

03072

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FALLA DE ORIGEN  
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Colegio de Ciencias y Humanidades

Facultad de Química

"Establecimiento de un proceso de fermentación sumergida  
para la producción de ácido giberélico a nivel laboratorio y su  
escalamiento a planta piloto"

Tesis que para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

Presenta:

Martín Patiño Vera

1995



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Sinodales:

Presidente: **Dr Enrique Galindo Fentanes**  
Secretario: **Dr. Armando Claudio Cahue López**  
Vocal: **Dr. Alberto Tecante Coronel**  
Suplente: **Dr. Adalberto Noyola Robles**  
Suplente: **Dr. Eduardo Rafael Gutiérrez López**

## Cómite tutorial:

Dr. Armando C. Cahue López  
Dr. Enrique Galindo Fentanes  
Dr. Sergio Sánchez Esquivel

---

Esta tesis se realizó bajo el concepto de riesgo compartido (clave CONACYT:IRT/QU/NAL/83/2067) gracias al apoyo del CONACyT, en los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial.

La tesis se la dedico al apoyo y amor más grande de mi vida, mi esposa: P. Columba Jiménez Durán.

A mis hijos Martín Alejandro y Arcli de Jesús por haberme prestado un poco del tiempo que les correspondía.

Agradezco al Dr. Enrique Galindo por sus valiosos consejos y su contagiante entusiasmo.

Gracias a mis amigos y compadres Carlos Roberto Gutiérrez y Marisol Córdova por su valiosa y desinteresada ayuda.

Le doy las más sinceras gracias a la Dra. Amelia Farres por su guía y apoyo constante.

Gracias al Dr. Cahuc por el apoyo que recibí durante toda mi estancia en los LANFI.

Gracias al creador por permitirme ver un poquito de su grandeza.

## Indice

1.0 RESUMEN .....	5
2.0 NOMENCLATURA .....	7
2.1 Abreviaturas.....	9
3.0 INTRODUCCIÓN .....	10
4.0 ANTECEDENTES .....	26
5.0 OBJETIVOS .....	34
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
6.1 Cepa.....	35
6.2 Medios de cultivo.....	35
6.3 Fermentadores .....	35
6.4 Técnicas analíticas .....	41
6.4.1 Biomasa .....	41
6.4.2 Ácido giberélico .....	41
6.4.3 Azúcares reductores .....	42
6.4.4 Amonio libre .....	42
6.5 Preparación del medio de cultivo.....	42
6.6 Preparación del inóculo .....	43
6.7 Muestreo y análisis.....	44
6.8 Parámetros de fermentación .....	44
7.0 Resultados y Discusión .....	52
7.1 Experimentos en matraces.....	52
7.2 Fermentación lote-alimentada con medio completo, lote A .....	57
7.3 Fermentación por lote con azúcar inicial de 60 g/L, lote B .....	62
7.4 Fermentaciones lote-alimentadas con solución azucarada .....	64
7.4.1 Lote C.....	64
7.4.2 Lote D .....	66
7.4.3 Lote E.....	69
7.5 Escalamiento, lotes F y G .....	73
7.6 Lote H .....	79
7.6 Fermentaciones con posible precursor lotes I y J .....	81
8.0 CONCLUSIONES .....	86
9.0 RECOMENDACIONES.....	87
Bibliografía.....	87
Anexo.....	94

## 1.0 RESÚMEN

Con el fin de establecer un proceso de producción de ácido giberélico ( $GA_3$ ) por fermentación sumergida, se realizaron estudios a nivel matraz en los que se determinaron las constantes cinéticas de crecimiento, de acuerdo con el modelo de Monod. Se utilizó la cepa de colección ATCC-16A de *Gibberella fujikuroi*, a nivel matraz. La constante de saturación ( $K_s$ ) obtenida fue de 60 g/l, la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de  $7.533 \cdot 10^{-3}$  ( $h^{-1}$ ) y un coeficiente de mantenimiento ( $m$ ) de 0.026 g de azúcar/(g biomasa\*h). Las constantes se determinaron para un medio complejo con harina de soya, sales y sacarosa. En estos experimentos se logró una concentración máxima de 305 mg de  $GA_3$ /l.

En la planta piloto se comenzó con el estudio de una fermentación tipo lote-alimentada, con medio completo, en jarras de 14 litros. Se logró una concentración máxima de 585 mg/l de  $GA_3$ , que representa una productividad de 2.25 mg/(l\*h).

Para aumentar la productividad y principalmente la concentración de  $GA_3$ , se evaluó el efecto de adicionar sacarosa al fermentador en la etapa de producción. Alimentado sacarosa a bajas concentraciones, se obtuvo un incremento en la productividad del 280 % con respecto al proceso por lote (4.72 vs. 1.7 mg de  $GA_3$ /(l\*h)). Con la adición de sacarosa, durante las primeras 120 horas de fermentación, manteniendo una concentración mayor o igual a 30 g/l se logró la máxima concentración de  $GA_3$  (804 mg/l) en 12.7 días de proceso, empleando la cepa ATCC-16A de *G. fujikuroi*.

En paralelo, se analizó el efecto de la potencia volúmica en la producción de  $GA_3$ . Para el cálculo se emplearon ecuaciones empíricas reportadas en la literatura. Se encontró una relación lineal entre la potencia volúmica y el título de  $GA_3$  en el intervalo de 1.5 a 6.5  $kW/m^3$  y concentraciones de 360 a 804 mg/l de  $GA_3$ . Basados en este resultado, se eligió como criterio de escalamiento mantener la potencia volúmica constante y se llevó a cabo un experimento exitoso de 16 a 150 l.

---

Finalmente, en una fermentación por lote con una cepa de *G. fujikuroi* previamente mutada y seleccionada (cepa M-92), se aumentó la productividad de 1.7 a 2.8 mg de GA<sub>3</sub>/(l·h). Con la ventaja de que se emplearon condiciones de agitación menos severas que las empleadas en el mejor lote alimentado: 0.74 contra 6.42 kW/m<sup>3</sup>. En este experimento se empleó un antiespumante a base de aceite de soya que posiblemente favoreció la producción de GA<sub>3</sub>.

## 2.0 NOMENCLATURA

- $d_i$ : Diámetro de impulsor [=] m  
 $D_T$ : Diámetro de tanque [=] m  
 $e$ : Espesor del disco de la turbina [=] m  
 $F_a$ : Flujo de aire [=]  $m^3/s$   
 $F_c$ : Factor de corrección [=] adimensional  
 $Fr$ : Número de Froude [=] adimensional  
 $g$ : Constante de aceleración de la gravedad [=]  $m/s^2$   
 $K_s$ : Constante de saturación [=] g/l  
 $m$ : Coeficiente de mantenimiento [=] g sustrato/[g biomasa \* h]  
 $N$ : Velocidad de agitación [=] m/s  
 $N_a$ : Número de aireación [=] adimensional  
 $N_i$ : Número de impulsores.  
 $N_p$ : Número de potencia [=] adimensional  
 $N_{Re}$ : Número de Reynolds [=] adimensional  
 $P$ : Presión [=] Pa  
 $P_0$ : Potencia sin aireación [=] W  
 $P_G$ : Potencia con aireación [=] W  
 $P_T$ : Potencia total suministrada al fermentador [=] W  
 $P/V$ : Potencia volumétrica disipada en el fermentador [=]  $kW/m^3$   
 $S_0$ : Concentración inicial de sustrato [=] g/l  
 $t$ : Tiempo [=] s  
 $T$ : Temperatura [=] °C  
 $V$ : Volumen de líquido [=]  $m^3$   
 $\nu$ : Viscosidad [=]  $Pa \cdot s$   
 $V_s$ : Velocidad superficial del aire [=] m/s  
 $X$ : Concentración de biomasa [=] g/l  
 $X_0$ : Concentración inicial de biomasa [=] g/l  
 $Y_{ap}$ : Rendimiento aparente [=] adimensional  
 $Y_E$ : Rendimiento de consumo de sustrato para proveer energía [=] adimensional  
 $Y_{EG}$ : Rendimiento de consumo de sustrato para crecimiento [=] adimensional  
 $\mu$ : Velocidad específica de crecimiento [=]  $s^{-1}$



$\mu_{\max}$ : Velocidad específica de crecimiento máxima [=] s<sup>-1</sup>

$\rho$ : Densidad [=] kg/m<sup>3</sup>

## 2.1 Abreviaturas

ADP: Adenosin-5'-difosfato

AMV: Ácido mevalónico

ATP: Adenosin-5'-trifosfato

CFP: Copalilpirofosfato

DMAFP: Dimetilalilpirofosfato

FPP: Farnesilpirofosfato

GGPF: Geranilgeranilpirofosfato

GPF: Geranilpirofosfato

GA<sub>3</sub>: Ácido giberélico

IPF: Isopentilpirofosfato

### 3.0 INTRODUCCIÓN

Las giberelinas son una de las cinco clases de reguladores de crecimiento vegetal, que se conocen actualmente. Fueron descubiertas en forma accidental por el Dr. Kurosawa en 1926 cuando investigaba una enfermedad del arroz llamada "Bakanae", que causa un crecimiento del doble de lo normal. Esta característica resultó estar asociada con una infección fúngica. El hongo, patógeno del arroz, aislado y cultivado en el laboratorio produce una sustancia estable que causa la elongación de plantas sanas (Kurosawa, 1926).

En 1926 Kurosawa demostró que el microorganismo causante de la enfermedad del arroz es un hongo filamentoso denominado *Gibberella fujikuroi* (Sawada, 1912).

Yabuta *et al* (1934) extrajeron y cristalizaron una sustancia pura del filtrado del caldo de cultivo, fermentado por el hongo filamentoso causante de la enfermedad del arroz. Para 1941 los mismos autores reportan las propiedades químicas y biológicas de las giberelinas A y B (Kumar y Lonsane, 1989).

El trabajo del Dr. Kurosawa permaneció desconocido fuera de Japón hasta 1955 (Christie y Nichols, 1989), cuando las cepas del hongo fueron enviadas a occidente. Kumar y Lonsane (1989) reportan que la ICI comenzó a trabajar con giberelinas a partir de 1950 en Inglaterra.

El hongo patógeno denominado *Gibberella fujikuroi* es capaz de producir compuestos que, hoy se sabe, forman parte del equipo regulador del desarrollo de las plantas superiores. Estos compuestos se reconocen con el nombre general de giberelinas, por haber sido inicialmente detectados en los metabolitos producidos por *Gibberella*. A partir de la primera giberelina descubierta en 1938, se ha identificado una gran variedad de compuestos del mismo tipo que se denominan trivialmente GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>,... y así sucesivamente hasta rebasar la GA<sub>50</sub> (figura 3.1).

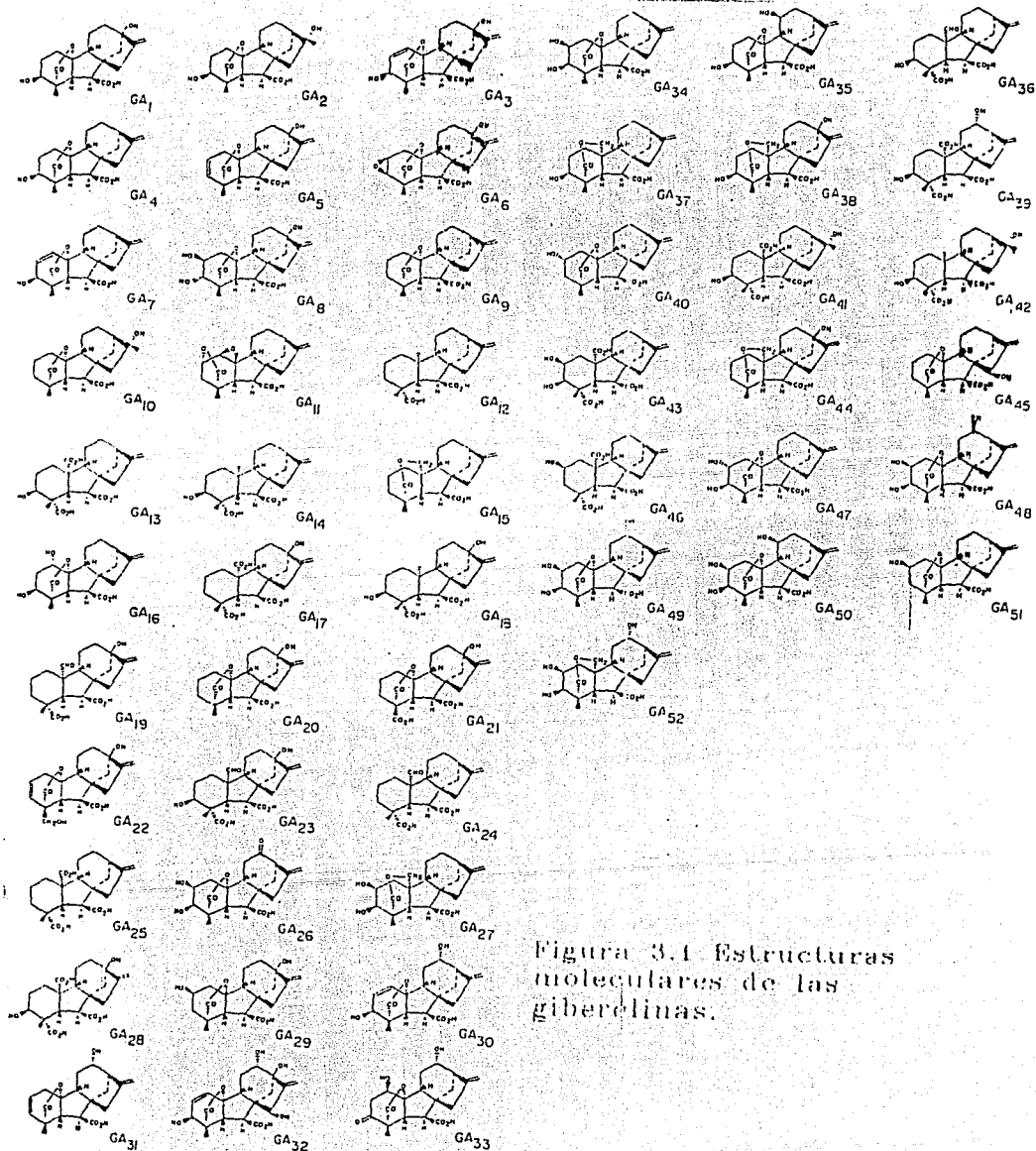


Figura 3.1 Estructuras moleculares de las giberelinas.

Es posible que las giberelinas o compuestos relacionados sean también producidas por bacterias (Jefferys, 1970). De las giberelinas conocidas, cuatro (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>) han sido aisladas de las plantas superiores y de hongos filamentosos (Cross *et al.*, 1968; Brukner y Blechschmidt, 1991). De estas cuatro giberelinas, la GA<sub>3</sub> es la que ha recibido mayor atención, debido a sus propiedades y la disponibilidad que facilita su comercialización. Sin embargo, a medida que ha aumentado la disponibilidad de las GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>, se han descubierto cualidades que las hacen comercialmente atractivas.

#### NOMENCLATURA DE ORGANISMOS Y CEPAS PRODUCTORAS DE GIBERELINAS

Existió considerable confusión en la nomenclatura de los microorganismos productores de giberelinas. A continuación se presenta una lista de los nombres utilizados por varios autores (Jefferys, 1970):

Nombre	Autor
<i>Fusarium heterosporum</i>	Nees
<i>Fusarium moniliforme</i>	Sheldon
<i>Fusarium oxysporum</i>	Schlechtendal
<i>Gibberella fujikuroi</i>	(Sawada) Wollenweber
<i>Gibberella moniliformis</i>	Wineland

En una breve revisión, Borrow *et al* (1955) consideran que *F. moniliforme* (Sheldon), debe ser considerada como el estado imperfecto de *G. fujikuroi* (Sawada) y que *F. heterosporum*, empleado por Yabuta *et al* (1934), fue probablemente incorrecto.

## MÉTODOS DE ENSAYO

Las técnicas de análisis inicialmente empleadas en los estudios de giberelinas, fueron bioensayos basados en el efecto sobre la elongación de los tejidos de plantas sanas. Estas técnicas tenían altos niveles de especificidad y sensibilidad pero no eran adecuados para estudios de fermentación. Con el propósito de realizar un control rutinario se desarrollaron métodos colorimétricos, aunque tienen la desventaja de requerir la eliminación de muchas sustancias que interfieren en el ensayo. Actualmente los métodos espectrofotométricos (UV) o fluorescentes son probablemente los mejores para propósitos de control, mientras que para determinar la pureza, los métodos de cromatografía gas-líquido o capa fina son los recomendados. Varias de las técnicas utilizadas en estudios sobre giberelinas se listan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Técnicas de cuantificación de GA<sub>3</sub>.

Métodos IR
Métodos UV
Conversión a ácido giberelénico (medido a 25.4 m $\mu$ n)
Métodos fluorescentes
Ácido sulfúrico frío sobre extractos en solvente
Métodos de cromatografía de gases, como ésteres de metilo Como ésteres de metilo y trimetilsilil
Cromatografía de papel KMnO rociado
Cromatografía de capa fina/UV fluorescente
Ácido sulfúrico/metanol
Ácido sulfúrico/etanol

Fuente: Jefferys, 1970

## PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL GA<sub>3</sub>

El ácido giberélico es un sólido cristalino blanco, soluble en agua hasta los 5 g/l. Es muy soluble en solventes orgánicos como etanol, metanol, acetato de etilo, acetato de butilo y acetona. Es estable como cristal seco e inestable en solución acuosa. La vida media en solución acuosa es de 14 días a 21 °C y 2 horas a 50 °C. En solución acuosa tiene un pH de 3-4 (Palmer, 1971).

## BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS

Los precursores de las giberelinas se originan en la biosíntesis de diterpenos, a partir de la condensación de unidades de acetato, vía acetyl coenzima A, hasta mevalonato. La vía biosintética de mevalonato a ent-Kaureno fue demostrada por Evans y Hanson (1972) y por Schechter y West (1969), ver figura 3.2. En los primeros pasos de la secuencia se activa el ácido mevalónico (AMV) a AMV-PF, por AMV-quinasas. Para esto se requiere de ATP y Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> (Hill y Rogers, 1974). Es el GGPF el precursor de todos los diterpenos y fue establecido como un intermediario en la biosíntesis del ent-Kaureno por Oster y West (1968). Así, la GGPF-sintetasa cataliza la condensación del IPF con DMAPP, GPF o FPF para dar GGPF como único producto. La ciclización del GGPF a ent-Kaureno procede en dos pasos (Schechter y West, 1969). En el primer paso, el GGPF es convertido a un intermediario bicíclico. En el segundo paso se sintetiza el CPF, siendo estimuladas estas reacciones por iones metálicos bivalentes, destacando el Mg<sup>2+</sup>. Los pasos entre el ent-Kaureno y el ácido ent-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico son probablemente catalizadas por una mezcla funcional de oxigenasas (Hedden *et al*, 1978).

