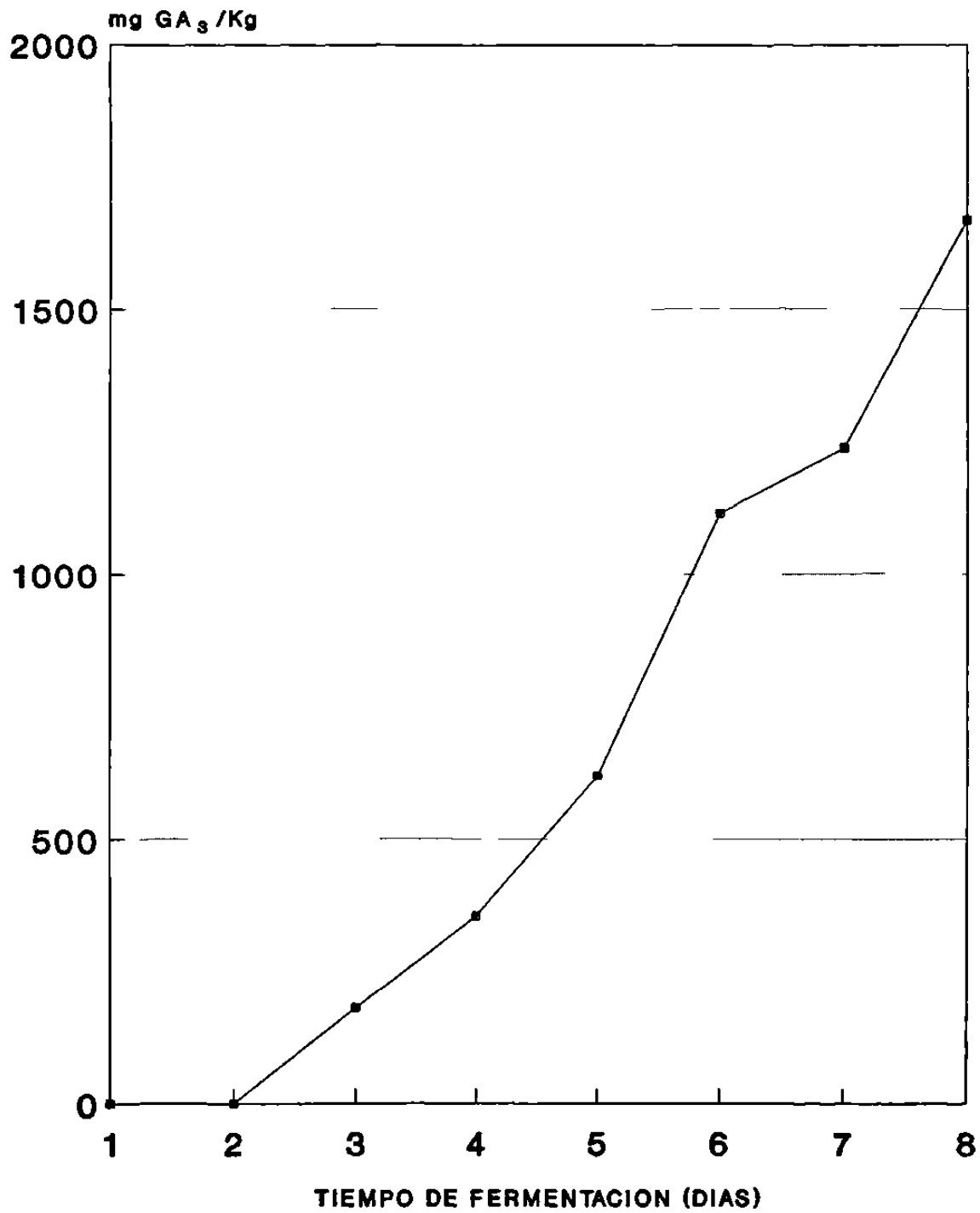
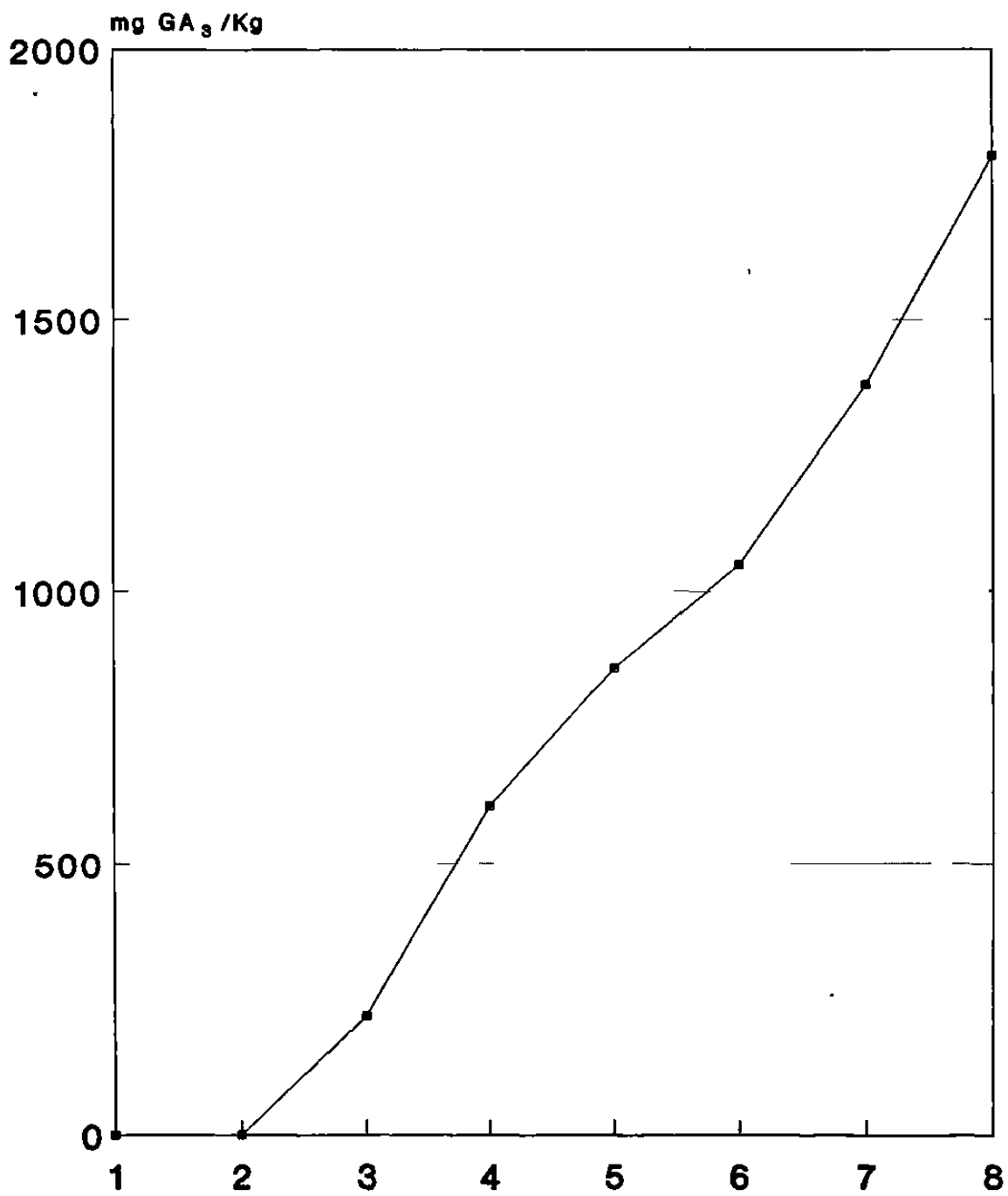


