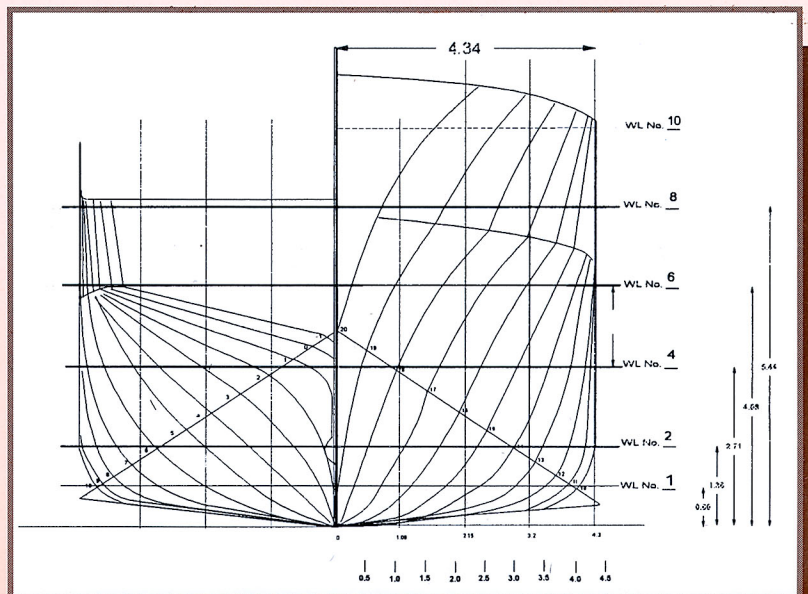
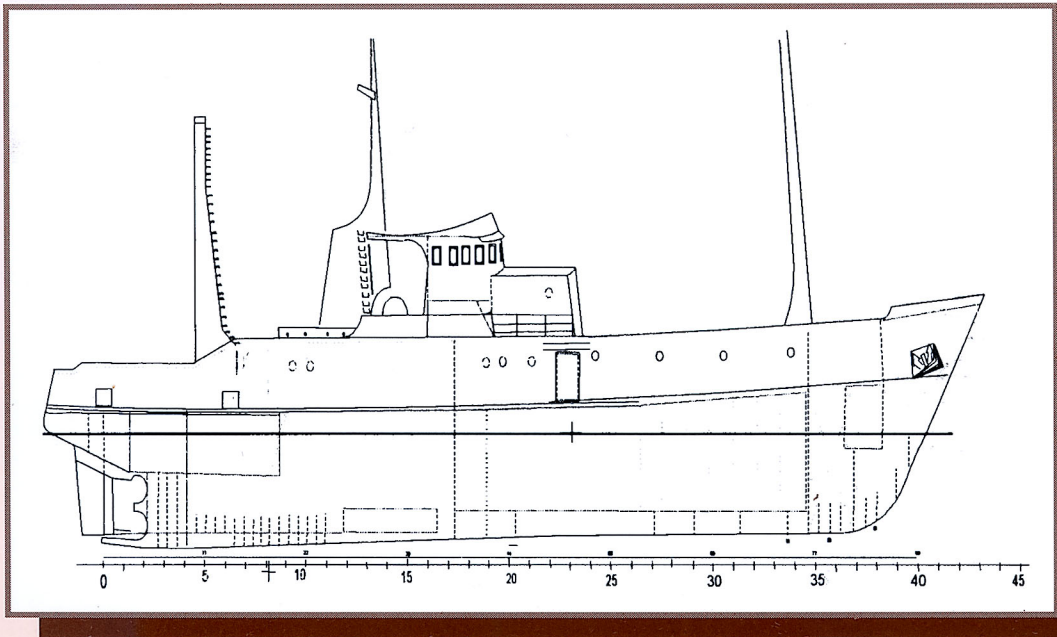