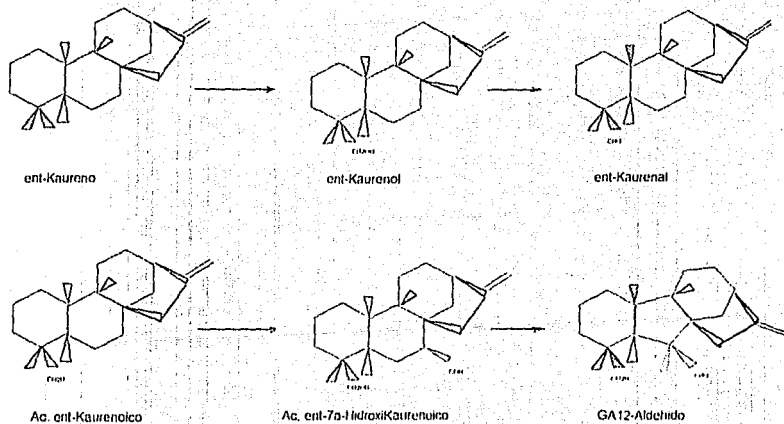
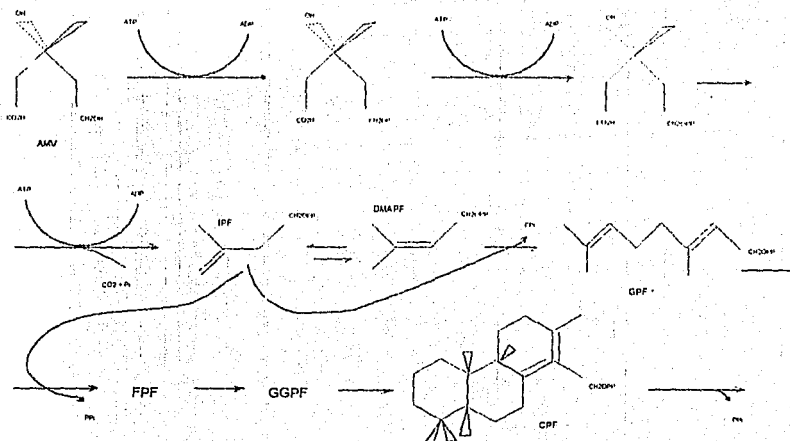


Figura 3.2 Biosíntesis del GA12-aldehído en hongos filamentosos, en camino a la biosíntesis de giberelinas



Geissman *et al.* (1966) demostraron que el ácido (-)Kaur-16-en-19-oic es convertido en ácido gibérelico o GA<sub>3</sub>.

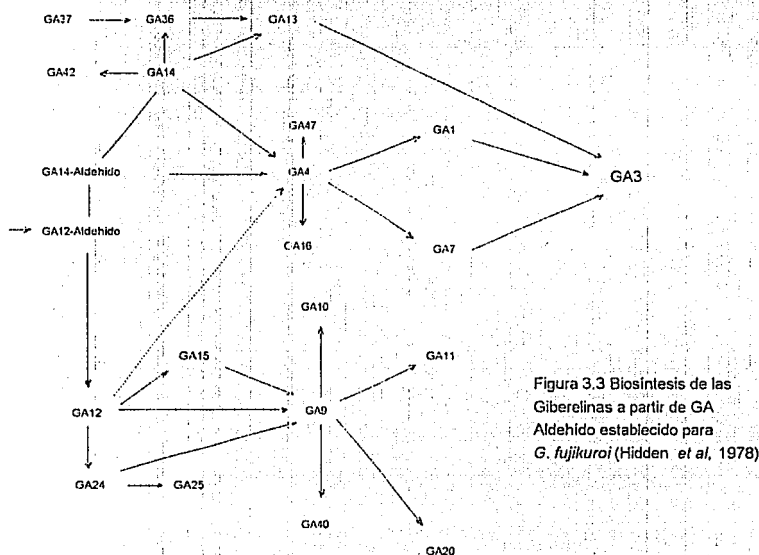


Figura 3.3 Biosíntesis de las Giberelinas a partir de GA Aldehído establecido para *G. fujikuroi* (Hidden *et al.*, 1978)

La figura 3.3 muestra los pasos biosintéticos del GA<sub>12</sub>-aldehído que se han establecido para *G. fujikuroi* (Hidden *et al.*, 1978).

En fermentaciones alimentadas, llevadas a cabo con cepas mutantes, mostraron que la GA<sub>7</sub> es convertida en un 71 % a GA<sub>3</sub> y la GA<sub>4</sub> en un 79 %, con un 2 % de una mezcla de GA<sub>1</sub>, GA<sub>16</sub> y GA<sub>7</sub>. Solo el 32 % de la GA<sub>14</sub> fue metabolizada a GA<sub>3</sub> y dio trazas de GA<sub>1</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>13</sub>, GA<sub>16</sub>, GA<sub>32</sub>, y GA<sub>42</sub>. La GA<sub>14</sub>-aldehído fue rápidamente metabolizada a GA<sub>14</sub>. La GA<sub>12</sub>-aldehído y la GA<sub>14</sub> no se acumulan en el hongo filamentoso (Bearder *et al.*, 1975). Previamente, Cross *et al.* (1968) habían demostrado que la GA<sub>12</sub>-aldehído era convertida en un 15.4 % a GA<sub>3</sub>.

Los estudios básicos en cepas mutantes de *F. moniliforme* (Phinney y Spector, 1967) sugieren que, de un grupo de precursores, surgen tres líneas separadas. Una produce GA<sub>9</sub> y GA<sub>10</sub>; la segunda lleva a GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>

(que por hidroxilaciones subsecuentes forman las GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>). La tercera línea forma las otras giberelinas. En trabajos posteriores (Spector y Phinney, 1968) identifican dos genes que controlan los diferentes pasos en la biosíntesis. Un gen (g<sub>1</sub>) controla la producción de todas las giberelinas y el segundo (g<sub>2</sub>), controla la producción de las giberelinas GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> solamente.

Los procesos convencionales de mutación han sido empleados para mejorar la producción de giberelinas en cepas productoras. Las cepas mutantes hiperproductoras de giberelinas consumen más glucosa y producen más ácido acético, cítrico, glucónico y metanol que las cepas madres (Imshenetsky y Ulyanova, 1962).

Erokhina y Sokolova (1966) demostraron que las mutantes pueden ser obtenidas de organismos miceliales no esporulantes.

Geissman *et al.* (1966) y Verbiscar *et al.* (1967) sugieren que en la secuencia de los pasos biosintéticos de las giberelinas, hay altos niveles de oxidación. Extrapolando esta tesis, existen bases bioquímicas que nos indican que la eficiencia en la transferencia de oxígeno, en el sistema de fermentación, es un factor muy importante en la producción comercial del ácido giberélico.

#### OTROS COMPUESTOS PRODUCIDOS POR *G. fujikuroi*

Se ha identificado una gran variedad de compuestos producidos durante el proceso de fermentación de *G. fujikuroi*. La tabla 3.2 lista la gran variedad de ácidos producidos por *G. fujikuroi*, (Jefferys, 1970). La tabla 3.3 muestra los diferentes aminoácidos detectados en el micelio de organismos productores de giberelinas. Dado su contenido de aminoácidos se ha considerado interesante el uso del micelio para alimentación animal.

Tabla 3.2 Ácidos orgánicos detectados en organismos productores de giberelinas

Ácido acético  
 Ácido behénico  
 Ácido cerótico  
 Ácido cítrico  
 Ácido fújico  
 Ácido fumarico  
 Ácido 5-Hidroxiimetilfuran-2-carboxílico  
 Ácido 5-Hidroxiometil-2-furoico  
 Ácido fusárico  
 Ácido dehidrofusárico  
 Ácido Glucónico  
 Ácido -Cetoglutarico  
 Ácido málico  
 Ácido malónico  
 Ácido orselénico  
 Ácido ptálico  
 Ácido pirúvico  
 Ácido succínico  
 Ácido tetracosánico

Referencia: Jefferys, 1970

Tabla 3.3 Aminoácidos detectados en organismos productores de giberelinas

Alanina  
 Ácido -aminobutírico  
 Ácido aspártico  
 Glicina  
 Leucina  
 Lisina  
 Fenilalanina  
 Serina  
 Triptófano  
 Tirosina  
 Valina

Referencia: Jefferys, 1970

Una de las características particulares de las fermentaciones con *G. fujikuroi* es la presencia de colorantes que van desde el amarillo pálido, hasta el rojo vino. La presencia de estos colorantes se debe a la producción de metabolitos llamados bikaverinas (Ereuer y Arsenault, 1973). Estos poliquétidos y las giberelinas son formados a partir de un mismo intermediario metabólico, la acetil-CoA. Los dos tipos de compuestos

aparecen independientemente en la fermentación después de la etapa de crecimiento acelerado (Eu'Lock *et al.* 1974).

## IMPORTANCIA DE LAS GIBERELINAS

Las giberelinas estimulan el crecimiento de las plantas superiores y, entre otros efectos, inducen la producción de amilasa, promueven el rompimiento del letargo de la germinación de las semillas y yemas, así como la floración bajo condiciones no propicias, en plantas normalmente consideradas muy jóvenes para la producción de flores y el desarrollo de frutos. Las giberelinas también controlan la expresión sexual de algunas plantas, manteniendo las líneas paternas en la producción de semillas híbridas (Christie y Nichol, 1989), con lo que resultan muy útiles para los productores de semillas.

En la industria cervecera, el tiempo de malteo es reducido cerca de dos días, gracias a la inducción de producción de enzimas hidrolíticas que desdoblan los almidones antes de su conversión en azúcares solubles (Christie y Nichols, 1989). Para este propósito el GA<sub>3</sub> es adicionado al agua de proceso en concentraciones que van desde los 2.5 a los 500 µg/kg de cebada (Martin, 1983).

Solo cerca de la tercera parte de las giberelinas que existen en la naturaleza son fisiológicamente activas en plantas. La giberelina más recurrente y activa en las plantas superiores es el GA<sub>3</sub> (Phinney, 1983). Uno de los atributos del GA<sub>3</sub> es acortar el periodo de desarrollo de las plantas bienales. Por lo tanto, las cosechas de semillas de lechuga y caña de azúcar pueden ser obtenidas en un año en lugar de dos. El efecto en las plantas con fruto es mejorar su aspecto, haciéndolo más atractivo. El GA<sub>3</sub> se emplea con éxito en uva, jitomate, pepino, cereza, manzana, limón, naranja, pera y ruibarbo. Además, mejora las cosechas de alcachofa, apio, lechuga, espinaca de invierno y tiene efecto positivo en flores y semillas de frijol, maíz, trigo, arroz y alfalfa.

En los frutos que crecen en racimo aumenta el número de frutos y disminuye la cantidad de hoja (Jefferys, 1970).

Todo lo anterior indica la importancia que tienen las giberelinas en la agricultura y horticultura.

## MÉTODOS DE PRODUCCIÓN

Aunque se pueden extraer de tejidos de plantas superiores, la producción a gran escala se lleva a cabo por fermentación sumergida, empleando *G. fujikuroi*. La giberelina de un uso mayor, y por ende la más importante, es el ácido giberélico o GA<sub>3</sub>. En 1980 la producción mundial de GA<sub>3</sub> para uso agrícola se estimó entre las 12 y 15 toneladas de una producción total de 20 toneladas (Martin, 1983).

En una revisión bibliográfica reciente se encontró que las tendencias para producir GA<sub>3</sub> son:

- a) Fermentación sólida (Prema *et al*, 1988; González *et al*, 1994).
- b) Fermentación sólida lote-alimentada (Kumar y Lonsane, 1987)
- c) Fermentación con micelio inmovilizado (Kahlon y Malhotra, 1986; Lu 1995)
- d) Fermentación extractiva (Hollmann *et al*, 1995)

En fermentaciones sólidas a escala industrial realizadas en la India se reportan rendimientos máximos de 1.2 g de GA<sub>3</sub>/kg de sustrato sólido, en 7-8 días de proceso. Este rendimiento puede aumentar hasta en un 18 % empleando fermentación sólida lote-alimentada. Por otra parte en patentes recientes se reportan rendimientos de hasta 8 g de GA<sub>3</sub>/kg de arroz, después de 10-17 días de fermentación (Bruckner and Blechschmidt, 1991).

La fermentación extractiva parece una buena opción para evitar la descomposición del GA<sub>3</sub> en sustancias indeseables, además de reportar rendimientos de 2.2 g/l de GA<sub>3</sub> en 9.6 días. En este tipo de proceso el caldo de fermentación se filtra y al filtrado se le extrae el GA<sub>3</sub> con un solvente orgánico, recirculando la fase acuosa para continuar su fermentación. Sin embargo, este tipo de proceso se encuentra a nivel laboratorio y planta piloto.

La producción industrial de GA<sub>3</sub> sigue siendo principalmente por fermentación sumergida con cepas mutantes hiperproductoras, en fermentaciones lote-alimentadas, con las que se logran rendimientos de hasta 5 g/l de GA<sub>3</sub> o más (Bu Lock, 1982).

Los resultados de las pruebas en animales indican que el micelio de *G. fujikuroi* tiene muy poca toxicidad en mamíferos (Jefferys, 1970), por lo tanto podría ser usado como un suplemento de alimentación animal.

Durante los setentas (y probablemente todavía; Bruckner y Blechschmidt, 1991) las compañías más importantes en términos de producción de GA<sub>3</sub> eran:

- 1.- En los Estados Unidos: Abbott Laboratories, al norte de Chicago, Il. y Merck and Company Inc., Rahway, NJ.
- 2.- En Inglaterra: ICI Ltd., Manchester.
- 3.- En Italia: Pierrel, S. p. A., Milano.
- 4.- En Japón: Kyowa Hakke Kogyo Company, Tokio y Takeda Chemical Industries, Osaka.

## EL ÁCIDO GIBERÉLICO EN MÉXICO

En la República Mexicana, los reguladores del crecimiento vegetal se han venido utilizando desde hace varios años. Su uso principal ha sido para la mejora de cultivos. La figura 3.4 esquematiza la distribución del consumo de ácido giberélico importado en México. Como se observa, su principal uso es como agroquímico.

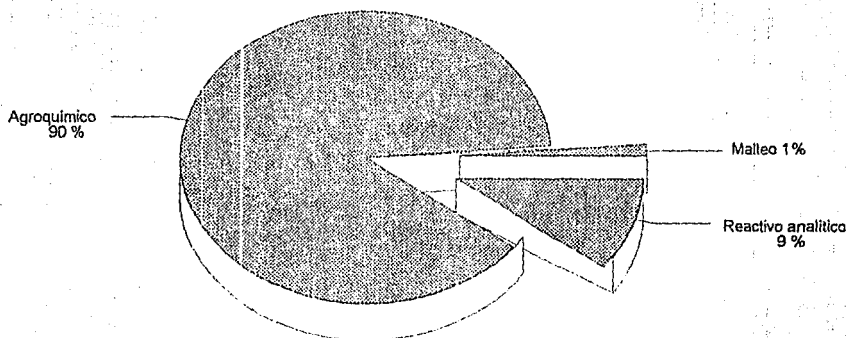


Figura 3.4 Usos del ácido giberélico (fuente: Patiño *et al.*, 1989).

Las importaciones de  $GA_3$  provienen principalmente de Inglaterra (ICI) y Estados Unidos (ABBOTT Y PFIZER), pero se tienen informes de que también se importa de China, Japón y Corea (Cahue, 1987; comunicación personal).

Las industrias que consumen ácido giberélico en México como agroquímico, son muchas y diversas pero la mayor demanda se encuentra en empresas no registradas, llamadas intermediarias (figura 3.5).

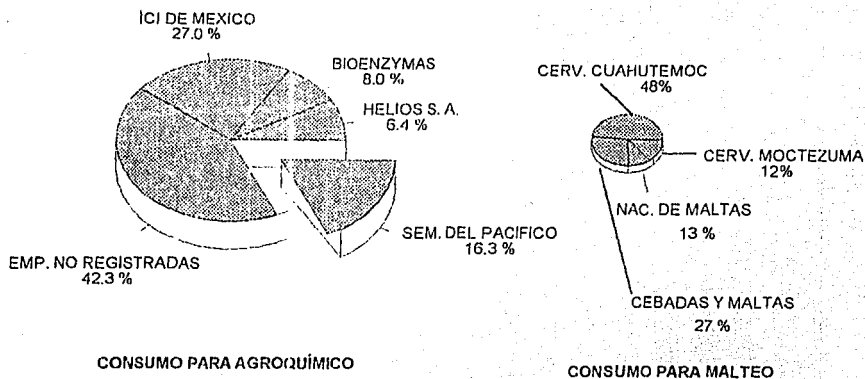


Figura 3.5 Distribución del consumo de  $GA_3$  en México, fuente Patiño *et al*, 1989.

El futuro del consumo del  $GA_3$  es muy promisorio por su amplio espectro de uso. En la figura 3.6 se presenta la tendencia a la alta del consumo del producto. En la misma figura se presenta la comparación entre el valor económico y la cantidad en kgs. importada cada año de  $GA_3$ . Aunque las dos tendencias son a la alza, la gráfica de importaciones en peso presenta tres picos muy pronunciados, debido probablemente a la diferencia en precios del  $GA_3$  en ciertos periodos (figura 3.7). Ello se puede deber a que el  $GA_3$  es un producto muy viejo en el mercado y por la competencia de nuevos países productores.



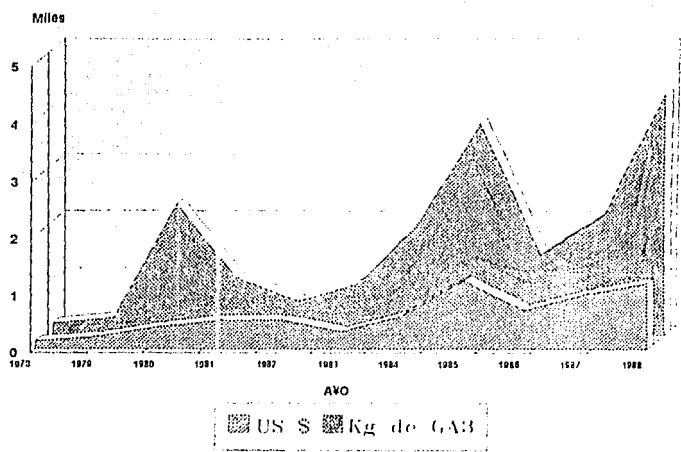


Figura 3.6 Importaciones de ácido giberélico (fuente: Patiño *et al* 1989)

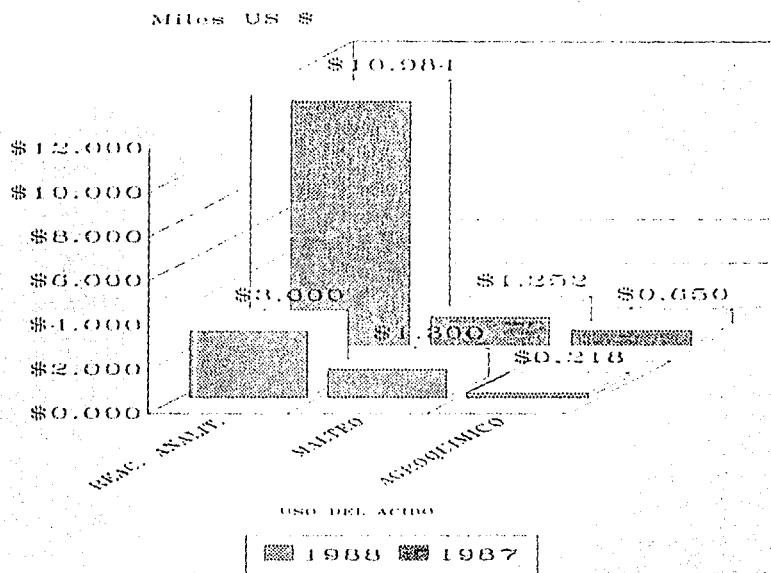


Figura 3.7 Precios del ácido giberélico, importación directa (fuente: Patiño *et al*, 1989).