FIGURA 16. Producción de GA<sub>3</sub> en medio de salvado - almidón de maíz por G. fujikuroi

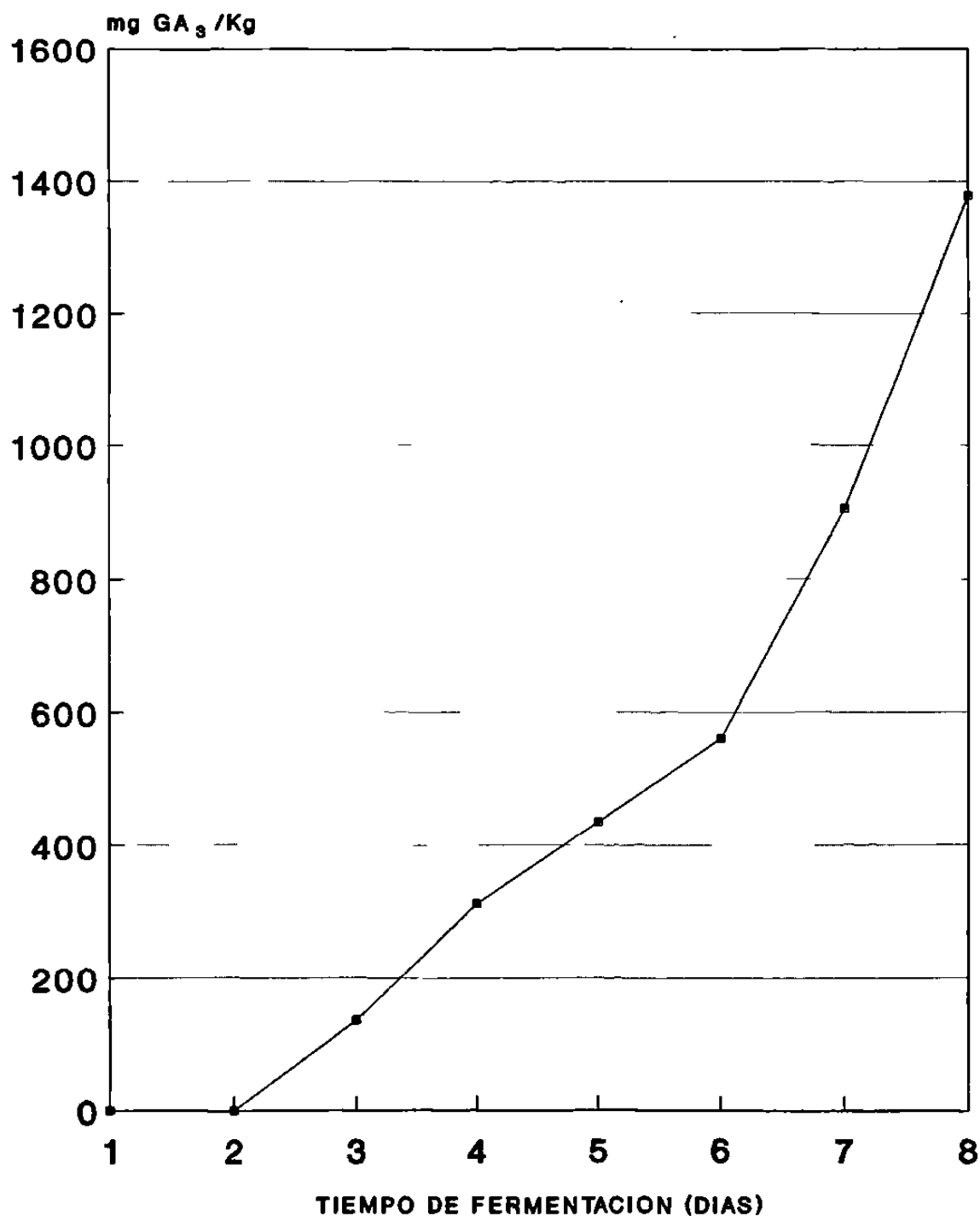


**FIGURA 17. Producción de GA<sub>3</sub> en medio de masilla - almidón soluble por G. fujikuroi**



TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)  
**FIGURA 18.** Producción de GA<sub>3</sub> en medio de masilla - glucosa por G. fujikuroi





TIEMPO DE FERMENTACION (DIAS)  
**FIGURA 19.** Producción de GA<sub>3</sub> en medio de masilla - almidón de maíz por G. fujikuroi