# Ingeniería

Revista de la Universidad de Costa Rica  
Julio/Diciembre 1995 VOLUMEN 5 Nº 2



## PRODUCCIÓN DE ÁCIDO GIBERÉLICO MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO EL HONGO GIBBERELLA FUJIKUROI

Manuel E. Molina\*

Alvaro J. Murillo\*\*

### RESUMEN

Se investigó la producción de ácido giberélico mediante fermentación por lotes, utilizando el hongo *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616. Las fermentaciones se llevaron a cabo utilizando fermentadores de 1 litro de capacidad. El pH se estableció en 4 para todas las corridas y posteriormente se dejó libre y el flujo de aire se estableció en 1 L/min. El tiempo de fermentación fue de 144 horas. En un primer diseño experimental, un factorial  $2^3$ , se empleó la temperatura en los niveles de 28 y 33 °C, concentración de sustrato de 3 y 6% y tipo de sustrato: glucosa y melaza. Se encontró que las tres variables estudiadas son estadísticamente significativas y además se presenta una mayor producción de ácido giberélico cuando se trabajó con niveles altos de dichas variables. La producción promedio para este diseño fue de 463.2 mg/L. En un segundo diseño, un factorial  $2^2$ , se consideró la concentración del sustrato a los niveles 5 y 8% p/v y como sustrato sacarosa y glucosa. La temperatura se fijó en 33 °C, puesto que es inconveniente usar valores más altos. Se encontró que sólo la concentración de sustrato es significativa para los niveles estudiados y en el nivel superior se mejora la producción de ácido giberélico. La producción promedio fue de 453.9 mg/L.

### SUMMARY

A batch-fermentation study for the production of gibberellic acid was made using the fungus *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616. The fermentations were done in 1L fermentors. The pH value was established in 4 for all runs, letting it free afterwards and the air flow was established in 1 L/min. The fermentation time was 144 h.

A first experimental design, a factorial  $2^3$ , considered temperature in two levels, 28 and 33 °C. Substrate concentration also in two levels, 3 and 6%, and substrate type in two forms, glucose and molasses. It was found that the three variables studied were statistically significant and that a higher production level of gibberellic acid was obtained at the higher levels of the variables. The average production quantity for this design was 463.2 mg/L. A second design, a factorial  $2^2$ , considered substrate concentrations of 5 and 8% and substrate type sucrose and glucose. The temperature was fixed at 33 °C, because it is not convenient to raise it. In this design, it was found that the substrate concentration is significant for the two levels studied with a higher production at the higher level. The average production was 453.9 mg/L.

## I. INTRODUCCIÓN

Las giberelinas son sustancias involucradas en la regulación del crecimiento de la mayoría de las plantas superiores. En 1933, se aisló y cristalizó una sustancia química capaz de reproducir, en muy bajas dosis, los síntomas de una enfermedad del arroz causada por el hongo *Gibberella fujikuroi*, caracterizada por un alargamiento considerable del

vástago en plantas jóvenes del arroz; esta sustancia fue denominada *giberelina*. [1,2]. En 1942 Yabuta et al. Establecieron la naturaleza del esqueleto de carbono que constituye la giberelina.

Las giberelinas naturales se encuentran en tres formas químicas o estados, dos de los cuales están químicamente definidos y un tercero hipotético: Giberelinas libres, conjugadas y enlazadas. Existen en la actualidad más de 70 sustancias químicas clasificadas como giberelinas libres. Dentro de estas sustancias se encuentra el ácido giberélico, una de las más importantes.

\* Escuela de Ingeniería Química, U.C.R., E-mail : mmo-lina @perry.eiq.ucr.ac.cr

\*\* Firestone de Costa Rica, Fax:293-17-17.



Aunque los efectos de los reguladores sobre la división celular depende del grado de maduración de las plantas, éstos pueden ser divididos en: efectos inhibidores y efectos que estimulan el crecimiento. En cuanto a la división, crecimiento y diferenciación celular, las giberelinas bajo ciertas situaciones inhiben estos procesos, sin embargo, es más frecuente que los estimulen. Generalmente, el efecto de las giberelinas es más eficaz promoviendo la iniciación de la división celular que acelerando la división en células mitóticamente activas.

El modo de acción de las giberelinas no es aún bien comprendido, debido a que no existe una explicación satisfactoria de cómo, tan pequeñas cantidades de estas sustancias, puedan controlar numerosas y variadas respuestas morfogénicas, tales como germinación de semillas, división celular, alargamiento celular, iniciación de la floración, etc.[5,6]

Las plantas muestran muchas transformaciones bajo la acción de las giberelinas, algunas de éstas son de importancia agrícola:

- a. Promueven el fenómeno de dominancia apical, al generar zonas de inhibición del desarrollo de órganos vegetativos en las regiones próximas al ápice.
- b. Promueven la formación de plantas más altas que el promedio; al estimular el crecimiento de tallos, aunque en algunos casos, también promueven la formación de hojas más largas. Este fenómeno se debe principalmente al aumento en el número de divisiones celulares y tamaño de las células.
- c. Intervienen en la floración al modificar el efecto de condiciones críticas de temperatura y luz solar, frecuentemente necesaria para la floración en diferentes especies de plantas. Intervienen además en las respuestas a la fotoperiodicidad.
- d. Inducen la germinación de semillas al generar un aumento en los niveles de la enzima alfa-amilasa dentro de las mismas.
- e. Rompen el período de dormancia innata o adquirida que presentan algunas semillas, las cuales al ser tratadas con estas sustancias germinan en un tiempo mucho menor que el promedio.
- f. Promueven la partenocarpia o formación de frutos sin semillas en el caso de plantas como el tomate, algunos tipos de rosales y en algunos tipos de uvas.