Uno de los principales usos del  $GA_3$  es el mejoramiento de los frutos de uva de mesa para exportación. La tendencia de las exportaciones hasta 1988 era a la alza. Sin embargo, actualmente tendríamos que considerar el efecto del Tratado de Libre Comercio con los vecinos del norte, porque la exportación del fruto de uva se podría incrementar considerablemente. Esto se refuerza con la competencia que representa el Tratado de Libre Comercio con Chile, pues muchas empresas vitivinícolas importarán una gran cantidad de uva para fermentar, con lo que miles de hectáreas de uva se podrían destinar a la siembra de uva de mesa.

Por otra parte, el consumo de menor envergadura del  $GA_3$  es en el proceso de malteo, para la producción de cerveza. Aunque actualmente es un consumo relativamente pequeño, esta industria está creciendo vigorosamente, crecimiento que puede estimular considerablemente el consumo de  $GA_3$ .

#### 4.0 ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, el método de producción convencional de las giberelinas, es la fermentación en cultivo sumergido o fermentación líquida. A continuación se presenta una descripción del proceso de fermentación propuesto por Borrow *et al* (1964a) y revisado por Jefferys (1970).

La fase lag, o de adaptación del inóculo a las condiciones de fermentación, se presenta sólo en medios de cultivo que contienen altas concentraciones de azúcar inicial (~30 g/100 ml). Después se presenta una fase llamada "balanceada", caracterizada por una proliferación o reproducción acelerada, en presencia de todos los nutrientes, con tasas casi constantes de consumo de azúcar, nitrógeno, fosfato y magnesio. El incremento de peso seco es exponencial. La morfología de las hifas permanece esencialmente constante al igual que su composición, en términos de sus contenidos de grasa, carbohidratos, ADN, ARN y polioles.

Borrow *et al* (1964a) demostraron que la producción del GA<sub>3</sub> se acelera, cuando el nitrógeno inicial ha sido casi consumido por *G. fujikuroi* y la fermentación continúa en la presencia de suficientes fuentes de energía. También se determinó que la cantidad total de GA<sub>3</sub> producido es directamente proporcional a la concentración inicial de nitrógeno.

La cepa empleada por Borrow *et al* (1961) cesa su crecimiento exponencial (medido por peso seco) en función de la tasa de agitación del fermentador y por ende de la disponibilidad del oxígeno disuelto. Es probable que las curvas de crecimiento puedan ser usadas en la medición integral de la eficiencia de transferencia de masa de un fermentador (Jefferys, 1970).

Cuando el nitrógeno es totalmente consumido, el crecimiento o proliferación exponencial termina, mientras que el peso seco continúa en aumento, debido a la acumulación de vacuolas de grasa. Esta acumulación de grasa se realiza en presencia de azúcares reductores y se le conoce como fase de almacenamiento. Esta fase se asocia con la producción del GA<sub>3</sub> (Jefferys 1970) y puede ser prolongada mediante la

adición de azúcares, hasta que el contenido de grasa y carbohidratos almacenados alcanza un máximo. Igualmente la producción de  $GA_3$  puede ser prolongada.

Tomando este punto como el término de la fase de almacenamiento, con la alimentación externa de azúcares, la fase de mantenimiento se inicia y continúa hasta que los azúcares se terminan. Entonces, las reservas de grasa son utilizadas. Si la glucosa se acaba antes que el nitrógeno, entonces la producción de  $GA_3$  puede continuar por un periodo dado, dependiendo de las reservas de grasa disponibles. En caso de que se acaben al mismo tiempo, la fase terminal comienza. La fase terminal se caracteriza por el rompimiento de hifas, disminución de peso seco, y la liberación de componentes miceliales al medio de cultivo (Borrow *et al* 1964a).

La tabla 3.4 muestra un resumen de los datos de proceso que se tenían al comenzar el presente estudio de la producción de ácido gibérelico por fermentación sumergida.

Tabla 3.4 Condiciones de fermentación, rendimientos y productividad lodrados co.G. fujáuroi

Tipo de Fermentación	Fuente de Carbono	Fuente de nitrógeno	Parámetros de Fermentación	Rendimiento máximo (mg (IA3/h))	Productividad (mg GA3/(l*h))	Nivel	Referencia
Por lote	Glucosa al 20 %	Nitrato de amonio 2.4 %	Temp.: 25 - 33 °C Aire: 20 (l/min)	544 (601 h)	0.9	-	I.C.I. (1954) (en Rainbow & Rose, 1963)
Por lote	Sacarosa al 4 %		Temp.: 25 °C	210 (431 h)	-	-	Borrow (1955) (en Rainbow & Rose, 1963)
Por lote	Glucosa al 16 %	Nitrato de amonio 0.24 %	Temp.: 26 °C Aire: 20 (l/min)	418 (661 h)	0.75	30 litros	I.C.I., Borrow et al. (1955) (en Rainbow & Rose, 1963)
Por lote	Glucosa al 16 %	Nitrato de amonio 0.24 %	Temp.: 26 °C Aire: 19 (l/min) más un litro de Dioxido de Carbono.	610 (661 h)	0.95	30 litros	Patentado por: I.C.I. (1958)
Alimentada	Glucosa al 8 % alimentando para mantener una conc. de 2 - 4 %.	Nitrato de amonio 0.24 %	Temp.: 26 °C Aire: 10 (l/min) más	1032 (521 h)	1.03	100 litros	Borrow et al. (1958) (en Rainbow & Rose, 1963)
Dos o más Etapas	Etapa de crecimiento: Glucosa al 12 %	Nitrato de amonio 0.48 %	Temp.: 26 °C Aire: 0.5 VVM			100 litros	Patentado por: I.C.I., Borrow et al. (1958) (en Rainbow & Rose, 1963)
	Etapa de producción: Glucosa al 10 %	Nitrato de amonio 0.24 %	Temp.: 26 °C Aire: 0.5 VVM	312 (167 h)	1.08		
Alimentada		Sólidos de cocimiento de maíz.	Temp.: 30 °C	610			Darken et al. (1959)
Dos o más Etapas	Etapa de crecimiento: Glucosa al 10 %	Nitrato de amonio 0.48 %	Temp.: 26 °C Aire: 15 (l/min)	(10) h		30 litros	Patentado por: I.C.I., Borrow et al. (1959) (en Gutcho, 1973)
	Etapa de producción: Glucosa al 20 %	Nitrato de amonio 0.24 %	Temp.: 26 °C Aire: 15 (l/min)	413 (402 h)	1.02	30 litros	
Dos o más etapas	Etapa de crecimiento: Glucosa al 5 %	Nitrato de amonio 0.12 %	Temp.: 26 °C Aire: 2.5 (l/min)	(5) h		5 litros	Patentado por: I.C.I. y Birch et al. (1961) (en Gutcho, 1973)
	Etapa de producción: Glucosa al 10 % más la Adición de 30 g de ac. Mevalónico	Nitrato de amonio 0.18 %	Temp.: 26 °C Aire: 15 (l/min)	175 (125 h)	1.40	30 litros	
Por lote	Glucosa al 20 %	Nitrato de amonio 1 %, más 225 g de Sólidos de cocimiento de maíz.	Temp.: 24 °C RPM: 450 Aire: 20 (l/min)	517 (283 h)	1.00	30 litros	Patentado por: I.C.I. y Callam et al. (1961) (en Gutcho, 1973)
Por lote	Mezcla de: Dextrina 11 % Sacarosa 4 %	Nitrato de amonio 0.35 %	Temp.: 25 °C Aire: 4 (l/min) RPM: 300	420 (162 h)	2.59	30 litros	Patentado por: Abbott Lab. y Bergman et al. (1962) (en Gutcho, 1973)
Continua	Glucosa al 16 %	Nitrato de amonio 2.4 %	Temp.: 29 °C Aire: 5 (l/min)	514 (200 h de ret.)	2.8	20 litros	Holme y Zacharias (1965)
Por lote	Harina de maíz 70 g/l Harina de semilla de algodón 40 g/l	Harina de semilla de algodón Sulfato de amonio 0.7 g/l	Temp.: 27 °C Aire: 8 (l * 3/h) RPM: 1700	1000 (115 h)	8.62	2,8 litros	Patentado por: Pfizer Lab. y Eichhorn et al. (1972) (en Gutcho, 1973)

## EFFECTO DEL MEDIO AMBIENTE EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE GA<sub>3</sub>

### Efecto de la concentración de GA<sub>3</sub>

No es posible medir directamente la inhibición por producto en la tasa de producción de GA<sub>3</sub> en un cultivo por lote (Borrow, *et al* 1964a).

### Efecto de la temperatura

El trabajo de Borrow *et al* (1964b) demostró que la temperatura óptima de crecimiento está en el rango de 29-32 °C, para fermentaciones sumergidas. La temperatura mínima de crecimiento fue de 8 °C y para Stoll (1954) de 3 °C, cesando el crecimiento a 38 °C. Borrow encontró que a 40 °C *G. fujikuroi* no crece.

La temperatura óptima de producción de GA<sub>3</sub> es 29 °C (Jefferys, 1970). Sumiki *et al*, 1966 (en Jefferys, 1970) sugieren que a 32 °C se favorece la producción de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>.

### Efecto del pH

No es común tener datos disponibles de experimentos donde el pH ha sido rígidamente controlado a un valor preestablecido. Por otra parte, la naturaleza de la fuente de nitrógeno es muy importante en la reacción del hongo a los valores de pH. La producción de GA<sub>3</sub> resultó ser independiente del pH en el rango de 3.0 a 3.5, pero la tasa de producción y la productividad (tasa por unidad de nitrógeno adicionado) disminuyó con los cambios de pH, cuando el pH fue controlado fuera de este rango (Borrow *et al*, 1964a).

Stodola *et al* (1955) emplearon un medio con un valor inicial de pH bajo y con una fuerte tendencia a ser más ácido (debido a que utilizaron cloruro

de amonio como fuente de nitrógeno), produciendo  $GA_1$  y  $GA_3$ . Esto fue confirmado por Kuhr *et al* (1961) y por Fuska *et al* (1962), quienes, a valores de pH entre 2 y 3, obtuvieron mezclas de  $GA_1$  y  $GA_3$ . Sumiki *et al* (1966) obtuvieron  $GA_4$  y  $GA_7$  en medios con valores iniciales de pH de 6.8.

### Materias primas

Experimentos en los que la fuente inicial de glucosa fue calculada para proporcionar un rango de 5-30 % del azúcar inicial, al momento de agotar la fuente de nitrógeno, mostraron que, al incrementar la concentración de glucosa, la tasa de producción del  $GA_3$  decrece a una misma concentración celular. Por otra parte, dependiendo de la fuente de nitrógeno se tienen diferencias en productividad del  $GA_3$ , misma que se puede aumentar, elevando la concentración del nitrógeno inicial, hasta llegar a un máximo después del cual decrece. Estos resultados fueron interpretados como un reflejo de las interacciones entre el incremento en la demanda de oxígeno por el organismo y la decreciente eficiencia en la transferencia de oxígeno, debido a una creciente concentración celular. Estos resultados enfatizan la necesidad de contar con medios de cultivo optimizados, de acuerdo a las necesidades de la cepa productora, tomando en cuenta el fermentador particular que se está empleando (Jefferys, 1970).

Muchas fuentes de carbono se han usado en la producción de  $GA_3$ : glucosa, sacarosa y combinaciones de sacarosa con dextrinas (Abbot Laboratories, 1963; en Jefferys 1970). Concentraciones iniciales de glucosa o sacarosa mayores a 20 % no son recomendables (Bruckner and Blechschmidt, 1991). Glicerol (Kitamura *et al*, 1953; Darken *et al*, 1959), glicerol-almidón, glicerol-glucosa y mezclas de glicerol-glucosa-lactosa (Darken *et al*, 1959), con estas últimas materias primas se lograron títulos de 880 mg/l de  $GA_3$ . Shklyar (1965) sustituyó las fuentes de carbón usadas por Darken *et al* por melazas: la concentración de  $GA_3$  disminuyó pero las concentraciones obtenidas fueron económicamente atractivas.

Los trabajos rusos muestran resultados exitosos empleando aceites naturales como fuente de carbono; por ejemplo, aceite de girasol (Eurokhina, 1970; Muromtsev *et al*, 1968). Muromtsev (1968) comparó la producción de  $GA_3$  empleando aceites vegetales en lugar de sacarosa (usando la misma concentración inicial de fuente de carbono, 4 %). El rendimiento se incrementó en 559 % usando aceite de linaza, 435 % con aceite de girasol, 382 % con aceite de oliva, 336 % con aceite de semilla de algodón y 300 % con etil-palmitato, mientras que con ácido esteárico el rendimiento disminuyó un 49 %. En vista de los efectos inhibitorios de altas concentraciones iniciales de glucosa en la productividad, se han desarrollado procesos alimentados con buenos resultados (Borrow *et al*, 1964a; Serzedello y Whitaker, 1960; Bruckner y Blechschmidt 1991). Por otra parte, también se han desarrollado procesos alimentados con harinas vegetales como la harina de soya y la harina de semilla de algodón (Bruckner y Blechschmidt 1991). Estas fuentes naturales de carbohidratos también proporcionan compuestos nitrogenados y pueden afectar suficientemente la capacidad amortiguadora del medio de cultivo como para hacer imposible precisar el efecto de algún componente en particular.

El medio de fermentación original japonés, está basado en el uso de cloruro de amonio. Esto provoca valores de pH muy bajos y junto con el uso de glicerol, se produce  $GA_1$  y  $GA_3$ . Rícicova y Podojil (1960) mostraron que, empleando únicamente sólidos de cocimiento de maíz como fuente de nitrógeno, se produce únicamente  $GA_3$ , pero cuando se sustituye por harina de soya, también se produce  $GA_1$ .

### Elementos traza

Existen pocas publicaciones acerca del efecto de los elementos traza en la fermentación. La mayoría de los autores agregan un exceso de elementos traza. Sin embargo, Krasilnikov *et al* (1963) demostraron que la respuesta a los elementos traza varía de cultivo en cultivo. El zinc fue más estimulante para la producción de  $GA_3$  en cultivos de *G. fujikuroi* cuando



se agrega solo. En combinación con otros elementos, *G. fujikuroi* responde mejor al zinc, molibdeno y cobre.

#### Efecto de la agitación y aireación

La producción de GA<sub>3</sub> requiere de la continua disposición de oxígeno. En algunas etapas de la fermentación, los periodos prolongados de limitación de oxígeno pueden provocar cambios metabólicos, de los que resulta imposible recuperarse para el microorganismo.

Poca información ha sido publicada acerca de la relación directa de la agitación-aireación con la producción de giberelinas. De los trabajos de Borrow *et al* (1964a) y Darken *et al* (1959) se infiere que para lograr altos rendimientos en la producción de giberelinas se requiere de fermentadores con alta eficiencia en la transferencia de oxígeno (Jefferys, 1970).

El proceso de fermentación puede verse afectado por la concentración de bióxido de carbono en el fermentador. Si se adiciona bióxido de carbono al aire alimentado a los fermentadores, la fase lag prácticamente se elimina, incrementándose la tasa de crecimiento. El rendimiento del GA<sub>3</sub> también se incrementa en éstas condiciones (ICI, 1958).

A partir de la revisión anterior, es posible proponer el siguiente resumen de condiciones de fermentación recomendadas:

-Temperatura:

- a) Para crecimiento: 31-32 °C
- b) Para producción: 29 °C

-Aireación y agitación:

Tan altas como sea posible.

-Fuente de nitrógeno:

- a) De preferencia nitrógeno amoniacal.
- b) Harinas vegetales de origen vegetal son adecuadas.

-Fuente de carbono:

- a) La sacarosa es mejor que la glucosa.
- b) Harinas vegetales son un buena alternativa
- c) La velocidad de alimentación debe ser baja.
- d) Los aceites vegetales son excelente alternativa.

-Sales:

- a) Las sales de magnesio, potasio y sulfatos son requeridas.
- b) Los elementos traza son muy importantes pero pueden ser suministrados por las impurezas de las materias primas industriales.

## 5.0 OBJETIVOS.

Definir un procedimiento de cultivo de *G. fujikuroi*, basado en cepas de colección, a un nivel de fermentador de 16 litros.

Obtener concentraciones mayores a 750 mg/l de ácido giberélico, en un máximo de treinta días.

Escalar el proceso de fermentación de producción de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), hasta un fermentador de 150 litros de volumen nominal.

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepa

#### *G. fujikuroi* ATCC 16-A

Mutante de la cepa ATCC 16-A, denominada M-92.

### 6.2 Medios de cultivo

En el presente proyecto se utilizaron los medios de cultivo empleados por Pitel *et al.*, (1970). El medio de producción originalmente contenía 120 g/L de azúcar inicial. Posteriormente se cambió la concentración a 60 g/L, debido a los buenos resultados que se obtuvieron a nivel matraz con esta concentración ( ver la sección 7.1). El azúcar, la harina de soya y los sólidos de cocimiento de maíz utilizados en el proyecto fueron grado industrial.

### 6.3 Fermentadores

La primera parte del estudio se realizó en una batería de fermentadores marca "New Brunswick" (figura 6.3.1), que tiene capacidad para trabajar en serie seis jarras de fermentación (de 14 l cada una) con control de agitación, aireación y temperatura. A fin de minimizar el volumen de agua perdido por efectos de evaporación, se instaló a la salida de los gases una trampa de condensación con retorno de condensados. En este equipo se corrió el lote A que fue un fermentación lote-alimentada con medio completo.

Los lotes D, E, F, I y J se realizaron en un fermentador de 16 litros marca "New Brunswick" (figura 6.3.2) totalmente instrumentado, en el que se siguió la evolución del pH y del oxígeno disuelto controlando la temperatura, agitación y aireación a valores preestablecidos.

La fermentación B se realizó por lote, con una concentración de azúcar inicial de 60 g/L, en una jarra de fermentación de la batería representada en la figura 6.3.3.

La primera fermentación de la serie alimentada con solución azucarada (lote C) se realizó en un fermentador de jarras intercambiables marca "Fermentation Design" (figura 6.3.4), con controles semejantes a los arriba mencionados.

El escalamiento (lote G) así como los lotes, H y K se realizaron en una equipo computarizado marca "New Brunswick" de 150 litros de volumen nominal, esquematizado en la figura 6.3.5.

Todos los fermentadores estaban equipados con turbinas Rushton de diferentes diámetros y cuyas dimensiones y posicionamiento se ilustra en las figuras 6.3.1 y 6.3.4.

Figura 6.3.1 Jarra de la  
batería de fermentación.