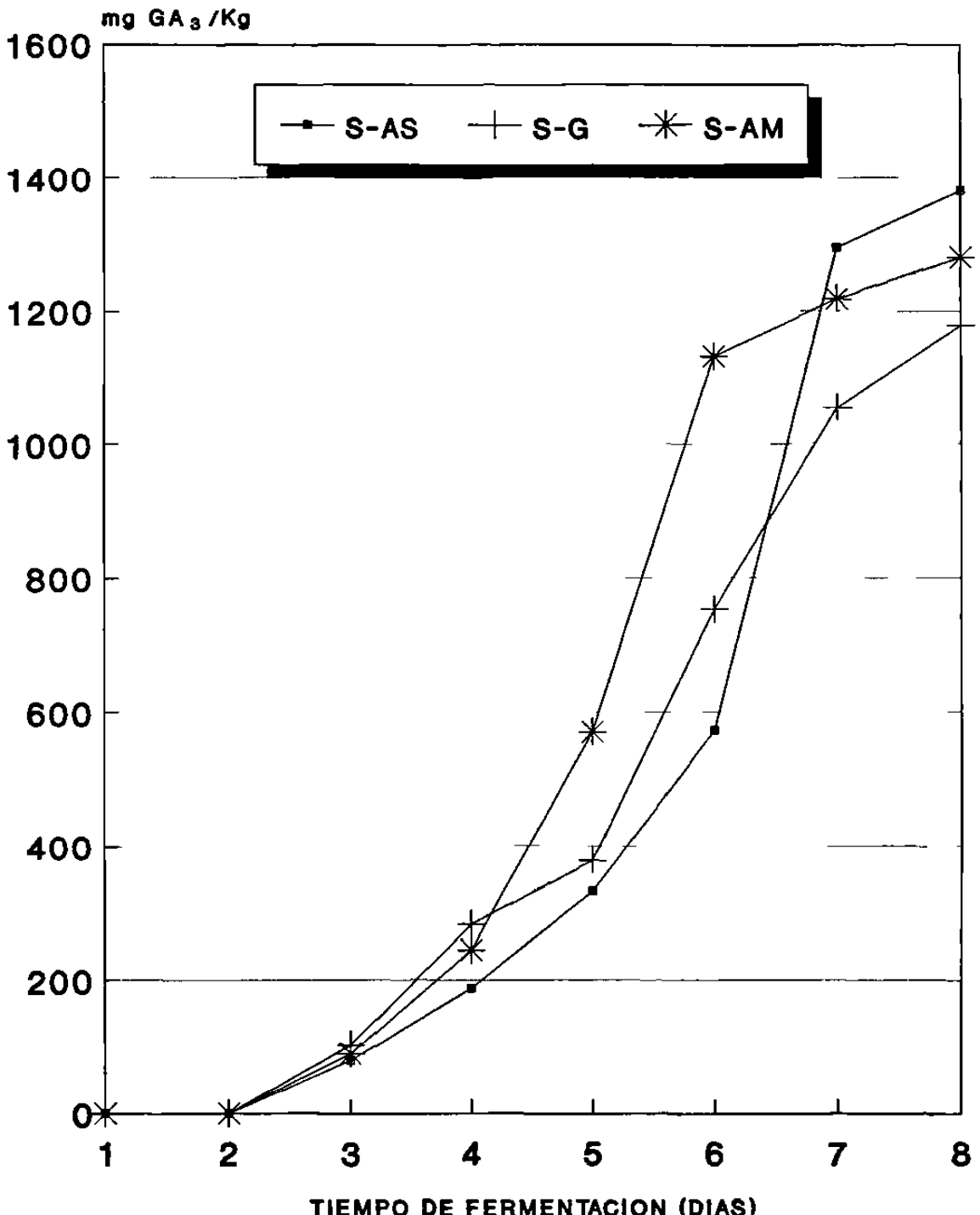
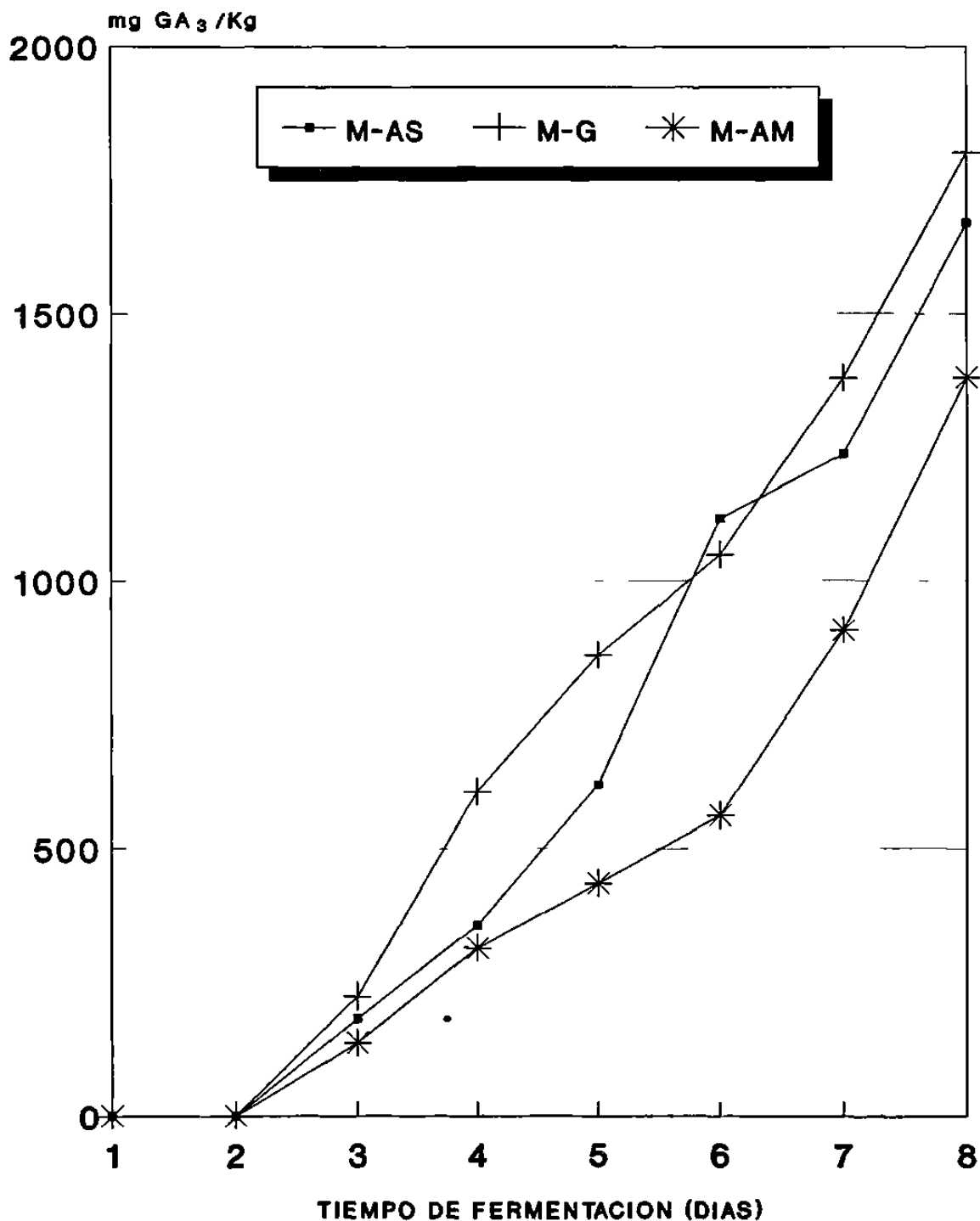