Las giberelinas y específicamente el ácido giberélico tiene una gran demanda en el cultivo de tejidos vegetales, hortalizas, papas, tomate, flores, etc.

La producción del ácido giberélico hoy en día, se realiza mediante fermentación sumergida. Luego de la inoculación de un cultivo de microorganismos dentro de un medio nutritivo se presentan una serie de etapas durante el crecimiento. Inicialmente, hay un período en el que no se aprecia crecimiento alguno, este periodo se conoce como *fase de ajuste* o "fase lag" y puede ser considerada como un tiempo de adaptación. Posteriormente se presenta un período donde la velocidad de crecimiento se desarrolla a su máxima velocidad, este período es conocido como *fase exponencial*. Eventualmente, el crecimiento cesa gradualmente y se entra en la fase estacionaria. Por último, el número de células decrece y el cultivo entra en la *fase de muerte*.

Durante la *fase exponencial* del crecimiento celular los productos generados son esenciales para el crecimiento de la célula e incluyen sustancias como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Estos productos se conocen como *metabolitos primarios* y son producidos en la tropofase, la cual coincide con la *fase exponencial*. Durante la *fase estacionaria* algunos cultivos de microorganismos sintetizan compuestos que no son producidos en la tropofase, este tipo de compuestos son conocidos como productos secundarios del metabolismo y son producidos en la *idiofase*. Este tipo de metabolismo parece ser inducido por bajas velocidades de crecimiento.

Un proceso de fermentación es aquel en el cual se obtiene un producto metabólico mediante el cultivo de un microorganismo. Existen cuatro grupos de fermentaciones de interés comercial:

- Aquellas en la que se produce biomasa.
- Aquellas en la que se produce enzimas.
- Procesos donde se producen metabolitos.
- Procesos donde se añade un compuesto a una fermentación para que sea modificado.



En los procesos industriales de fermentación se distinguen seis etapas [9,10]:

- Formulación del medio de cultivo para los organismos durante el inóculo y el proceso fermentativo.
- Esterilización del medio, fermentadores y equipo auxiliar requerido.
- Producción de un cultivo activo y puro en la cantidad suficiente para inocular los recipientes de producción.
- Crecimiento de los organismos bajo las condiciones óptimas para la formación del producto.
- Extracción del producto y su posterior purificación.
- Disposición de los efluentes generados por el proceso.

El proceso de producción de giberelinas por fermentación puede ser llevado a cabo por diferentes métodos, tales como cultivo por lotes, cultivos continuos o cultivos por lotes con alimentación continua (feed-batch). El proceso por lotes es el que se ha utilizado con mejores resultados. [4,7].

Los cultivos por lotes son sistemas de cultivo cerrados, los cuales tienen una cantidad inicial y limitada de nutrientes. El cultivo, luego de inocularse pasa a través de las diferentes fases de crecimiento, excepto por la fase de ajuste, ya que esta fase se trata de evitar o minimizar. Esto se logra utilizando una cantidad adecuada de inóculo que se encuentra en la fase exponencial; usualmente, se utiliza un inóculo igual al 10% del volumen útil del fermentador.

Al ir creciendo el cultivo, se van consumiendo ciertos nutrientes esenciales presentes en el medio y además, se secretan ciertos productos autotóxicos, lo que hace que después de cierto tiempo la velocidad de crecimiento empiece a decrecer hasta detenerse por completo y puede decirse que se ha alcanzado la fase estacionaria, fase en la que se produce el ácido giberélico.

La disminución de la velocidad de crecimiento, debido al agotamiento del sustrato presente en el medio, puede ser descrito por la relación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la cantidad residual del sustrato limitante. Esto se muestra, mediante la expresión desarrollada por Monod en 1942:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} * S}{K_s + S} \quad (1)$$

donde:

$s$  = concentración residual de sustrato

$K_s$  = Constante de utilización de sustrato, numéricamente igual a la concentración de sustrato cuando es la mitad de  $\mu_{\max}$  y es una medida de la afinidad del organismo por ese sustrato.

El desarrollo en un medio de cultivo de los microorganismos, depende de una serie de factores:

- Disponibilidad de nutrientes necesarios.
- Oxígeno disponible para un adecuado desarrollo, cuando éste es aeróbico.
- Necesidad de cierto grado de humedad.
- Mantenimiento de la temperatura adecuada.
- Condiciones asépticas del medio.
- Prevención de la contaminación.