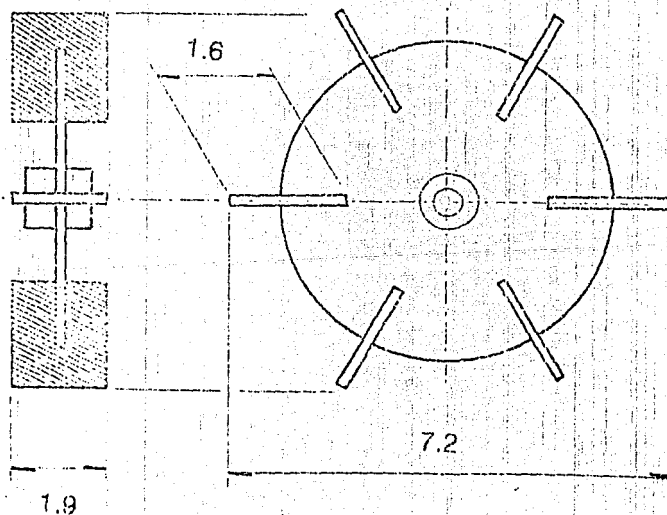
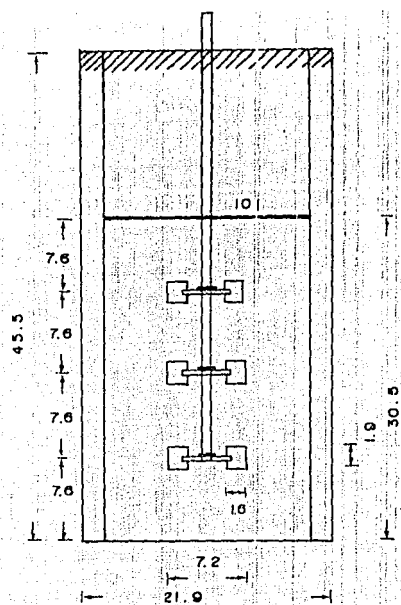
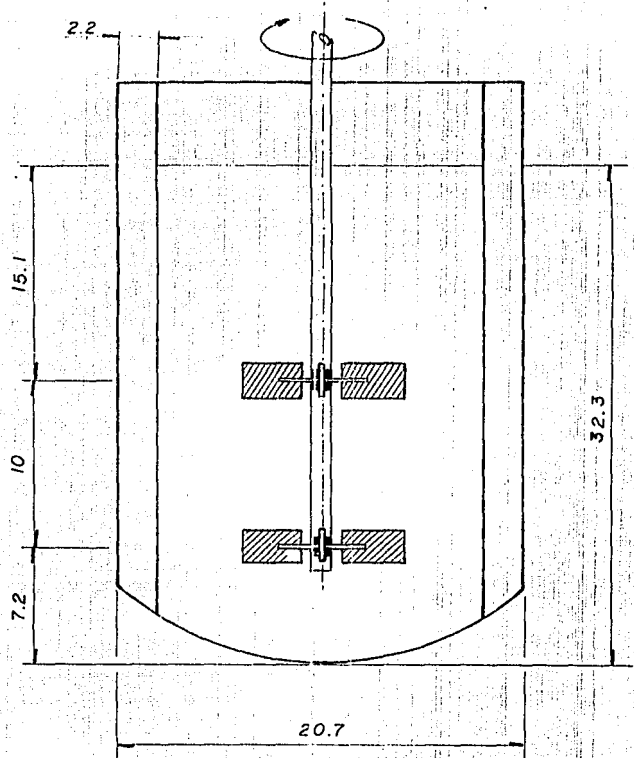


Figura 6.3.2  
 Fermentador de 16 l  
 "New Brunswick"



COTAS EN CM

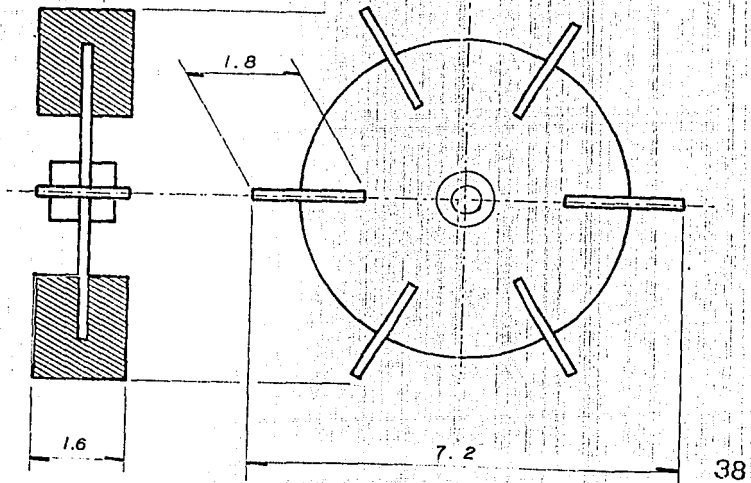
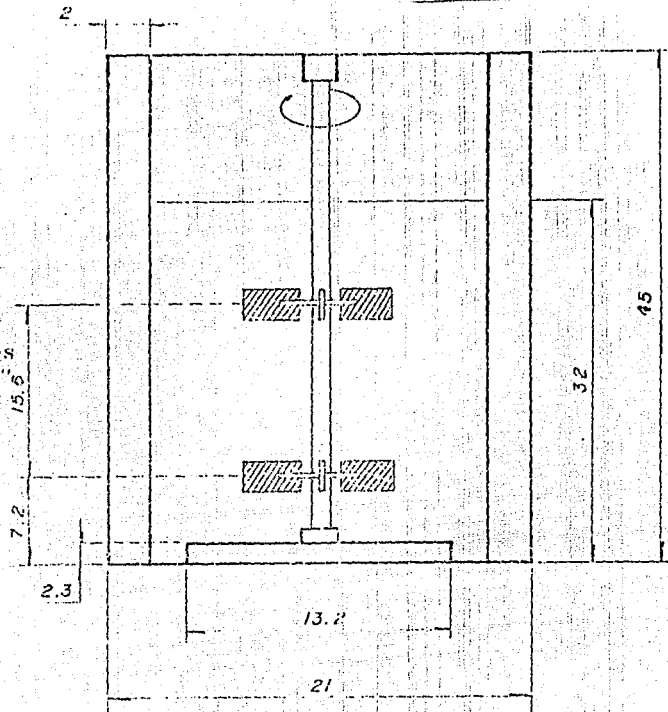


Figura 6.3.3  
 Fermentador de 14 l  
 jarras intercambiables  
 "Fermentation Design"



COTAS EN CM

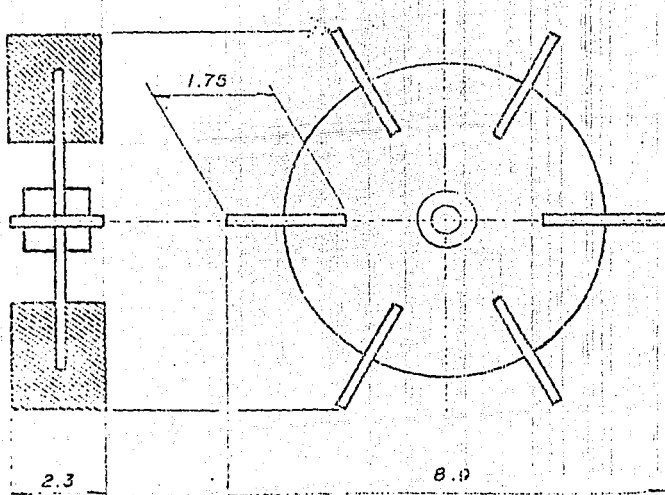
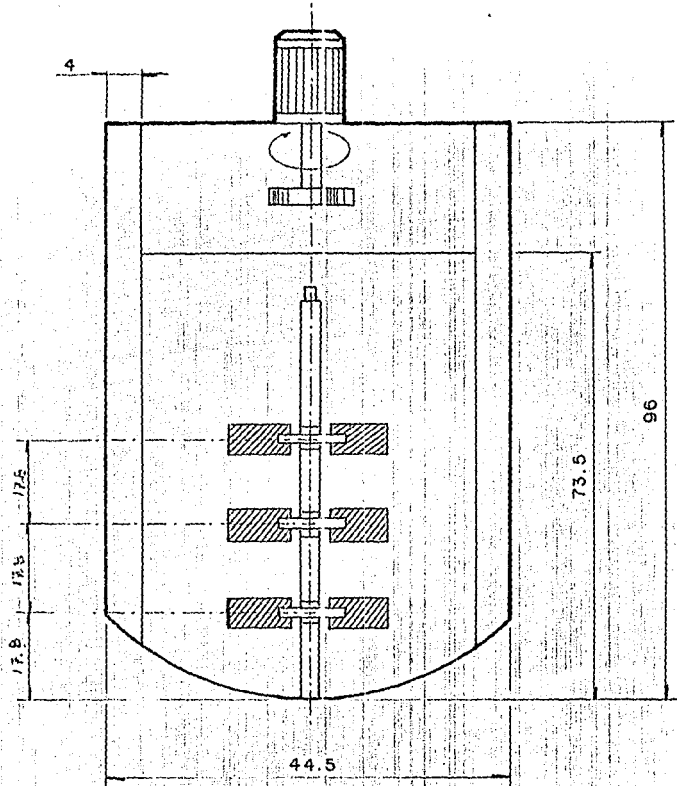
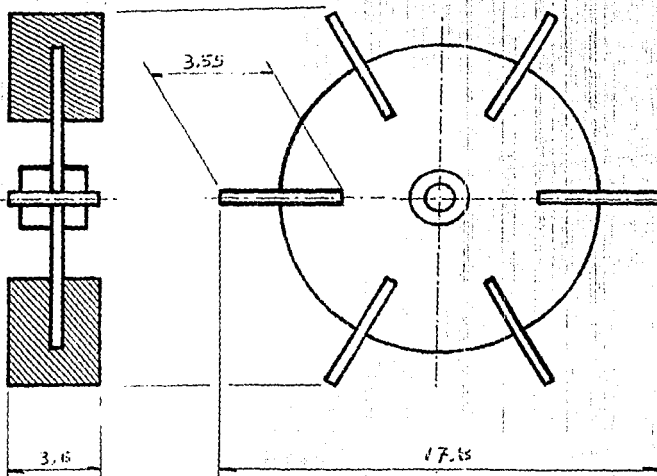




Figura 6.3.4  
 Fermentador de 150 l  
 "New Brunswick"



COTAS EN CM



## 6.4 Técnicas analíticas

### 6.4.1 Biomasa

Se toman 5 ml de la muestra (caldo de fermentación), se centrifugan en recipientes apropiados a 5000 r.p.m. por 15 minutos. El sobrenadante se guarda para los demás análisis, mientras que el sedimento se lava con una solución 1:1 de metanol-agua.

El sedimento resuspendido se filtra en papel filtro Whatman No. 540, previamente llevados a peso constante.

Los filtros con la biomasa son colocados en una estufa a 80 °C durante 3 horas y pesados para determinar el peso seco.

### 6.4.2 Ácido giberélico

La cinética de producción de ácido giberélico durante la fermentación se siguió con la técnica de cromatografía en capa fina modificada (Mac Millan y Suter 1963; García, 1961) y que a continuación se describe:

De los 5 ml de sobrenadante, obtenidos anteriormente, se toman alícuotas de 10 microlitros con una microjeringa y se aplican en placas para cromatografía de capa fina marca "Merck". A la misma placa se aplican tres puntos con concentración conocida de  $GA_3$ .

La placa se coloca en una cámara de cromatografía con una solución de n-butanol:agua:metanol 60:30:10 y se deja que corran las muestras durante un mínimo de 2 horas.

Después de lo anterior se revela la placa aplicando, en forma de aerosol, ácido sulfúrico al 10 % en metanol.

Las placas reveladas se analizan a 640 nm (ultravioleta) en un densitómetro de cromatografía de placa marca "Camag", el cual determina el área fluorescente que produce cada muestra aplicada y que es proporcional a la concentración de  $GA_3$  que contiene la muestra.

#### 6.4.3 Azúcares reductores

A 5 ml de sobrenadante se les determina la concentración de azúcares reductores por la técnica de Fehling reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (1988), adaptada y optimizada para el volumen de muestra del sobrenadante.

#### 6.4.4 Amonio libre

La evolución del amonio libre se mide en 5 ml de sobrenadante, con el método del fenato (Greenberg *et al.*, 1985).

#### 6.5 Preparación del medio de cultivo

Para los experimentos realizados en jarras de vidrio, se pesaron y se disolvieron por separado cada uno de los componentes del medio de cultivo Pitel y se agregó agua de la red general hasta completar los 10 litros. Se ajustó el pH a 5.5 con solución de ácido fosfórico 2 N. La esterilización se realizó en autoclave, a una temperatura de 121 °C durante 45 min.

Para los fermentadores de 16 y 150 litros, el medio de cultivo se preparó disolviendo el azúcar y las sales minerales en agua. Posteriormente se

adicionaba la harina de soya y se procedía a esterilizar *in situ*, con una agitación de 300 r.p.m. a 121 °C durante 40 min.

En los últimos experimentos se consideró lo reportado por Jeffreys (1970), en donde se menciona que los ácidos fuertes o minerales transforman al GA<sub>3</sub> en giberelinas indeseables, así que se decidió probar el ácido acético, que es un ácido orgánico débil, como ajustador de pH de los medios de cultivo. Se empleó ácido acético al 50% en lugar de ácido fosfórico al 10%.

## 6.6 Preparación del inóculo.

El inóculo por micelio se prepara de la siguiente forma:

- a) Se suspenden las esporas y micelio de un tubo, previamente sembrado con la cepa de *Gibberella fujikuroi*, con solución isotónica estéril.
- b) Se transfiere la suspensión de la cepa a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, con medio estéril para crecer la semilla.
- c) Se incuba cada matraz Erlenmeyer, según el volumen total de inóculo requerido para cada experimento (2 % del volumen de medio de producción).

Ejemplo de inoculación: al término de las 72 h de incubación se agrega un matraz de inóculo (200 ml) por cada 9.8 l de volumen de medio de producción.

## 6.7 Muestreo y análisis.

El procedimiento de muestreo consistió en tomar muestras de 10 ml en periodos de tiempo, previamente determinados, cuidando conservar la esterilidad del fermentador.

A las muestras de los fermentadores, se les determinó generalmente: concentración de azúcares reductores, amonio libre, peso seco y  $\text{GA}_3$ .

La ausencia de contaminación se estuvo verificando cada 48 horas, tomando muestras de los fermentadores y sembrando en cajas de Petri con un medio completo.

### 6.8 Parámetros de fermentación

Para calcular el número de potencia se empleó la ecuación propuesta por Bujalski (1986) en la que se manifiesta la importancia del espesor de la placa del disco del impulsor (en Cahue, 1987). Dicha ecuación presenta una desviación máxima de +/- 3 % respecto datos experimentales (Cahue, 1987) y se presenta a continuación:

$$N_p = 2.512(c/d_i)^{-0.195} D_i^{0.063}$$

Esta ecuación es válida para el intervalo  $(c/w) \leq 0.25$  y  $(c/d) \leq 0.05$

Después del número de potencia se corrige el flujo de aire según las recomendaciones del fabricante del rotámetro con el que se midió considerando las condiciones de entrada y salida del gas.

A continuación se calcula el No. de Proude y el No. de Aireación. La  $P_0/P_G$  se calcula utilizando la ecuación presentada por Reuss *et al.*, en 1980 que correlaciona la  $P_0/P_G$  con los números de Reynolds, Proude y aireación además de la relación  $(D/d)$ . La comparación de los resultados experimentales con los predichos, por la ecuación, es apreciablemente buena en el caso de viscosidades bajas y moderadas. La ecuación se empleó con éxito en trabajos con *P. chrysogenum* y se escribe:

$$P_G/P_0 = 0.0312 N_{RE}^{0.064} F_1^{-0.156} Na^{-0.38} (D_T/d_i)^{0.8}$$

Con el objeto de despejar la potencia con gas ( $P_G$ ) se calculó la potencia sin aire ( $P_0$ ) empleando la conocida ecuación de Rushton (1950):

$$P_0 = d_i^5 N^3 \rho N_p Ni$$

Por último se calculó la potencia volúmica dividiendo  $P_G$  entre el volumen de operación, en las condiciones de agitación y aireación más severas establecidas en cada corrida de fermentación.

6.8.1 Parámetros de operación de la fermentación lote alimentada con medio completo, **lote A:**

Condiciones durante las primeras 24 horas:	
TEMPERATURA (°C)	30
AIREACIÓN (m <sup>3</sup> /s)	8.33 x 10 <sup>-5</sup>
AGITACIÓN (**r.p.s.)	3.98

Condiciones posteriores:

TEMPERATURA (°C)	30.0
AIREACIÓN (m <sup>3</sup> /s)	2.66 x 10 <sup>-5</sup>
AGITACIÓN (rps)	10.68

Potencia volúmica estimada:  $876 \text{ W/m}^3$

6.8.2 Parámetros de operación del lote B con concentración inicial de azúcar de  $60 \text{ g/L}$ , **lote B**:

Las condiciones iniciales del fermentador durante las primeras 24 horas fueron:

Aireación	$9.16 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	7.50 r.p.s.
Temperatura	$30.0 \text{ }^\circ\text{C}$
Vol. operación	$0.011 \text{ m}^3$

Las condiciones de las horas subsiguientes fueron:

Aireación	$2.90 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	10.66 r.p.s.
Temperatura	$29.0 \text{ }^\circ\text{C}$
Vol. operación	$0.011 \text{ m}^3$

Potencia volúmica estimada:  $800 \text{ W/m}^3$

6.8.3 Condiciones experimentales para el **lote C** (alimentado con solución azucarada):

Se mantuvieron las condiciones siguientes, hasta la aparición de color en el medio de cultivo:

Aireación	$1.67 \times 10^{-4} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	6.67 r.p.s.
Temperatura	$30.0 \text{ }^\circ\text{C}$
Presión	$48.27 \times 10^3 \text{ Pa}$
Vol. operación	$0.010 \text{ m}^3$

Cuando se notó un cambio de coloración (18 horas), se establecieron las siguientes condiciones de operación:

Aireación	$1.67 \times 10^{-1} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	11.67 r.p.s.
Temperatura	29.0 °C
Presión	$48.27 \times 10^3 \text{ Pa}$
Vol. operación	0.10 m <sup>3</sup>

Potencia volúmica estimada: 4800 W/m<sup>3</sup>

Los tiempos de adición de azúcares y la concentración de estos en el fermentador, después de agregar la solución azucarada, se muestran en la tabla siguiente:

Edad del cultivo (horas)	Concentración de azúcar (g/L)
53.5	29.9
66.0	35.5
72.2	54.8
118.3	48.4
259.3	2.9
283.7	0.4



6.8.4 Condiciones de operación para el **lote D** (alimentado con solución azucarada):

Se mantuvieron las siguientes condiciones durante las primeras 20 horas:

Aireación	$1.833 \times 10^{-1} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	8.33 r.p.s.
Temperatura	31.0 °C
Presión	$68.95 \times 10^3 \text{ Pa}$
Vol. operación	0.011 m <sup>3</sup>

De las 20 a las 24 horas únicamente se aumentó la agitación a 11.67 r.p.s..