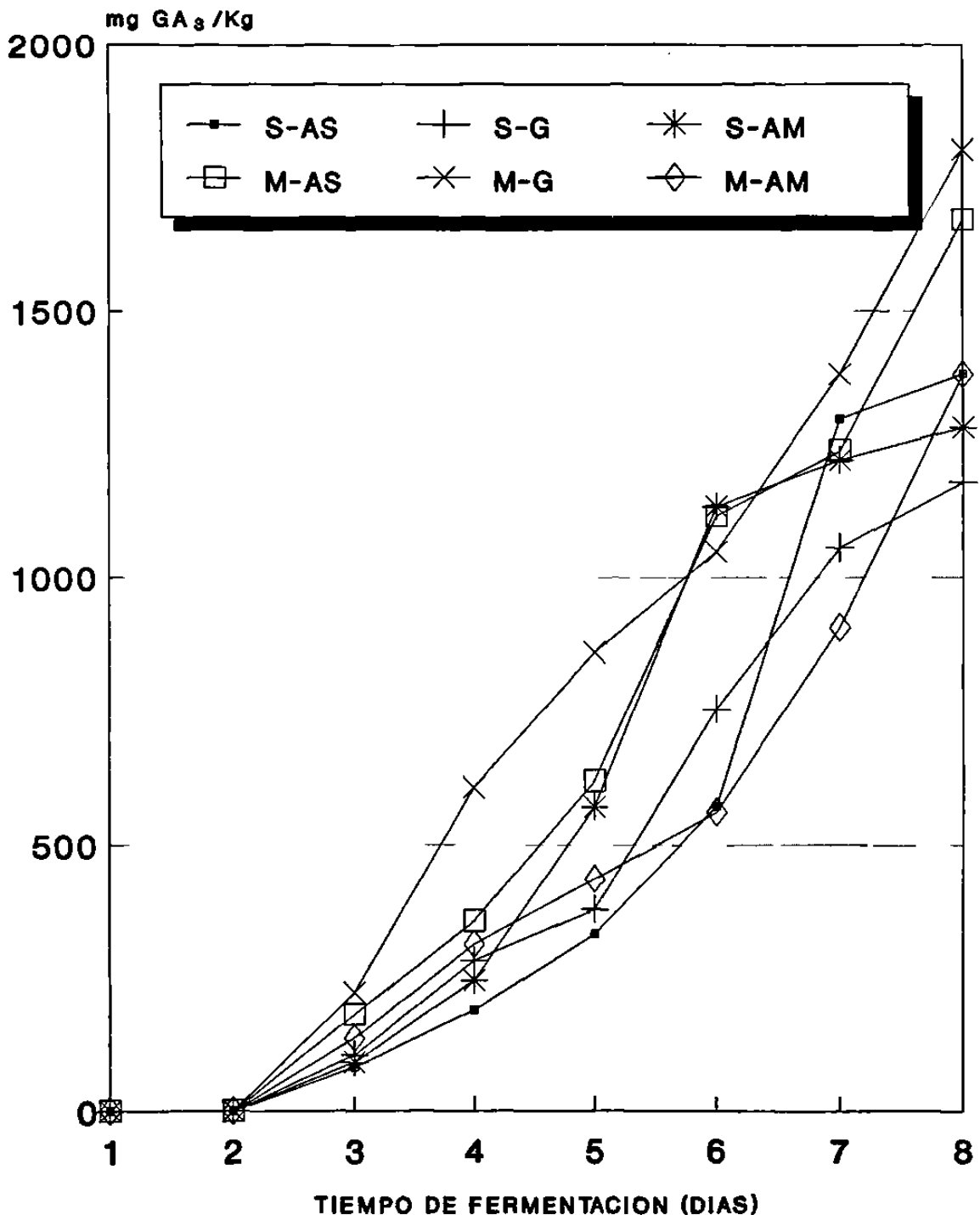