Cuando se realizan los procesos de fermentación a gran escala se utilizan fuentes de nutrientes de bajo costo. Estos deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Proporcionar la máxima producción de biomasa o producto de interés por gramo de sustrato utilizado.
- Permitir que la velocidad de formación de producto sea la mayor posible.
- Contener la menor cantidad de productos indeseados.
- Los sustratos usados deben ser de bajo costo, calidad consistente y presentar una alta disponibilidad durante el año.
- Causar los mínimos problemas en otros aspectos del proceso tales como aireación, agitación, extracción, purificación y tratamiento de desechos.

La selección del medio de cultivo influye en el diseño del bioreactor. Las giberelinas son obtenidas a partir de la filtración del medio de cultivo utilizado durante la fermentación. El caldo de fermentación es acidificado hasta pH igual a 2.5 y luego extraído con algún solvente orgánico, generalmente acetato de etilo. La fase de acetato de etilo, es posteriormente extraída con una solución de bicarbonato de sodio al 1% y a la fase acuosa se le ajusta el pH a 2.5 y se vuelve a extraer con

acetato de etilo. Este extracto es evaporado al vacío hasta obtener la mezcla que contiene las giberelinas o el ácido giberélico.

La separación de esta mezcla de giberelinas y otras sustancias, puede realizarse por cromatografía de columna o mediante procesos de diferentes extracciones a contracorriente.

Para completar la purificación del producto a nivel industrial, se recomienda utilizar un proceso de cromatografía de absorción, mediante una columna rellena con ácido salicílico y carbón activado. Este método se considera el más adecuado debido a que los extractos obtenidos del caldo de fermentación producido por el hongo *Gibberella fujikuroi*, contienen principalmente ácido giberélico y éste se encuentra en una concentración elevada respecto a otros posibles contaminantes.

Borrow et al (1955) reportaron una producción de 180 mg/L de ácido giberélico en una fermentación con *Fusarium moniliforme*, ATCC 917 empleando como fuente de carbono, glucosa a una concentración de 40 g/L y tartrato de amonio como fuente de nitrógeno (9.5 g/L). Los mismos autores empleando la misma cepa y nitrato de amonio obtuvieron 413 mg/L de ácido giberélico en 400 horas de fermentación. Kumar y Lonsane usando una cepa de *Gibberella fujikuroi* P-3 y el medio líquido de Czapek Dox lograron una producción de ácido giberélico entre 650 y 1000 mg/L manteniendo una temperatura de 28 °C y agitación a 200 rpm. En dichas pruebas los investigadores utilizaron un medio con 30% sacarosa y 3 g/L de nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

Podojil y Ricicova, estudiaron la influencia de las fuentes de nitrógeno sobre la producción de ácido giberélico. Encontraron que de los medios que contenían licor de maíz macerado, sólo se obtenía ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), mientras que con nitrógeno proveniente de harina de soya se obtenían mezclas de giberelinas.

## 2. EQUIPO Y METODOLOGÍA

### 2.1 Equipo

**Fermentadores:** Se utilizaron cuatro fermentadores de un litro de capacidad total. Cada uno de los cuales está equipado con:

- Frasco de fermentación de vidrio pyrex de 1000 mL de capacidad y un volumen efectivo de trabajo de 800 mL.
- Tapa de hule con cierre hermético a presión y con las correspondientes tuberías y conexiones para entrada y salida de aire, toma de muestras y colocación de termostato de calentamiento.
- Agitación magnética, con un controlador de velocidad.
- Sistema para control de temperatura, el cual consta de termostato para calentamiento y un serpentín para enfriamiento.

**Baño con agitación oscilante:** Equipado con un controlador de temperatura, en el cual se colocaron los inóculos.

**Microorganismo:** Para este trabajo se utilizó una cepa del hongo *Gibberella fujikuroi* (ATCC 12616).

**Medio de cultivo:** La composición de uno de los medios de cultivo utilizados se presenta en el cuadro 1. Los demás medios de cultivos empleados tienen la misma composición, variando solamente el tipo y la concentración de la fuente de carbono.

Cuadro 1. Medio de cultivo utilizado en el proceso de fermentación

Reactivo	Cantidad Agregada (g / L de medio)
GLUCOSA+	50.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.00
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.01
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.01
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.01
CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0.01
CACO <sub>3</sub>	0.01

+ Puede utilizarse una cantidad equivalente de cualquier otro sustrato para la preparación del medio.