Después de transcurrido éste tiempo se mantuvieron las condiciones siguientes:

Aireación	$1.833 \times 10^{-1} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	15.25 r.p.s.
Temperatura	29.0 °C
Presión	$68.95 \times 10^3 \text{ Pa}$
Vol. operación	0.011 m <sup>3</sup>

Potencia volúmica estimada: 3290 W/m<sup>3</sup>

A continuación se muestran los tiempos de adición de azúcares y la concentración de estos dentro del fermentador, después de agregar una solución azucarada:

EDAD (h)	CONCENTRACIÓN (g/L)
93	4.9
101	2.7
117	2.3
142	1.6
167	4.3

6.8.5 Condiciones de operación para el **lote E** (alimentado con solución azucarada):

Se mantuvieron las mismas condiciones de operación que en el lote D, a excepción de la presión interna del fermentador, que fue de cero Pa y la segunda agitación que fue de 12.5 r.p.s.

Potencia volúmica estimada 1394 W/m<sup>3</sup>

Los tiempos de adición de azúcares y la concentración de estos en el fermentador, después de agregar una solución azucarada, se presentan abajo:

EDAD (h)	CONCENTRACIÓN (g/L)
70.0	21.7
98.5	6.4
118.5	1.6
147.5	1.2

6.8.6 Condiciones de operación para el **lote F**, volumen nominal 16 l (escalamiento):

Agitación	9.02 r.p.s.
Temperatura	31.0 °C
Aireación	$1.83 \times 10^{-1} \text{ m}^3/\text{s}$
Presión	$68.95 \times 10^3 \text{ Pa}$
Volumen de operación	0.011 m <sup>3</sup>

Potencia volúmica estimada 1686 W/m<sup>3</sup>

6.8.7 Condiciones de operación para el **lote G**, volumen nominal 150 l (escalamiento):

Agitación	4.70 r.p.s.
Temperatura	31.0 °C
Aireación	$1.38 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$
Presión	$68.95 \times 10^3 \text{ PA}$
Vol. de operación	0.105 m <sup>3</sup>

Potencia volúmica estimada: 1678 W/m<sup>3</sup>

6.8.8 Condiciones de operación para el **lote H**, volumen nominal 150 l (alimentado con solución azucarada):

Las condiciones iniciales del fermentador durante las primeras 24 horas fueron:

Aireación	$1 \times 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	5.0 r.p.s.
Temperatura	31.0 °C
Presión	$48.27 \times 10^3 \text{ Pa}$
Vol. operación	0.105 m <sup>3</sup>

Las condiciones de las horas subsecuentes fueron:

Aireación	$x 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$
Agitación	r.p.s.
Temperatura	29.0 °C
Presión relativa	$48.27 \times 10^3 \text{ Pa}$
Vol. operación	0.011 m <sup>3</sup>

Potencia volúmica estimada 2452 W/m<sup>3</sup>

6.8.9 Condiciones de operación para los lotes I y J (adición de posible precursor):

Agitación	5.25 r.p.s.
Temperatura	31 °C
Aireación	$1.67 \times 10^{-1} \text{ m}^3/\text{s}$
Presión	$68.95 \times 10^3 \text{ Pa}$
Volumen de operación:	0.010 m <sup>3</sup>

Potencia volúmica estimada: 554 W/m<sup>3</sup>

Después de las primeras 24 hrs se cambió la temperatura a 29 °C.

## 7.0 Resultados y Discusión

### 7.1 Experimentos en matraces

Los matraces Erlenmeyer de producción se prepararon con 100 ml de medio Pitel 60 (medio de cultivo empleado por Pitel *et al.*, (1970) con 60 g de azúcar inicial como fuente de carbono simple) y se incubaron a 29 °C, a 480 r.p.m. durante 192 horas obteniéndose los siguientes resultados:

No de Matraz (mg./L)	GA <sub>3</sub>
1	166.7
2	153.3
3	167.0
4	167.0
5	193.0
Promedio	169.5
Desv. est.	13.03
% de error	7.69

Después de 14 años de trabajo en la industria de fermentación Fernando Lara (1989, comunicación personal) sugiere un 10 % de error máximo, para medios complejos. Por lo tanto, consideramos éste resultado como el punto de arranque del estudio de fermentación y escalamiento del proceso de producción de ácido giberélico.

Por otra parte, con el objeto de conocer más el proceso de fermentación a estudiar y optimizar, se arrancó una serie experimental a nivel matraz, para determinar las constantes cinéticas de crecimiento. El experimento contó con cuatro niveles de azúcar inicial como fuente de carbono simple en medio de Pitel.

La figura 7.1.1 muestra que hubo un mayor desarrollo de la biomasa (X, medida como peso seco) en el medio de cultivo con 60 g/L de azúcar

inicial. La gráfica de consumo de azúcar (figura 7.1.2) muestra una secuencia acorde con la concentración inicial; es decir, a mayor concentración de azúcar, más tiempo se tomó en consumirla.

Peso seco en g/l

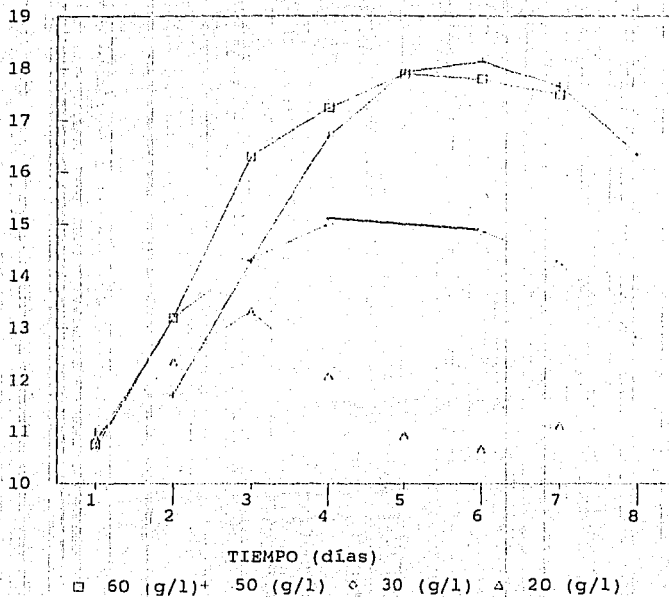


Figura 7.1.1 Cinéticas de crecimiento de *G. fujikuroi* a diferentes concentraciones de azúcar

De los resultados se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), graficando  $\ln(X)$  vs tiempo. Considerando que la cinética de crecimiento y consumo de sustrato se ajusta a la ecuación de Monod (Bu'Lock *et al.*, 1974) se ajustó a esta ecuación mediante el método de búsqueda directa de Rosenbrock propuesto por Cahue (1987).

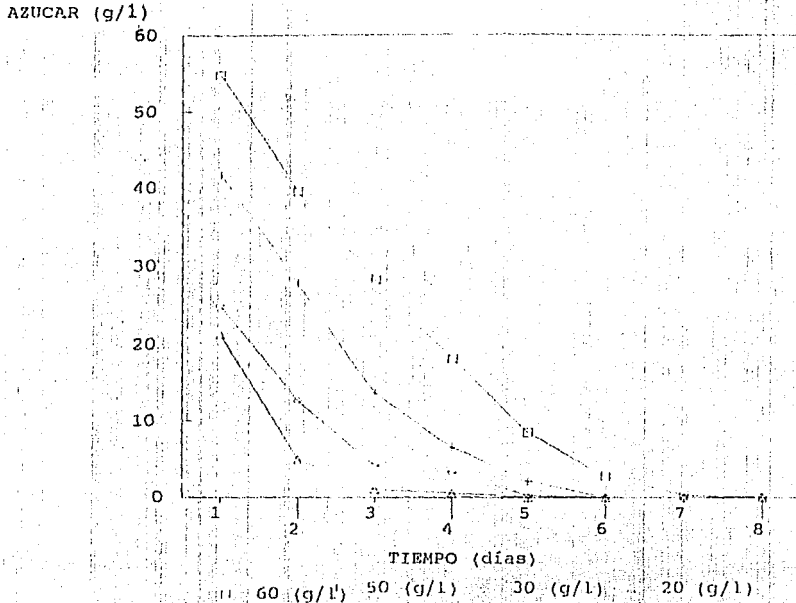


Figura 7.1.2 Cinéticas de consumo de azúcar a diferente concentración inicial

Ecuación general de Monod:  $\mu = \mu_{max} [S / (K_s + S)]$

Valores obtenidos:  $\mu_{max} = 7.533 \cdot 10^{-3} \text{ (h}^{-1}\text{)}$

$$K_s = 60.0 \text{ g/L}$$

La figura 7.1.3 muestra el ajuste encontrado entre los datos experimentales y la curva del método de Rosenbrock.

VEL. ESP. DE CRECIMIENTO (1/h)

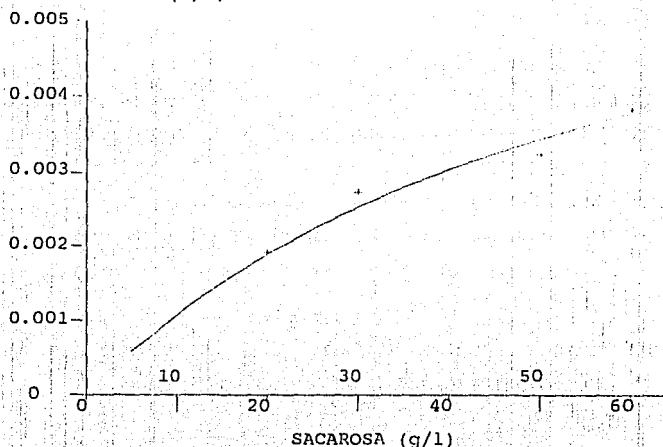


Figura 7.1.3 Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Monod

Valores obtenidos por Bu'Lock *et al.*, (1974):

$$\mu_{max} = 0.18 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = 1 \text{ g/L}$$

Los resultados obtenidos son diferentes a los calculados por Bu'Lock *et al.*, (1974), posiblemente porque el medio Pitel 60 es un medio complejo, con sacarosa, harina de soya y sólidos de cocimiento de maíz, mientras que el medio empleado por Bu'Lock es un medio químicamente definido y de fácil asimilación, con glucosa monohidratada como fuente de carbono y glicina como fuente de nitrógeno.

Siendo el valor de  $K_s$  inversamente proporcional a la afinidad del microorganismo por el sustrato (Pirt, 1975), los resultados muestran que *G. fujikuroi* tiene preferencia por la glucosa sobre la sacarosa, reflejándose en un mejor crecimiento con valores de la velocidad específica de crecimiento máxima mucho mayores.



### Determinación del coeficiente de mantenimiento

Como mencionan Borrow *et al.*, (1964), *G. fujikuroi* puede continuar produciendo GA<sub>3</sub> después de haber agotado la fuente de nitrógeno si cuenta con suficiente fuente de carbono para producción y mantenimiento. Por lo tanto, se consideró importante determinar la tasa de consumo de sustrato para mantenimiento. Según Pirt (1975), el balance para el consumo de la fuente de energía está definido por:

Tasa total de consumo = Tasa de consumo para crecimiento + Tasa de consumo para mantenimiento

$$\text{Esto es: } \mu X / Y_E = \mu X / Y_{EG} + m X$$

$$\text{Reordenando tenemos: } 1/Y_E = 1/Y_{EG} + m/\mu$$

De la última ecuación y con la ayuda de la gráfica de  $1/Y_E$  vs  $1/\mu$  (figura 7.1.4) se obtiene el coeficiente de mantenimiento (0.026 g azúcar/(g de biomasa \* h)). Esto significa que se debe proporcionar un poco más de 0.026 gramos de azúcar por gramo de biomasa por hora si se desea que ese microorganismo cuente con fuente de carbono y energía para seguir produciendo GA<sub>3</sub> y demás compuestos del metabolismo secundario.

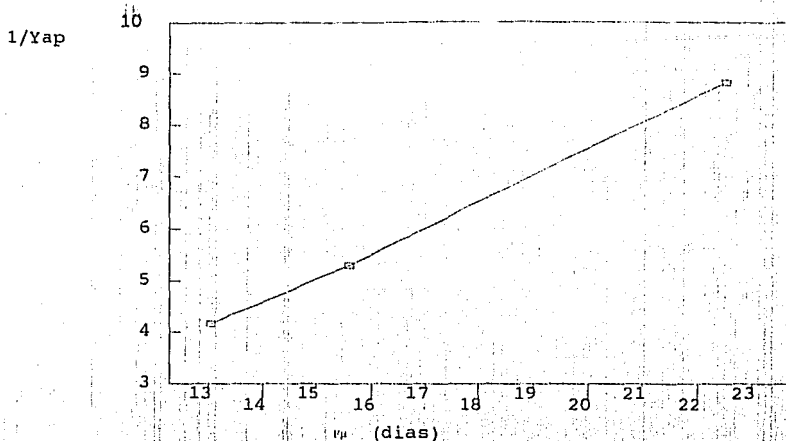


Figura 7.1.4: Gráfica de la regresión para el cálculo del coeficiente de mantenimiento.

## 7.2 Fermentación lote-alimentada con medio completo, lote A

El estudio se realizó por duplicado en jarras de fermentación de 14 litros y se denominó lote A. El medio que se alimentó fue completo, manteniendo la jarra de adición a la misma temperatura que las jarras de fermentación y con agitación suficiente como para mantener una suspensión homogénea. La tasa de alimentación fue variable y suficiente para reponer el volumen de agua perdido por evaporación. Manteniendo un volumen de líquido constante dentro del fermentador, alimentando durante 66 horas de proceso. Posteriormente se adicionó agua estéril para mantener un volumen constante dentro del fermentador.

### Observaciones

Durante las primeras 72 horas se generó una gran cantidad de espuma, la cual se controló mediante la adición manual de antiespumante a base de silicón al 10 %.

Aproximadamente a las 50 horas, la fermentación adquirió una coloración rosada.

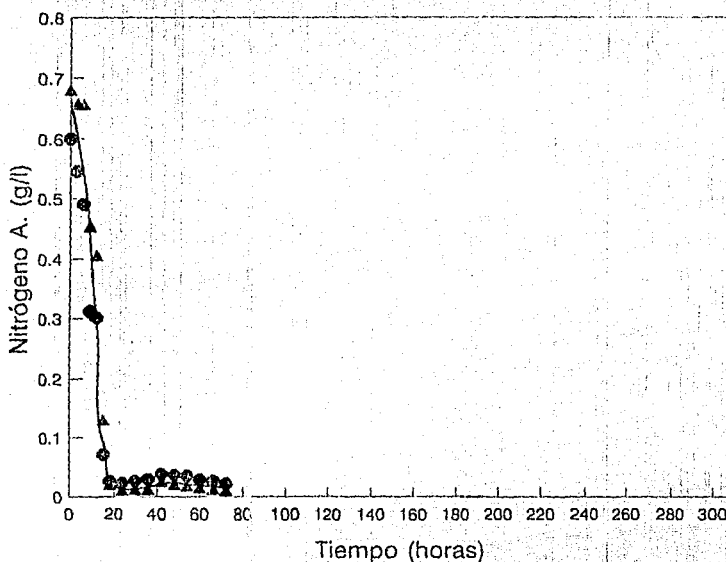


Figura 7.2.1 Cinética de amoníaco, lote "A"; cepa: ATCC-16A; volumen 14 l.

En lo que respecta al amoníaco, la figura 7.2.1 muestra que a las 18 horas de proceso, el amoníaco libre prácticamente se agotó. Durante este periodo de tiempo el amoníaco mantuvo una tendencia de consumo lineal.

Como puede notarse en la figura 7.2.2, el pH disminuye gradualmente desde un valor de 5.5 al inicio de la fermentación hasta llegar a un valor ligeramente inferior a 3.0 y posteriormente tiende a subir hasta llegar a 3.8.

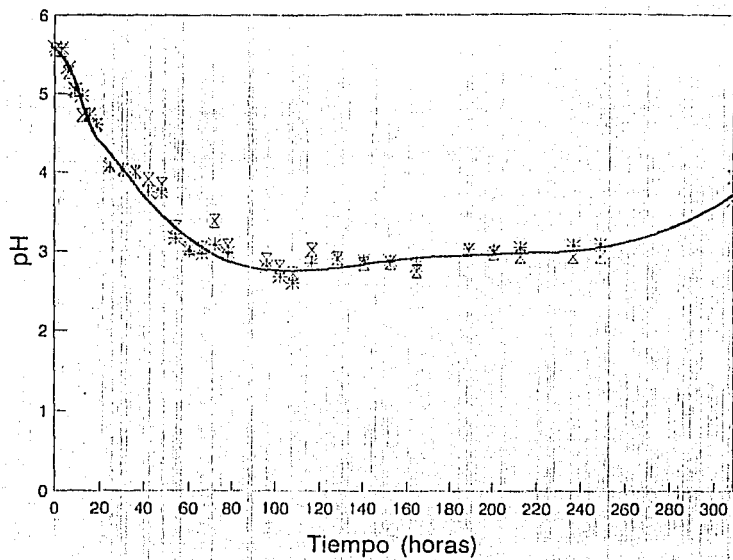


Figura 7.2.2 Cinética de pH, lote "A"; cepa: ATCC-16A; volumen 14 l.

La cinética de consumo de azúcar se ilustra en la figura 7.2.3 En la cuál se observa un consumo con tendencia lineal hasta las 100 horas de fermentación. El azúcar no se agotó en ninguno de los dos fermentadores. La concentración final fue cercana a 15 g/L.

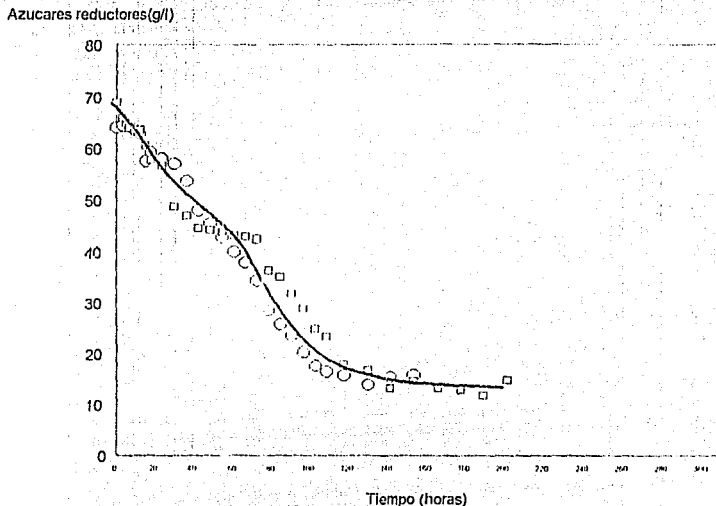


Figura 7.2.3 Cinética de consumo de azúcares reductores, lote A; cepa: ATCC-15A; volumen: 14 l.