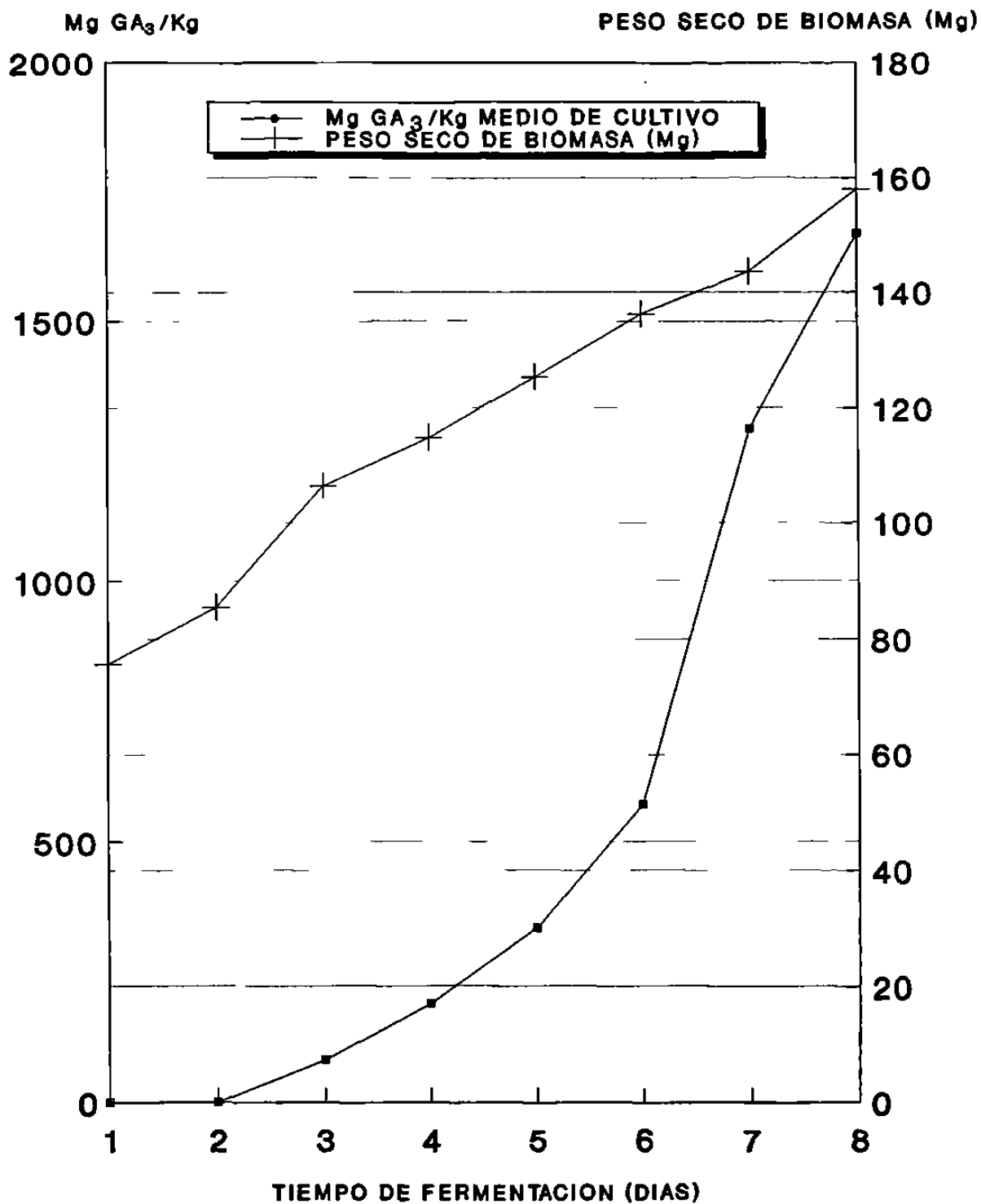
FIGURA 20. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de GA<sub>3</sub> por *G. fujikuroi* en medios de cultivo con salvado