Con respecto a la biomasa figura (7.2.4) se observa primero un decremento del peso seco, posiblemente debido a la hidrólisis de las harinas de soya. Posteriormente, se presentó un aumento de tipo exponencial hasta las 50 horas. Posteriormente se observó una desaceleración (a partir de las 54 horas y hasta las 240 horas). Al hacer una regresión lineal en el periodo de crecimiento exponencial, se obtiene una velocidad específica de crecimiento de  $1.2738 \text{ h}^{-1}$

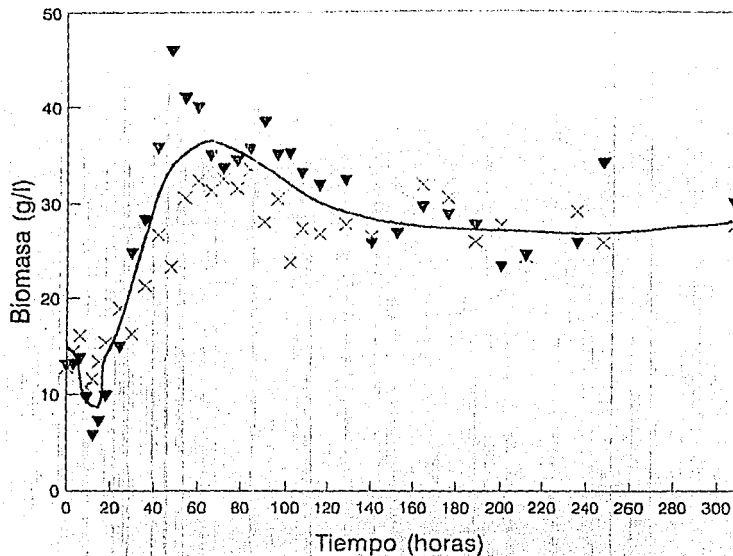


Figura 7.2.4 Cinética de biomasa, lote "A"; cepa: ATCC-16A; volumen 14 l.

El inicio de producción de ácido giberélico fue a las 65 horas aproximadamente (figura 7.2.5). Se observa uno de los máximos (de 450 mg./L de  $GA_3$ ) alrededor de las 150 horas, después del cual disminuye y vuelve a aumentar, tal vez debido a un efecto de degradación. Se logró una concentración máxima de 585 mg. de  $GA_3$ /L ( promedio de los dos fermentadores) y una productividad de 2.25 mg. de  $GA_3$ /(l\*h), que es comparable a la obtenida por Holme y Zacharias (1965) en cultivo continuo.

Aparentemente, no hay correlación entre la producción de  $GA_3$  y la cinética de biomasa

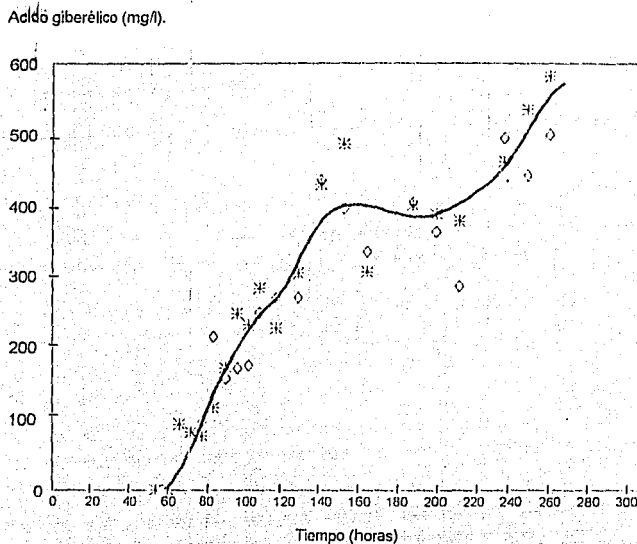


Figura 7.5.2 Cinética de producción de ácido giberélico. Lote: "A", cepa: ATCC-16A, volumen: 14 litros.

Como observamos en las figuras anteriores los datos experimentales presentaron una variación promedio de 10 % lo que garantizó la reproducibilidad de los datos experimentales.

### 7.3 Fermentación por lote con azúcar inicial de 60 g/l, lote B

Con objeto de conocer y aprender a controlar mejor el proceso de fermentación para la producción de ácido giberélico, se corrió éste experimento (Lote B) con poco muestreo (únicamente se tomaron dos muestras). La primera muestra se tomó a los 8 días y una segunda a los 13 días, tiempo en el cual se finalizó el experimento.

### Observaciones

La presencia de un ligero color rosado en el medio de cultivo se presentó a las 48 horas.

Se presentaron problemas con el electrodo de oxígeno disuelto, ya que la membrana del mismo se bloqueó con micelio impidiendo el buen funcionamiento del sistema.

Se verificó la ausencia de contaminación mediante siembra en placa, cada 48 horas. No se manifestó la presencia de algún otro microorganismo en el transcurso de la fermentación.

La cuantificación de GA<sub>3</sub> practicada a las muestras de 8 y 13 días dió los siguientes resultados:

8 días (mg./L) de GA <sub>3</sub>	13 días (mg./L) de GA <sub>3</sub>
275	517

Los resultados obtenidos en éste experimento, son comparables a los del experimento alimentado (sección 7.2).



## 7.4 Fermentaciones lote-alimentadas con solución azucarada

### Introducción

En esta serie de fermentaciones, se propuso evaluar el efecto de la adición de sacarosa al medio de cultivo, a diferentes intervalos de tiempo, durante el proceso de fermentación, tomando en cuenta varias referencias (Borrow *et al.*, 1964a; Serzedello y Whitaker, 1960) que reportaron buenos resultados con esta práctica. Se probaron diferentes protocolos de alimentación, buscando la forma más apropiada para aumentar la concentración y productividad de GA<sub>3</sub>.

#### 7.4.1 Lote C

En esta primera fermentación, se emplearon turbinas 26 % más grandes que las utilizadas en la fermentación por lote, con 60 g/L de azúcar inicial (lote B), y se aumentó la velocidad de agitación en un 9 %, Con estos cambios se aumentó la potencia volúmica estimada a 6.415 kW/m<sup>3</sup>, más de cuatro veces a la utilizada en el lote B. Siendo éstas las condiciones de agitación y aireación más severas hasta ahora mencionadas. Con la mayor potencia suministrada al sistema se logró una de las concentraciones más altas del proyecto (804 mg./L) en 305 horas de fermentación y una productividad de 2.64 mg./l\*h).

El criterio de alimentación de azúcar fue el de mantener concentraciones de azúcares reductores mayores o iguales a 30 g/L durante las primeras 120 h de fermentación, pretendiendo que el hongo almacenara reservas energéticas y la producción de GA<sub>3</sub> se viera favorecida con esta práctica (Borrow *et al.*, 1964a).

## Observaciones y discusión de resultados

Los resultados de la evolución de azúcares, nitrógeno amoniacal, biomasa y  $GA_3$  se muestran en la figura 7.4.1.1.

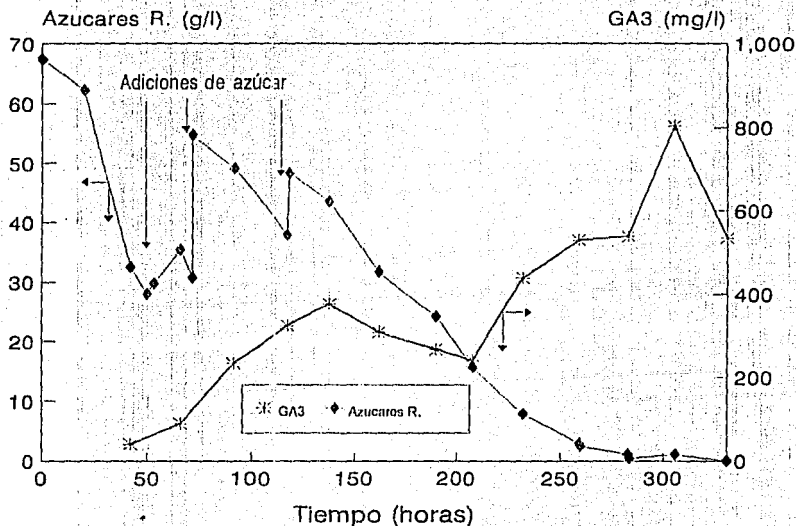


Figura 7.4.1.1 Cinética de producción y consumo de azúcares reductores. Lote "C"; cepa: ATCC-16A; volumen: 14 litros.

Se observó un cambio de coloración a las 18 horas de proceso. La tonalidad que adquirió el medio de cultivo fue ligeramente morada y ésta se fue acentuando a través del tiempo. A las 53.5 horas se inició la primera adición de sacarosa. Entre las 42 y las 92 horas se apreció visualmente una disminución en la calidad del mezclado, muy probablemente por el aumento de la viscosidad del medio de cultivo (en fermentaciones realizadas con la misma cepa se midieron valores de hasta 540 cp de viscosidad aparente en 60 horas de fermentación, en un fermentador de 150 l nominales a 29 °C con una potencia volúmica entre 1.0 y 2.8 kW/m<sup>3</sup> (Alba, 1989)).

La producción máxima de GA<sub>3</sub> fue de 804 mg./L y se obtuvo a las 305.5 horas de haberse iniciado el proceso.

Las concentraciones máximas de GA<sub>3</sub> se obtuvieron cuando la concentración de azúcar en el medio de cultivo alcanzó valores inferiores a 10 g/L.

El valor máximo de GA<sub>3</sub> se presentó después de haber agregado dos pequeñas dosis de azúcar, esto pudo deberse a la acumulación de reservas de almidón y grasa que pudieron emplearse para la producción de GA<sub>3</sub> (Jefferys, 1970).

#### 7.4.2 Lote D

En la segunda fermentación alimentada se exploraron otras formas de aumentar la concentración de GA<sub>3</sub> o de mejorar la productividad (parámetro de referencia a nivel industrial para medir la eficiencia de un proceso fermentativo). Se tomaron en cuenta las observaciones de Holme y Zacharias (1965) en el sentido de que las concentraciones bajas de azúcares en cultivos lote alimentados, son suficientes para el mantenimiento del micelio de *G. fujikuroi* y la producción de GA<sub>3</sub>.

El experimento se realizó en un fermentador de 16 litros, se dejó consumir el azúcar inicial hasta tener una concentración de 5 g/L. A partir de este momento, se comenzó a alimentar una solución concentrada de azúcar, con el objeto de mantener una concentración promedio de 3.2 g/L de azúcares reductores en el fermentador.

Con el objeto de aumentar la solubilidad del oxígeno y la del bióxido de carbono (debido a que éste último ha demostrado tener efecto positivo en la producción de GA<sub>3</sub> y disminuir la fase lag, o de adaptación al medio de cultivo; ICI, 1958), se manejó una presión de  $68.95 \times 10^3$  psig, medida en la tapa superior del fermentador. Se estimó una potencia volúmica de 3.29 kW/m<sup>3</sup>, debido a que también se buscó economizar en el gasto de energía, porque son de los más altos en la industria de fermentación (Lara, 1989; comunicación verbal).

## Observaciones y discusión de resultados

El cambio de coloración se apreció a las 20 horas de iniciado el proceso, con un ligero tono morado y un aparente aumento de la viscosidad, motivo por el cual se decidió incrementar la agitación hasta 700 r.p.m..

Como se presenta en la figura 7.4:2.1 el consumo de azúcares mostró una tendencia lineal a partir de las 26 y hasta las 92 horas de proceso, cuando se agotó. Inmediatamente después se procedió a agregar solución de sacarosa, manteniendo una concentración promedio de 3.0 g/L (con una desviación estándar = 1.29 g/L).

Hubo una disminución rápida del oxígeno disuelto durante las primeras 24 horas, llegando a un valor mínimo de 23 % de saturación. Después de éste tiempo se modificó la agitación para mantener valores superiores de oxígeno disuelto

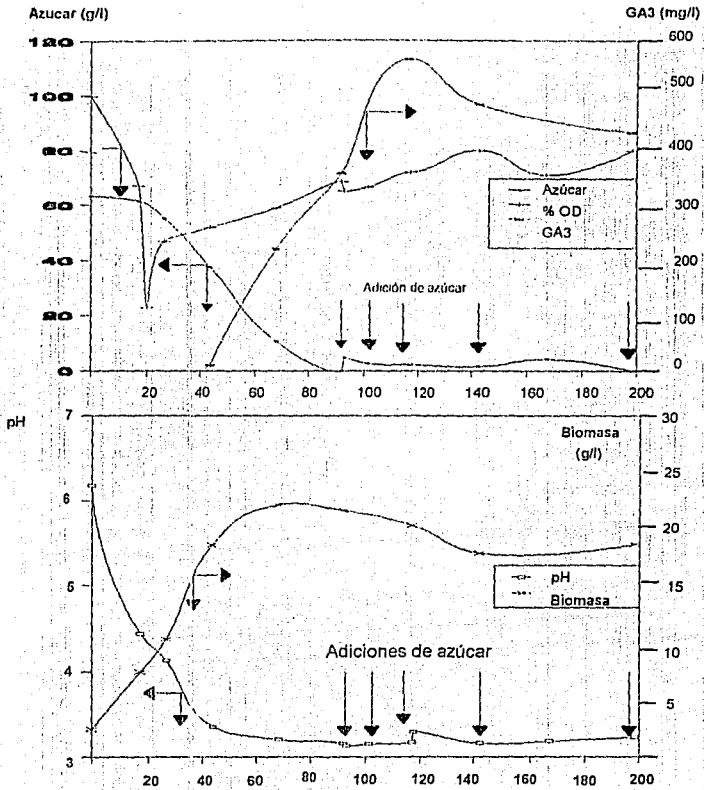


Figura 7.4.2.1 Cinéticas de fermentación y su relación con la adición de azúcar. Lote "D"; cepa: ATCC-16A; volumen: 16 litros.

En la producción de GA<sub>3</sub> se observó una tendencia de incremento lineal en el intervalo de las 44 a las 117 horas, obteniéndose un máximo de 566 mg./l de ácido giberélico a las 177 horas. Después de este tiempo, se observó una disminución en la concentración del producto. Es importante señalar que, en este experimento, se logró la productividad más alta de todos los experimentos reportados anteriormente ( 4. 83 mg. GA<sub>3</sub>/(l\*h)).

La cinética de pH fue ligeramente afectada después de la segunda adición de azúcar, probablemente por un efecto de dilución.

Los valores del oxígeno disuelto tuvieron una disminución, después de la primera adición de la solución azucarada, posiblemente debido a una moderada aceleración del metabolismo del hongo para consumir los azúcares alimentados al fermentador.

#### 7.4.3 Lote E

Para verificar el efecto de la presión alta ( $68.95 \times 10^3$  Pa) se corrió este lote, también en el fermentador de 16 litros, a una presión manométrica de cero y con el mismo criterio de alimentación de azúcar al fermentador utilizado en el lote D. Para obtener un mejor control de la producción de espuma se disminuyó la velocidad de agitación y la potencia volúmica se redujo casi a la mitad de la arriba mencionada:  $1.394 \text{ kW/m}^3$  vs  $4.800 \text{ kW/m}^3$ .

La producción de GA<sub>3</sub>, el consumo de azúcares, la biomasa así como el comportamiento del pH se reportan en la figura 7.4.3.1.

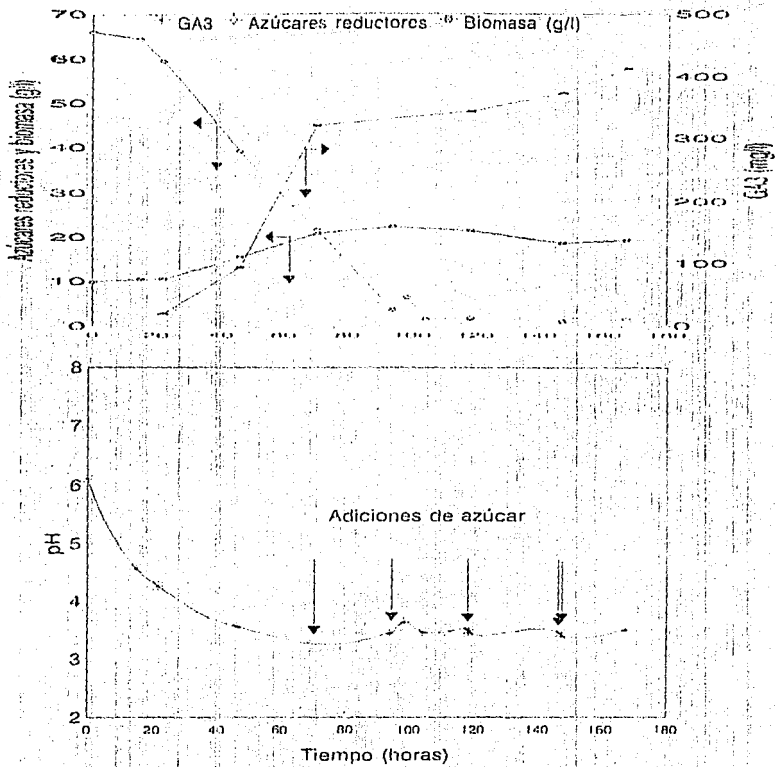


Figura 7.4.3.1 Cinética: de fermentación y adiciones de azúcar

*G. fujiikuroi*, ATCC-16A; lote: "E"; volumen: 16 litros.

## Observaciones

A semejanza del lote D, el cambio de coloración se observó a las 22 horas y fue de tonalidad grisácea.

El consumo de azúcar tuvo una tendencia lineal a partir de las 15 y hasta las 94 horas, tiempo en el cual se efectuó la primera adición de azúcar (antes de que el microorganismo agotara los azúcares en el medio de cultivo). Después de las 100 horas y hasta el término del experimento, se tuvo una concentración promedio de 1.45 g/l (con una desviación estándar de 0.38 g/l).

En la producción de  $GA_3$  se observó una tendencia exponencial entre las 46 y las 96 horas, llegando a un valor de 320 mg./l. Posteriormente, se presentan incrementos pequeños en cada determinación, hasta llegar a 413 mg./l. Sobresale en este experimento que la producción de  $GA_3$  no decayó a lo largo de la fermentación. Obteniendo una productividad de 2.43 mg  $GA_3$ /(l\*h) con un título de 413 mg./l de  $GA_3$  en 170 horas de fermentación.

El pH se vio ligeramente afectado en cada adición de solución azucarada, posiblemente solo por efecto de dilución.

Como lo reportó la ICI (1958), el efecto de mantener la presión a  $68.95 \times 10^3$  Pa se manifestó en una disminución de la fase de adaptación del inóculo a las condiciones de fermentación. En el lote D (figura 7.4.2.1) observamos que no detectamos una fase de latencia al comienzo de la fermentación, mientras que en el lote E (figura 7.4.3.1) si se aprecia un periodo de adaptación de aproximadamente 24 h.

El efecto positivo de la disminución en la fase adaptación se reflejó en una producción mayor de  $GA_3$  en menor tiempo: 566 mg./l en 120 h (lote D) mientras que en el lote E se obtuvo 413 mg./l en 170 h.

A diferencia del lote D, las adiciones de azúcar al medio de cultivo parecieron prolongar la producción de  $GA_3$ , debido a que la curva no mostró mínimos en la producción. Por lo contrario se mantuvo una



tendencia a la alza con ligeros incrementos hasta el final de la fermentación.

Al igual que en el lote D la cinética de pH se vio ligeramente afectada por las adiciones de la solución azucarada.

En vista de la evidente relación de la potencia volúmica con la concentración de  $GA_3$  se graficó las concentraciones máximas logradas (de las fermentaciones alimentadas con azúcar) vs. la potencia volúmica suministrada, encontrando una excelente relación lineal (coeficiente de regresión  $r^2 = 0.97$ ) entre la concentración de  $GA_3$  y la potencia volúmica suministrada (figura 7.4.4.2). Por lo tanto se decidió emplear la potencia volúmica constante como criterio de escalamiento.