**FIGURA 21. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de GA<sub>3</sub> por G. fujikuroi en medio de cultivo con masilla**



**FIGURA 22. Comparación del rendimiento de GA<sub>3</sub> producido por G. fujikuroi en los seis medios de fermentación utilizados**



**FIGURA 23. Relación entre la producción de biomasa y GA<sub>3</sub> por G. fujikuroi en medio de salvado - almidón soluble**

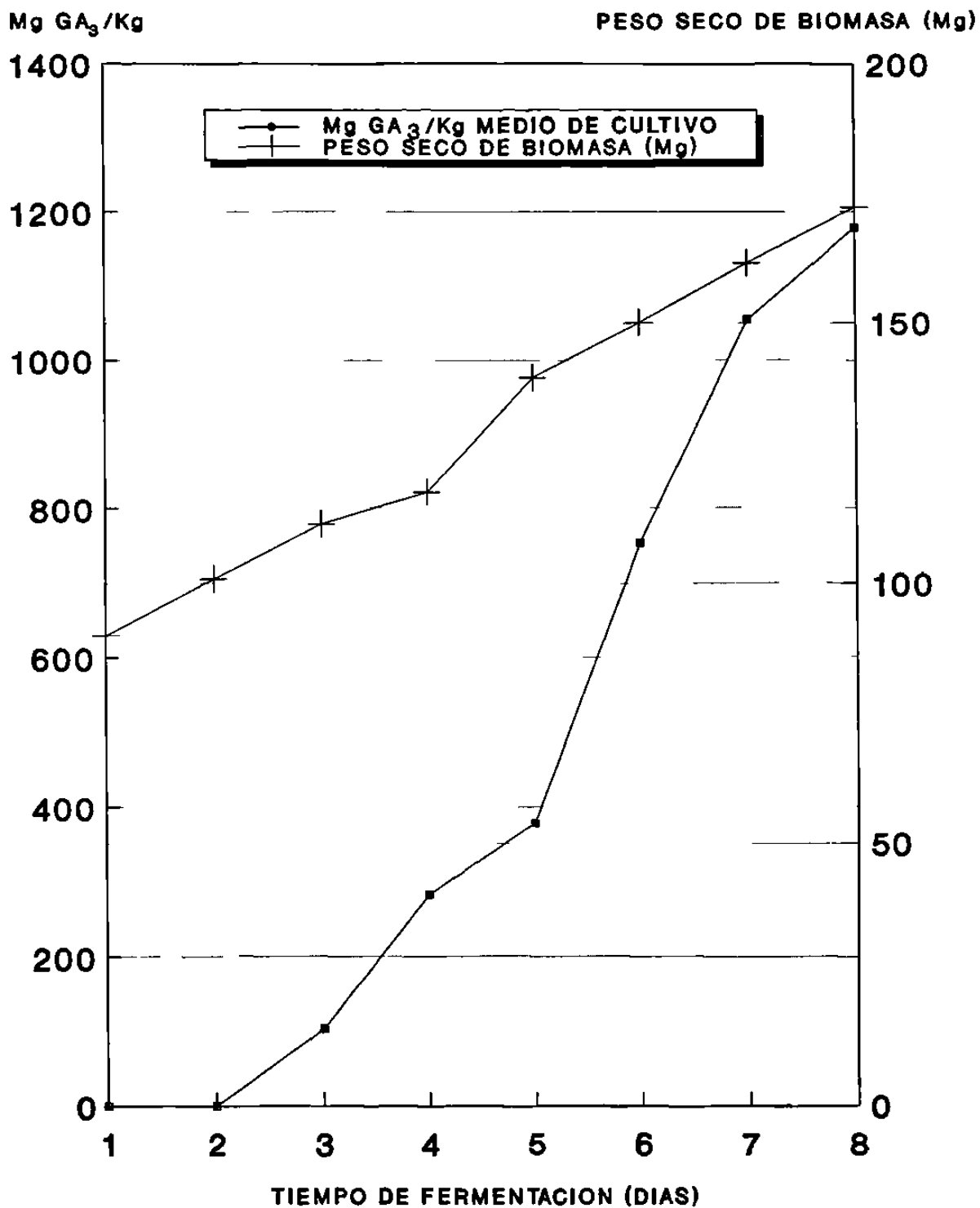


FIGURA 24. Relación entre la producción de biomasa y GA<sub>3</sub> por G. fujikuroi en medio de salvado - glucosa