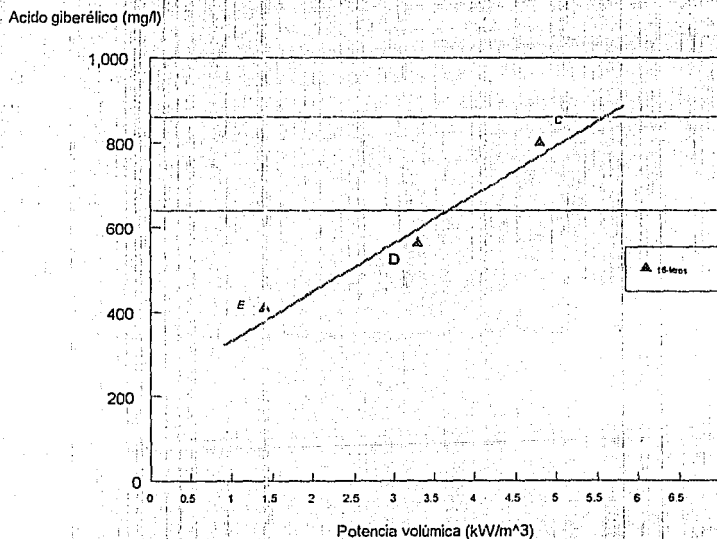


Figura 7.4.4.2 Relación de la potencia volúmica con la producción de ácido giberérico ( $r^2 = 0.97$ ), en fermentaciones alimentadas con azúcar.

## 7.5 Escalamiento, lotes F y G

Con la sugerencia de emplear el criterio de escalamiento de potencia volúmica constante, se elaboró un programa de computación con el objeto de estimar la potencia volúmica (figura 7.5.1.) Para lograr este objetivo se realizó una revisión bibliográfica y se seleccionaron las ecuaciones más recientes y adecuadas para procesos de fermentación.

El programa esta hecho para emplear el sistema de unidades mks (metro, kilogramo, segundo), comienza con el cálculo del número de Reynolds y continúa con el número de potencia.

Para determinar las condiciones de operación de los fermentadores: primero se calculó la potencia volúmica que se suministró a un fermentador de 16 l nominales y posteriormente se calculó la potencia en 150 l fijando la tasa de aireación en un valor dado y calculando la agitación mediante una método de prueba y error, dando un criterio de igualdad de más menos  $10 \text{ W/m}^3$ .

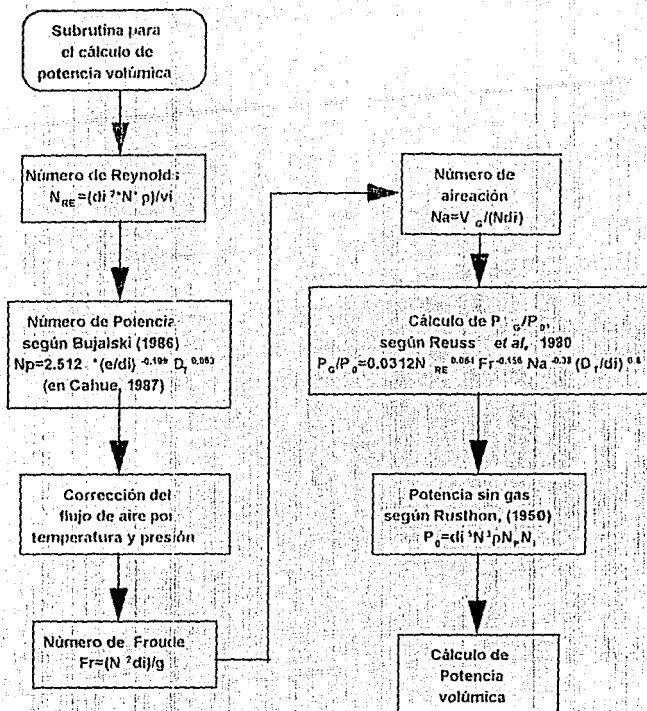


Figura 7.5.1 Digrama de flujo para el cálculo de potencia volumétrica.

En esta experiencia el factor de escala fue de 10 aproximadamente: de 16 a 150 litros.

Se utilizaron las siguientes condiciones experimentales durante las primeras 24 horas de proceso:

Lote	F (16 l)	G (150 l)
Agitación (r.p.s.)	9.02	4.7
Temperatura (°C)	31.0	31.0
Aireación (m <sup>3</sup> /s)	$1.83 \times 10^{-4}$	$1.38 \times 10^{-4}$
Presión (P <sub>i</sub> )	$68.95 \times 10^3$	$68.95 \times 10^3$
Volumen de operación (m <sup>3</sup> )	0.011	0.105
P <sub>ci</sub> /V estimada (W/m <sup>3</sup> )	1686	1678

Después de las primeras 24 hrs. sólo se cambió la temperatura a 29 °C.

En la figura 7.5.2 y 7.5.3 se encuentran concentrados los resultados referentes al experimento de escalamiento:

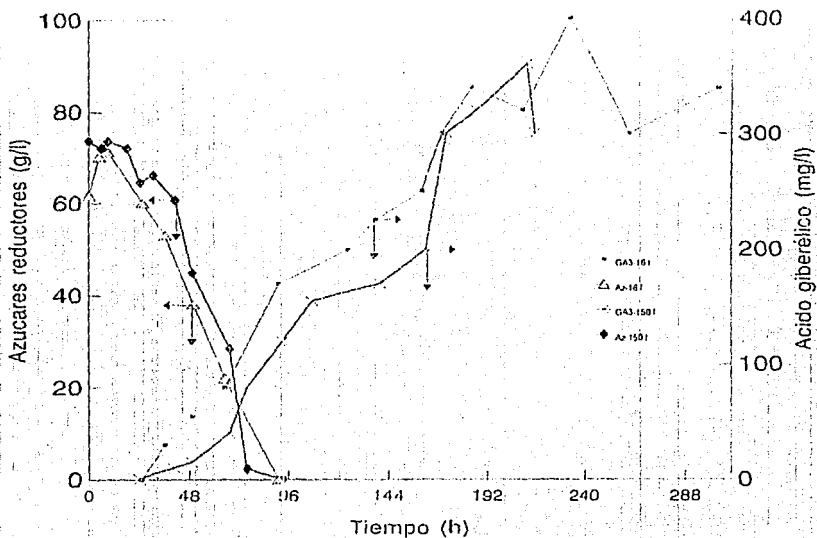
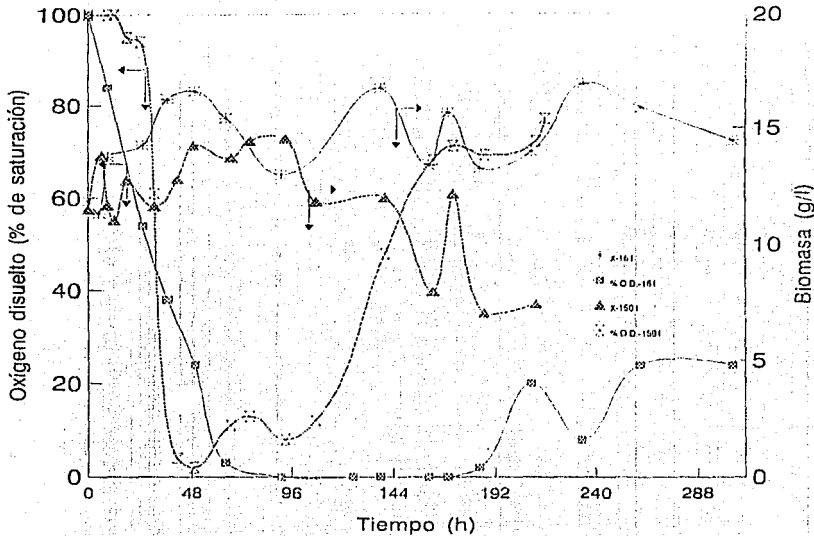


Figura 7.5.2 Comparación de las cinéticas de fermentación de los lotes F (16 L) y G (150L) cepa: M-92 de *G. fujikuroi*.



Jara 7.5.3 Comparación de las cinéticas de fermentación de los lotes F (16 L) y G (150 L), cepa: M-92 de *G. fujikuroi*.

## OBSERVACIONES Y DISCUSIÓN

En el lote F (16 litros) a las 24 horas de fermentación se presentó el cambio de coloración en el medio de cultivo, siendo una coloración ligeramente roja. Esta coloración se acentuó conforme avanzó la fermentación. Se tuvieron considerables problemas de espuma, por lo que se tuvo que agregar antiéspumante (FG-10 de Especialidades Químicas) en continuo. Esto ocasionó condiciones de operación no controladas.

Con lo que respecta a la curva de producción de ácido giberélico se observa que la producción continúa mucho después de haberse agotado los azúcares, coincidiendo con lo que reporta Borrow (1964a) en sus trabajos con *Gibberella*. Como se observa en la gráfica, se comenzó a producir a las 20 hrs de proceso, siguiendo una pendiente de producción casi lineal hasta las 233.5 hrs.

En el lote G (150 litros), antes de las 12 horas, se observa un aumento en los azúcares reductores, debido posiblemente a un desdoblamiento rápido de los almidones de la harina de soya.

La producción de ácido giberélico se inició aproximadamente a las 24 hrs. Esto coincide con el agotamiento de la fuente de nitrógeno mineral que ocurre, según lo observado en experimentos anteriores, a las 24 hrs.

Como se observa en la figura 7.5.2, la concentración de  $GA_3$  va en aumento hasta las 211 hrs. Esto hace suponer que, al agotarse los nutrientes en el medio de cultivo, el microorganismo cambia de metabolismo y se da el caso de que la concentración de  $GA_3$  disminuya en esta etapa, posiblemente por descomposición, aunque no se descarta la posibilidad de un consumo de  $GA_3$  para generar otro tipo de compuestos que ayuden al hongo a preservar su propagación en condiciones adversas.

Se observó un mayor crecimiento en el fermentador de 16 litros por lo tanto, se obtuvieron perfiles diferentes de oxígeno disuelto.

Las curvas de consumo de azúcar fueron parecidas pero parece que el hongo tarda más en adaptarse al medio ambiente en el fermentador de 150 l.

Comparando las cinéticas de  $GA_3$  podemos decir que el criterio de escalamiento de potencia volúmica constante fue un éxito, debido a que las curvas de producción de  $GA_3$  (que es la variable de respuesta que más nos interesa) son lo suficientemente semejantes como para obtener títulos similares de  $GA_3$ . Con esto se demuestra la utilidad de las ecuaciones empíricas, para estimar la potencia volúmica, cuando no se dispone del equipo adecuado para medirla exactamente.

## 7.6. Lote H

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Con el objeto de comprobar el efecto positivo de aumentar la potencia volúmica sobre la producción de GA<sub>3</sub> se corrió este lote en un fermentador de 150 L nominales con una potencia volúmica mayor a la empleada en el lote G.

El lote H se corrió con una potencia volúmica estimada de 2.452 kW/m<sup>3</sup>. Se le hicieron tres adiciones de azúcar: la primera a las 167 h, la segunda a las 191 h y la tercera y última a las 208 h, manteniendo una concentración de azúcares reductores dentro del fermentador en el rango de 2.1 a 5.3 g/l.

La producción de GA<sub>3</sub>, el consumo de azúcares, la biomasa así como el comportamiento del nitrógeno amoniacal se reportan en la figura 7.6.1.

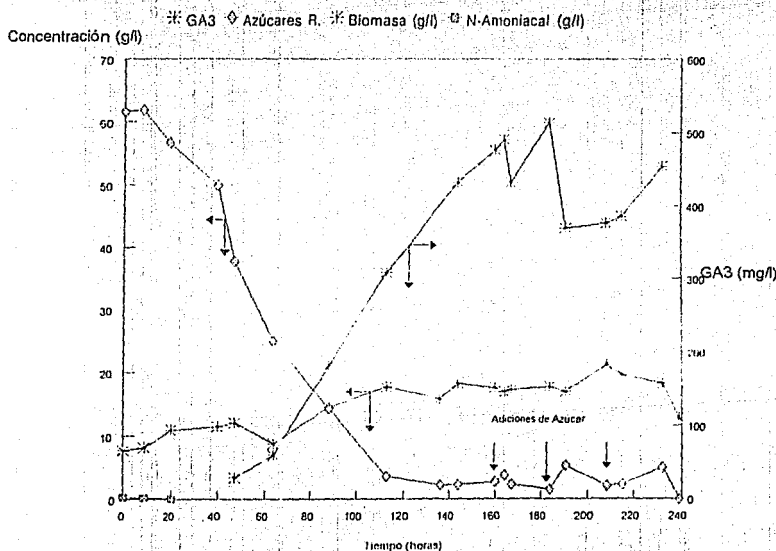


Figura 7.6.1 Cinéticas de fermentación y adiciones de azúcar, *C. ljurikuroi*, ATCC-16A; lote "H"; volumen: 150 litros.



## Observaciones

Los resultados del nitrógeno amoniacal confirman que alrededor de las 20 h este sustrato prácticamente se agota en el medio de cultivo.

La cantidad de biomasa máxima producida ( 21.3 g/l de peso seco) se alcanzó a las 210 horas y coincidió después de la primera adición de solución azucarada.

En la producción de  $GA_3$  se observó una tendencia exponencial entre las 60 y las 110 horas, llegando a un valor de 308 mg./l. Después de un máximo se presentó una disminución en la concentración, tal vez debido a la degradación del  $GA_3$ . Al parecer, la adición de azúcar afectó la producción de  $GA_3$ , posiblemente por problemas de transferencia de masa provocados por el aumento en la concentración de biomasa. Alba (1989) reportó que con el aumento de la concentración de biomasa se presentan incrementos en la viscosidad aparente, que a su vez ocasiona una disminución importante en el coeficiente de transferencia de oxígeno ( $K_{LA}$ ) y un mezclado deficiente (Kipke, 1978). El mezclado deficiente provoca zonas pobres en nutrientes que pueden ocasionar cambios metabólicos irreversibles, negativos para la producción del metabolito secundario de interés (Pirt, 1975).

Con una potencia volumica suministrada de 2.452 kW/m<sup>3</sup> más grande que la del lote G (1.678 kW/m<sup>3</sup>), se logró una mayor concentración de  $GA_3$  (513 mg/l vs. 360 mg/l).

Como es evidente en la figura 7.6.2 la potencia volumica es determinante para la producción de  $GA_3$  en fermentaciones lote alimentadas, aún empleando la cepa mutante M-92 como ocurrió en los lotes F y G.

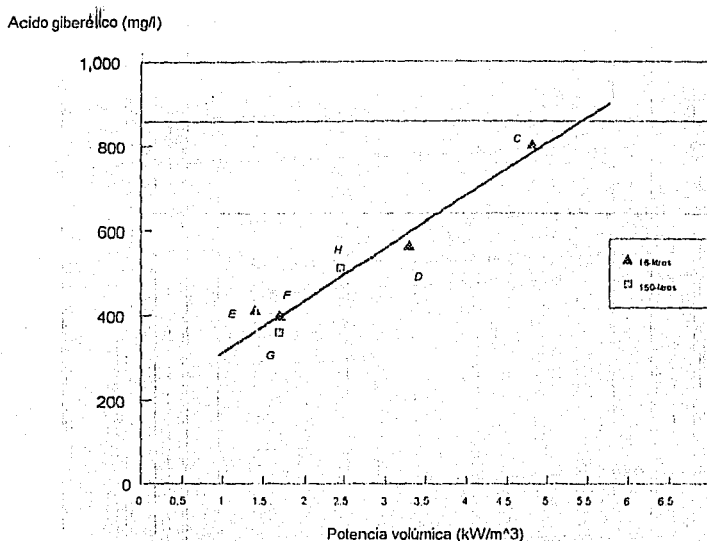


Figura 7.6.2 Relación de la potencia volúmica con la producción de ácido giberélico, en todas las fermentaciones alimentadas con azúcar.

## 7.6 Fermentaciones con posible precursor **lot**es I y J

### Introducción

Los lotes I y J son en realidad una fermentación por duplicado en la que se empleó una cepa mutada por métodos químicos (de la cepa original *G. fujikuroi* ATCC-16) y seleccionada a nivel matraz como hiperproductora de GA<sub>3</sub> (denominada M-92). También se empleó un nuevo antiespumante (Mazu-DF-9711), que ha probado ser más efectivo para controlar la espuma en procesos de fermentación con hongos filamentosos realizadas en el CINVESTAV (De la Torre M., 1990; comunicación personal).

El antiespumante Mazu-DF-9711 está hecho a base de aceite de soya, por lo que podría beneficiar la producción de GA<sub>3</sub>. Publicaciones rusas han

reportado mejoras en el rendimiento de GA<sub>3</sub> empleando aceites vegetales (Eurokhina, 1967 y Muromtsev, 1968)

Resumen de las fermentaciones realizadas durante el proyecto de tesis.

LOTE	CEPA <i>G. fujikuroi</i>	FERMENTADOR	POTENCIA VOLUMICA (kW/m <sup>3</sup> )	GA3 (mg/l)	PRODUCTIVIDAD (mg/(l·h))	OTRAS CONDICIONES
A	ATCC-16A	14 litros	0.876	585	2.25	Lote-alimentado con medio completo
B	ATCC-16A	16 litros	0.800	517	1.66	Fermentación por lote
C	ATCC-16A	14 litros	4.800	804	2.64	Lote-alimentado con azúcar
D	ATCC-16A	16 litros	3.290	566	4.72	Lote-alimentado con azúcar
E	ATCC-16A	16 litros	1.394	413	2.43	Lote-alimentado con azúcar
F	M-92	16 litros	1.686	400	1.71	Fermentación por lote
G	M-92	150 litros	1.678	360	1.70	Fermentación por lote
H	ATCC-16A	150 litros	2.452	513	2.79	Lote-alimentado con azúcar

LOTE	CEPA	FERMENTADOR	POTENCIA VOLUMICA (kW/m <sup>3</sup> )	GA3 (mg/l)	PRODUCTIVIDAD (mg/(l·h))	OTRAS CONDICIONES
I	M-92	16 litros	0.554	682	3.06	Fermentación con aceite de soya
J	M-92	16 litros	0.554	714	2.55	Fermentación con aceite de soya

## OBSERVACIONES Y DISCUSION

En la figura 7.7.1 se encuentran concentrados los resultados.

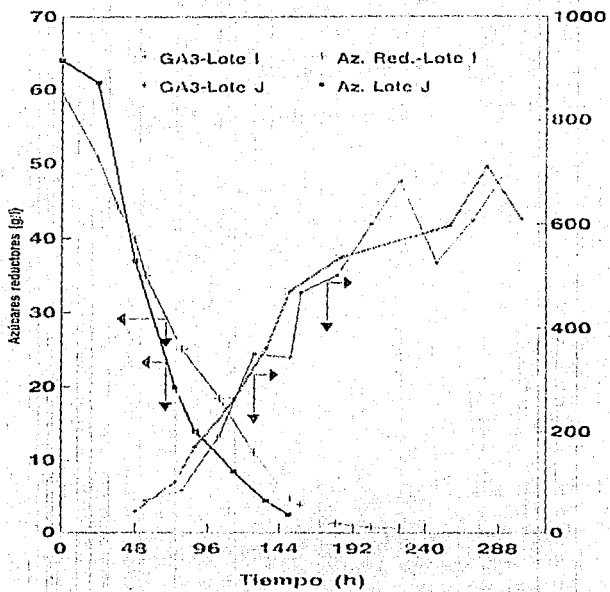


Figura 7.7.1 Comparación de las cinéticas de producción de GA3 y consumo de azúcares reductores, lotes I y J; volumen 16 l, cepa M-92.