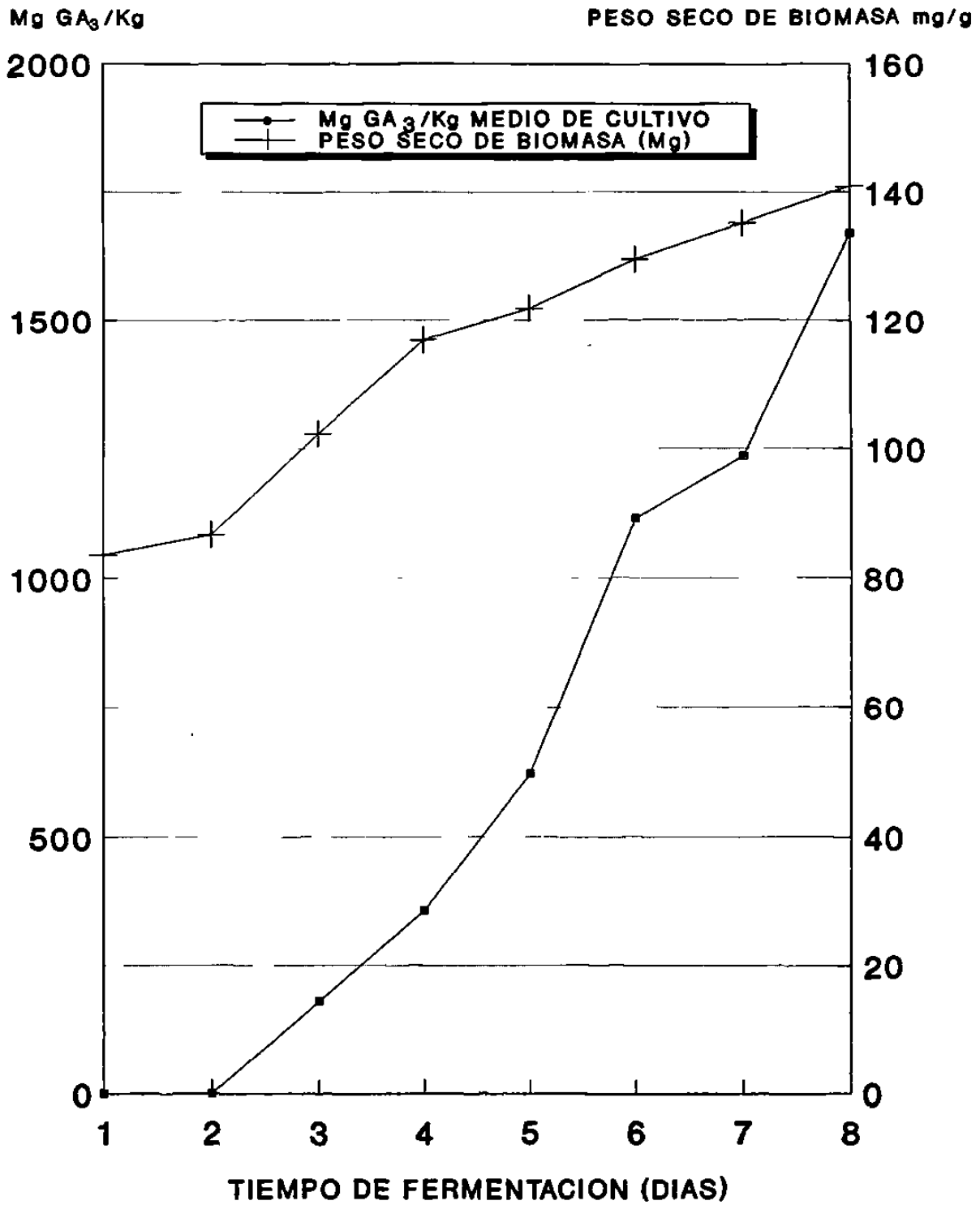
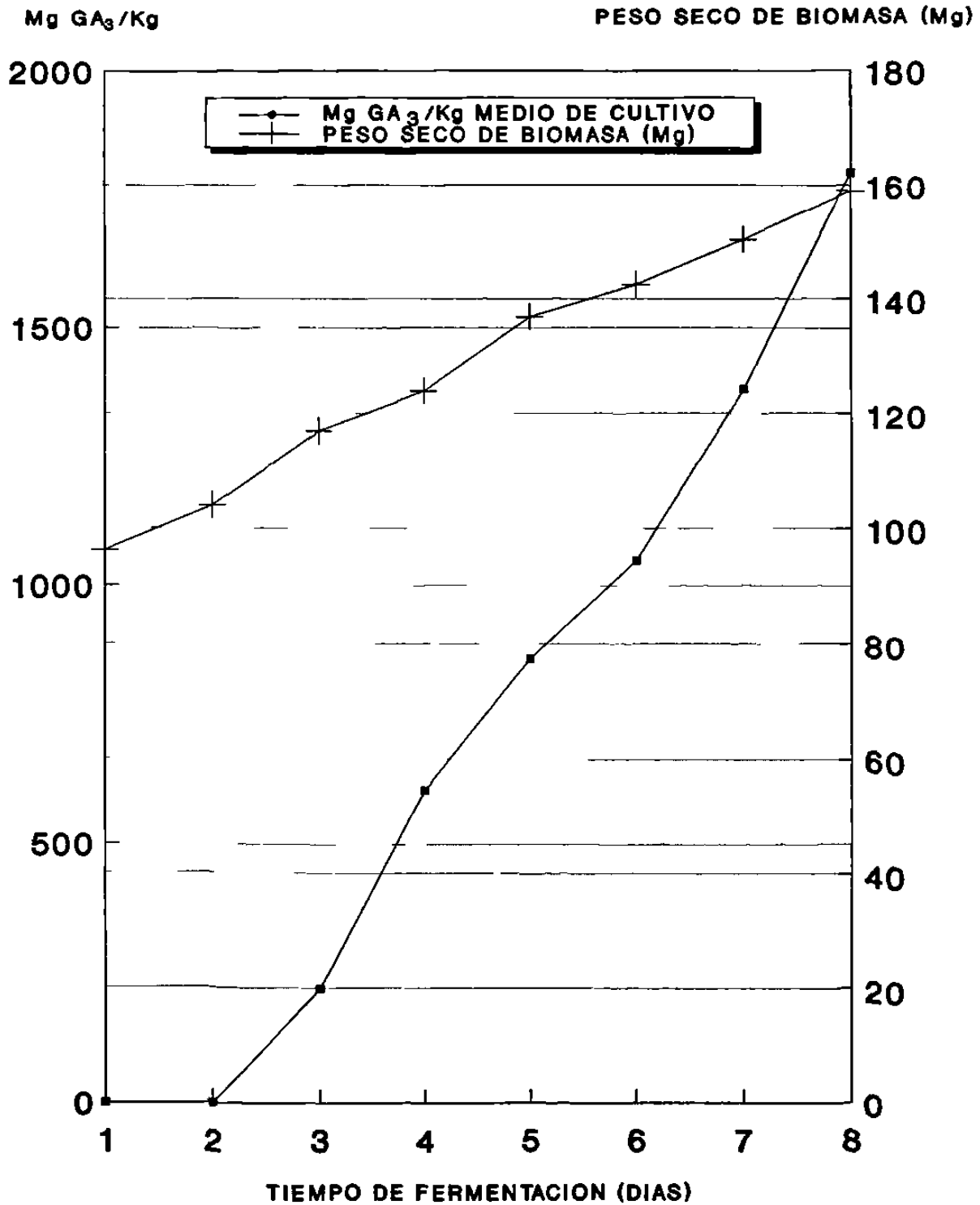


FIGURA 25. Relación entre la producción de biomasa y GA<sub>3</sub> por G. fujikuroi en medio de masilla - almidón soluble



**FIGURA 26. Relación entre la producción de biomasa y GA<sub>3</sub> por G. fujikuroi en medio de masilla - glucosa**