En estas fermentaciones, a diferencia de todas las realizadas anteriormente, no se presentaron los problemas de formación de espuma característicos que se habían estado presentando en todas las experiencias anteriores. De hecho no hubo una producción importante de espuma a lo largo de todo el proceso de fermentación.

El consumo de azúcares fue casi en forma lineal hasta las 144 horas de fermentación y se agotaron en un tiempo mayor al usual (204 h en lugar de aproximadamente 120 h). Al parecer, la producción comenzó alrededor de las 48 hrs. y continuó con una pendiente positiva hasta las 223 hrs. (9.3 días).

En éste experimento se obtuvieron títulos de  $GA_3$  muy interesantes. Por ello se propone que el antiespumante Mazu-DF-7911, pudo haber tenido un efecto precursor además de los excelentes resultados de control de espuma, con la adición de pequeñas cantidades de antiespumante.

Como apreciamos en la figura 7.7.1 las cinéticas de consumo de azúcares reductores no presentan el mismo perfil. Esto pudo deberse a que el inóculo del lote 1 se tardó más tiempo en adaptarse y consumió más lentamente los azúcares reductores al comienzo de la fermentación, debido a que le afectaron las condiciones de agitación y mezclado del fermentador, condiciones más agresivas que las de un matraz agitado.

Las cinéticas de producción de  $GA_3$  presentan aproximadamente el mismo comportamiento como se muestra en la figura 7.7.1. Esto nos indica la buena reproducibilidad de la producción de  $GA_3$  con la cepa mutante de *Gibberella fujikuroi* (M-9'2).

## 8.0 CONCLUSIONES

La cepa de colección *Gibberella fujikuroi* ATCC-16 presentó una constante de saturación ( $K_s$ ) de 60 g/l, una velocidad específica de crecimiento máxima de  $7.533 \cdot 10^{-1}$  ( $h^{-1}$ ) y un coeficiente de mantenimiento ( $m$ ) de 0.026 (g azúcar/(g biomasa·h)), en experimentos realizados en matraces de 500 ml con un medio complejo que contiene: sacarosa, harina de soya, sólidos de cocimiento de maíz y sales minerales.

Como resultado del estudio de las fermentaciones alimentadas con sacarosa en donde se observó que el parámetro que más influye en la producción de  $GA_3$  es la potencia volúmica: se estableció un procedimiento de cultivo para *G. fujikuroi* (cepa ATCC-16A) que produce concentraciones mayores a 750 mg  $GA_3$ /l en menos de la mitad del tiempo establecido como objetivo (30 días de proceso), con el medio propuesto por Pitel *et al.*, (1970), con 60 g/l de azúcar inicial, y manteniendo concentraciones de azúcares reductores mayores o iguales a 30 g/l durante las primeras 120 h de fermentación y una potencia volúmica de 4.80 kW/m<sup>3</sup>.

Debido a la excelente relación lineal que se determinó entre la potencia volúmica y la producción de  $GA_3$ , se concluyó que el criterio de potencia volúmica constante es adecuado para escalar el proceso de fermentación sumergida en la producción de  $GA_3$ , realizando un experimento exitoso de 16 a 150 L. De esta forma se demostró que las ecuaciones empíricas reportadas en la literatura son de gran utilidad, para estimar la potencia volúmica, cuando no se dispone del equipo adecuado para medirla en forma precisa.

Por los títulos de  $GA_3$  tan altos logrados (hasta 714 mg./l en 11.7 días) en la fermentación realizada con la cepa M-92 y el antiespumante Mazu-DF-7911, se concluye que dicho antiespumante no interfirió en el proceso de producción del  $GA_3$  y, en cambio, pudo tener un efecto precursor.

## 9.0 RECOMENDACIONES

Con la cepa mutante M-92 de *G. fujikuroi* y un antiespumante a base de aceite de soya, se lograron concentraciones de  $GA_3$  muy interesantes con la potencia volúmica más baja utilizada en el proyecto, por lo que se recomienda estudiar y optimizar un protocolo de alimentación de aceites vegetales en combinación con sacarosa y/o harinas vegetales, para prolongar y por ende aumentar la producción de  $GA_3$ .

Se recomienda emplear ecuaciones que consideren los cambios reológicos que ocurren a lo largo de la fermentación, para estimar en forma más precisa la potencia volúmica durante el tiempo de producción y observar su influencia en la producción de  $GA_3$  a través del tiempo para considerar posibles manipulaciones de la agitación y/o aireación que beneficien la producción.

### Bibliografía

Alba, A. A., Patiño, V. M. y Cahue A. (1989). "Estudio sobre las propiedades reológicas de un caldo de fermentación con un microorganismo filamentosos". Trabajo de Servicio Social. LANFI-UAM, México.

Bearder, J. R., MacMillan, J. and Phinney, B. O. (1975). "Metabolic pathways from ent-kaurenoic acid to the fungal gibberellins in mutant B1-41 of *Gibberella fujikuroi*". J. C. S. Perkin Trans I. pp. 721-26.

Borrow, A., Brian, P. W., Chester, V.E., Curtis, P. J., Hemming, H. G., Henehan, C., Jefferys E. G., Lloyd, P. B., Nixon, I. S., Norris, G. L. F., and Radley, M. (1955). "Gibberellic acid a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*; some observations on its productions and isolation". J. Sci. Food Agr., 6: 340-348.

Borrow, A., Jefferys, E.G., Kessell, R.H.J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., and Nixon I. S. (1961). "The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture". Can. J. Microbiol, 7: 227-276.



Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E.G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., Rothwell, A., Rothwell, B. and Swait, J. C. (1964a). "The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture". Can. J. Microbiol, 10: 407-444.

Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., Rothwell, A., Rothwell, B. and Swait, J. C. (1964b). "The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture". Can. J. Microbiol, 10: 445-466.

Bruckner, B. and Blechschmidt, D. (1991). "The gibberellin fermentation". Crit. Rev. Biotechnol. (11) 2:163-192.

Bu'Lock, J. D., Detroy, R. W., Hostalek, Z. and Munim-Al-Shakarchi, A. (1974). "Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". Trans. British Mycological Soc. Vol.62, 2:377-389.

Bu'Lock, J. D. (1982). Useful metabolites of *Fusarium* in "The Applied Mycology of *Fusarium*". Moss, M. O. and Smith, J. E., Eds. University Press. Cambridge England.

Cahue, L. C. A. (1987). Tesis doctoral, "Etude de transfert d'oxygene en cuves agitees mecaniquement". Villeneuve D'Ascq Francia, pp 83, 84, 103, 114.

Christie, C. B. and Nichols, M. A. (1989). "Plant growth regulators and their applications". Agribusiness Worldwide, June, pp 24-31.

Cross, B. E., Galt, R. H. B., Norton, K. (1968a). "The biosynthesis of gibberellins part II". Tetrahedron 24: 231-237.

Cross, B. E., Norton, K., Stewart, J. C. (1968b). "The biosynthesis of gibberellins Part III". J. Chem. Soc. C. 1054-1063.

Darken, M.A., Jensen, A. L. and Shu, P. (1959). "Production of gibberellic acid by fermentation". Appl. Microbiol. 7: 301-303.

Erewer, D. and Arsenault, G. P. (1973). "Production of bikaverin by *Fusarium oxysporum* and its identity with lycopersin". The J. of Ant. 26 12:778-781.

Eurokhina, L. I. and Sokolova, E. V. (1966). "Selection of *Fusarium moniliforme* Sheld (producer of gibberellins) with application of mutagenic factors". Genetika 1:109.

Eurokhina, L. I. and Efremov, B. D. (1970). "Biochemical mutants of *Fusarium moniliforme* (Sheld). Genetika 6: 170.

Evans, R. and Hanson, J.R. (1972). "The formation of (-)-kaurene in a cell-free system from *Gibberella fujikuroi*. Part X. Incorporation of (5S)-5-3H1 mevalonic acid into gibberellic acid". J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2382-2385.

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Quinta edición, México, 1988, pp 93-94.

Fuska, J., Kuhr, I., Sevcik, Musilek, V. and Podojil, M. (1962). "The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerged cultivation of *Gibberella fujikuroi*". Czech. Pat. No. 104,329.

García, C. P. (1961). "Identificación del ácido giberélico por cromatografía en papel". Tesis profesional, ENCO-UNAM.

Geissman, T. A., Verbiscar, A. J., Phinney, B. O. and Cragg, G. (1966). "Studies on the biosynthesis of gibberellin from(-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*". Phytochemistry 5: 933-947.

González, P. C., Delgado, G., Antigua, M., Rodríguez, J., Larralde, P., Viniegra, G., Pozo, L., and Pérez, M. del C. (1994) "Some aspects of *Gibberella fujikuroi* culture concerning gibberellic acid production". Adv. in Bioprocess Eng., Kluwer Academic Publishers, (eds.) Galindo, E. and Ramirez, O. T., pp 425-430.

Greenberg, A. E., Trussell, R. R. and Clesceri, L. S. (1985). "Standard methods for the examination of water and wastewater". Decima sexta edición, Washington D. C., U. S. A., pp. 363-384.

Gutcho, S. J. (1973). "Chemicals by fermentation", Noyes Data Corporation, London England.

Hedden, P., MacMillan, J. and Phinncy, B. O. (1978). "The metabolism of the gibberellins". Ann. Rev. Plant. Physiol. 29: 149-192.

Hill, H. M. and Rogers, L. J. (1974). "Mavalonate activating enzymes and phosphates in higher plants". Phytochemistry 13: 763-777.

Holme, T. and Zacharias, B. (1965). "Gibberellic acid formation in continuous culture". Biotechnol. Bioeng. 7: 405-415.

Hollmann, D., Switalski, J., Geipel, S., and Onken, U. (1995). "Extractive fermentation of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*". J. Ferment. Bioeng. (79), 6: 594-600.

ICI (1958). United States Patent 2,865,812 "Metabolic process for production of gibberellic acid".

Jefferys, E.G. (1970). "The gibberellin fermentation", Adv. Appl. Microbiol. 13: 283-316.

Kahlon, S. S. and Malhotra, S. (1986). "Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate". Enzyme Microb. Technol. 6 Oct., 613-616.

Kipke, K. (1978). "Gas dispersion in non-newtonian liquids", International symposium on mixing", Faculté Polytechnique de Mons, 21-24 février, France.

Kitamura, H., Kawarada, A., Seta, Y., Takahashi, N., Otsuki, T. and Sumiki, Y. (1953). "The biochemistry of bakanae fungus. XXVII. The production of gibberellin by submerged culture". J. Agri. Chem. Soc. Jap. 27: 545-549.

Krasilnikov, N. A., Shirokov, O. G. and Kuchaeva, A. G. (1963). "Gibberelliny Ikh Deistvie Rast", SSSR. pp 39-44.

Kuhr, K., Fуска, J., Podojil, M. and Sevcik, V. (1961). "The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*". Folia Microbiol. (Prague). 6: 179-185.

Kumar, P. K. R. and Losanc, B. K. (1987). "Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid". Biotechnol. Letters vol. 9, 3:179-182.

Kumar, P. K. R. and Losanc, B. K. (1989). "Microbial production of gibberellins: state of the art". Adv. Appl. Microbiol. 34:29-139.

Kurosawa, E. (1926). "Experimental studies on the nature of the substance excreted by the bakanae fungus". Trans. Nat. His. Soc. Formosa. 16:213.

Lu, Z. X., Xie, Z. C. and Kumakura M. (1995). "Production of gibberellic acid in *Gibberella fujikuroi* adhered onto polymeric fibrous carriers". Process Biochem. vol. 30, 7:661-665.

Mac Millan, J. and Suter (1963). "Thin layer chromatography of gibberelins". Nature, 197:790.

Martin, G. C. (1983). Commercial uses of gibberellins, in "The Biochemistry and Physiology of gibberellins". Vol. 2. Chap. 11. Crozier A. (Ed.) Praeger. New York.

Muromtsev, G. S., Rakovskii, Y. S., Dubovaya, L. P., Temnikova, T. V. y Fedchenko, A. N. (1968). "Issuchenie sucharovi zira istochnikov dla biosintesa gibberellina". Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 4: 398-407.

Oster, M. O. and West, C. A. (1968). "Biosynthesis of trans-geranylgeranyl pyrophosphate in endosperm of *Echinocystis macrocarpa* Greene". Arch. Biochem. Biophys. 127: 112-123.

Palmer, G. H. (1971). "The industrial use of gibberellic acid and its scientific basis- a review". J. Inst. Drew. 80:13.

Phinney, B. O. and Spector, C. (1967). "Genetics and gibberellin production in the fungus *Gibberella fujikuroi*". Ann. N. Y. Acad. Sci. 144: 204-210.

Patiño, V.M., Ramos, V. S., Razo, F. E. y López, H. H. (1989). "Estudio de mercado del ácido giberélico en México". III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Monterrey N. L., México.

Phinney, B. O. (1983). The history of gibberellins, en "The Biochemistry and Physiology of gibberellins". Vol. 1. Chap. 1. Crozier A. Ed. Praeger. New York.

Pitel, D.W., Vining, L.C. and Arsenault, G.P. (1970). "Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. The sequence after gibberellin GA4". Can J. Biochem. 49: 194-200.

Pirt, S. J. (1975). "Microbe and cell cultivation". Blackwell Scientific Publications, pp.4-13; 66-69, Great Britain.

Prema, P., Thakur, M. S., Prapulla, S. G., Ramakrishna, S. V. and Losane. B. K. (1988). "Production of gibberellic acid by solid-state fermentation: potential and feasibility". Indian J. Microbiol. (28) 1-2:78-81.

Rainbow, C. and Rose, A. H. (1963). "Biochemistry of industrial microorganisms". Academic Press, pp. 320-340, London, England.

Reuss, M., Bajpai, R. K., Lenz R. (1980). "Scale-up strategies based on the interaction of transport and reaction". 6th International Fermentation Symposium.

Ricicova, A. and Podojil, M. (1960). "Laboratory fermentation of gibberellic acid". Folia Microbiol. (Prague) 5:181.

Rusthon, J. H., Costich, E. W., and Everett, H. J. (1950). "Power characteristics of mixing impellers. Part I". Chem. Eng. Progress, Vol. 46, 8:395-404.

Sawada K. (1912). "Diseases of agricultural products in Japan". Agric. Rew. 63:10.

Schechter, and I., West, C. A. (1969). "Biosynthesis of gibberellins. IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl pyrophosphate". J. Biol. Chem. 244: 3200-3209.

Serzedello, A. and Whitaker, N. (1960). " Fermentacao giberelínica. Influencia da concentracao de sacarose do substrato sobre a bio-sintese do ácido giberélico". Rev. Agri. (São Paulo). 35: 15-24.

Shklyar, M. Z. (1965). "Effect of gibberellin on microorganism and on the enzymatic activity of barley during malt growth, a review". Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1:102.

Spector, C. and Phinney, B. O. (1968). "Gibberellin biosynthesis genetic studies in *Gibberella fujikuroi*". Physiol.Plant. 21:127-136.

Stodola, P. H., Raper, K. B., Pennell, D. L., Conway, H. P., Sohns, V. E., Langford, C. T., and Jackson, R. W. (1955). " The microbiological production of gibberellines A and X". Arch. Biochem. Biophys. 66: 438-444.

Stoll, C. (1954). "Über stoffwechsel und biologisch wirksame stoffe von *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Woll, dem erregere der Bakanaekrankheit". Phytopathol. Z. 22: 233-274.

Verbiscar, A. J., Cragg, G., Geissman, T. A. and Phinney, B. O. (1967). "Studies on the biosynthesis of gibberellins II. The biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenol and the conversion of gibberellins C-GA4 y C-GA7 into C-GA3 by *Gibberella fujikuroi*". Phytochemistry 6: 807-814.

Yabuta, T., Kambe, K., and Hayashi, T. (1934). "Biochemistry of the "bakanae" fungus of rice". J. Agrc. Chem. Soc. Jap. 10: 1059-1068.

## Anexo

Programa de cálculo de potencia volúmica en  $W/m^3$ 

## Lista de variables:

DE= Densidad

VI= Viscosidad

E= Espesor del disco del impulsor

G= Constante de aceleración de la gravedad

P1= Presión a condiciones estandar

T1= Temperatura a condiciones estandar

DI= Diámetro del impulsor

N= Velocidad de agitación

DT= Diámetro del tanque

VG= Flujo de aire

T= Temperatura de proceso

P= Presión

NI= Número de impulsores

V= Volumen del líquido

PX= Presión absoluta del aire antes de entrar al fermentador

PY= Presión absoluta del aire a la salida del difusor

NR= Número de Reynolds

NP= Número de potencia

VS= Flujo del aire a la salida del difusor

NA= Número de aireación

FR= Número de Froude

PG/PO= Potencia con aireación/Potencia sin aireación

PV= Potencia volúmica

**Programa en lenguaje Basic**

```

5: REM PROGRAMA PARA POTENCIA VOLUMICA
7: REM SISTEMA MKS
10: REM BUJALSKI (1986) REUSS (1986)
15: DATA DE, VI, E, G, P1, T1
20: DATA 10.10, 0.001, 0.0022, 9.8, 1.013E5, 294.15
25: REM VARIABLES
30: READ DI, N, DT, VG, T, P, NI, V, PX, PY
35: DATA 0.086, 9.02, 0.207, 183.33E-
6, 31, 6.895E4, 2, 0.011, 3+2.68E3, 319.24E3
40: REM NUMERO DE REYNOLDS
45: NR=((DI^2)*N*DE)/VI
50: PRINT "NR="; NR
55: REM NUMERO DE POTENCIA
60: NP=2.512*((E/DI)^0.195)*(DT^0.063)
65: PRINT "NP="; NP
70: REM FACTOR DE CORRECCION
75: T2=T+273.15
80: P2=P+74672.85
85: FC=SQR (PX/PY)
90: VC=VG/FC
95: VS=(P1/P2)*(T2/T1)*VC
97: PRINT "VS="; VS
100: REM NUMERO DE AIREACION
105: NA=VS/(N*(DI^3))
107: PRINT "NA="; NA
110: REM NUMERO DE FROUDE
115: FR=((N^2)*DI)/G
117: PRINT "FR="; FR
120: REM CALCULO DE PG/PO
125: PA=0.0312*(NR^0.064)*(FR^-0.156)
130: PV=(NA^-0.38)*((DI^2)/DI)^0.8
135: PC=PA*PV
137: PRINT "PG/PO="; PC
140: REM POTENCIA SIN GAS
145: PO=(DI^5)*(N^3)*DE*NP*NI
147: PRINT "PO="; PO
150: REM POTENCIA CON GAS
155: PG=PC*PO
157: PRINT "PG="; PG
160: REM POTENCIA VOLUMICA
165: PV=PG/V
170: PRINT "PV"; PV

```



RUN

NR= 67397.04

NP= 6.21

VS= 7.75 (l/min)

NA=  $2.251 \cdot 10^{-2}$ FR=  $7.14 \cdot 10^{-1}$ PG/P0=  $5.72 \cdot 10^{-1}$ 

P0= 43.335 (W)

PG= 24.78 (W)

PV= 2.253 (kW/m<sup>3</sup>)