### 2.2 Cultivo del microorganismo

Los inóculos a utilizar se preparan en "erlenmeyers" de 125 mL, a partir de cultivos en tubos inclinados con 6 días de crecimiento.



Para la preparación de los inóculos se utiliza siempre el medio de cultivo presentado en el cuadro 1, el cual tiene como fuente de carbono 5% p/v de glucosa. Los inóculos anteriores se dejan crecer durante 2.5 días en un baño agitado a una temperatura de 30 °C.

El día que se inicia cada corrida en los fermentadores, se procede a preparar el medio de cultivo con las proporciones indicadas en el cuadro 1. Se esterilizan los fermentadores, cargados con 700 mL de medio de cultivo en un autoclave que se mantiene a 121 °C durante 15 minutos.

Se espera que el medio de cultivo se enfríe a la temperatura de trabajo deseada, y se procede a inocular los fermentadores bajo condiciones asépticas, con los cultivos contenidos en los erlenmeyers previamente preparados. El inóculo siempre fue de 10% respecto al volumen del medio de cultivo.

Se realiza el montaje del sistema de fermentación.

Se inicia la corrida encendiendo el agitador magnético y la bomba de aire. El flujo de aire se regula a 1 L/min mediante un rotámetro y se le hace pasar a través de un filtro para evitar la contaminación. Se procede a ajustar el termostato para mantener la temperatura de trabajo en el valor deseado.

El proceso de fermentación continúa durante un período de 6 días, al final de los cuales se toma una muestra de 20 mL para su análisis posterior.

### 2.3 Análisis

**Azúcares totales:** La concentración de azúcares totales se obtuvo mediante análisis con HPLC, previamente calibrado con una solución de 0.48% de sacarosa, 0.28% de glucosa y 0.28% de fructuosa. Se realizó una dilución 1:10 de las muestras.

**Ácido Giberélico:** La determinación de ácido giberélico se realiza tomando 8 mL de medio de cultivo filtrado y se centrifuga para eliminar el micelio presente en la muestra. Se añade posteriormente 0.5 mL de acetato de zinc en solución

(21.8% p/v), y se agita por 3 minutos, después se agrega 0.5 mL de solución de ferrocianuro de potasio (0.69% p/v), y se centrifuga esta mezcla a 4000 rpm durante 15 minutos.

De la muestra centrifugada se toman 2 mL y se transfieren a un matraz de 50 mL. Se agrega 4 mL de alcohol absoluto y 44 mL de HCl al 9%. Se utiliza como blanco 4 mL de alcohol absoluto y se completa a 50 mL con HCl al 9%. Los matraces se incuban a temperatura ambiente durante 75 minutos, luego se lee la absorbancia a 254 nm. [10]

### 3. RESULTADOS

Se utilizó un diseño factorial  $2^3$  a dos niveles. Las variables y los niveles inferior y superior se indican en el cuadro 2. El diseño que involucra ocho corridas, se hizo en dos bloques al azar. En el primer bloque se hicieron las corridas 1, 2, 5 y 6, mientras que en segundo bloque se contemplaron las corridas 3, 4, 7 y 8. Se controló el procedimiento y análisis de las muestras de ambos bloques se controló para que fueran iguales, con la finalidad de minimizar el riesgo de que se presentaran diferencias entre bloques, lo que afectaría a la variable B (concentración de azúcares totales). Las corridas 1, 6 y 8 se repitieron para determinar la desviación estándar del diseño, además, estas repeticiones contribuyeron a corroborar los valores obtenidos para la variable respuesta.

En el cuadro 3, se muestran los efectos principales y las interacciones de las variables consideradas: A, B y C sobre la variable de respuesta (concentración de ácido giberélico). Estos efectos e interacciones son calculados por aplicación del algoritmo de Yates [3]. La desviación estándar de la variable de respuesta es de 51.8 mg/L. Mediante la T-student y considerando un nivel de significancia de 95%, se encuentra que las variables A, B y C, mostradas en el cuadro 3, son significativas estadísticamente dentro de los niveles estudiados. Ninguna de las interacciones resultó ser significativa.

Puesto que los efectos principales son positivos, esto significa que al pasar las variables A, B y C de su nivel inferior al superior, se produce una mayor concentración de ácido giberélico. Entonces es conveniente usar una temperatura de 33 °C

Cuadro 2. Producción de ácido giberélico en el primer diseño experimental

A) NIVELES UTILIZADOS		INFERIOR (-)	SUPERIOR (+)
Temperatura:	A, °C	28	33
Concentración de azúcares totales en el sustrato:	B, % (p/v)	3	6
Tipo de sustrato	C	melaza	glucosa

B) EXPERIMENTALES		RESULTADOS			CONCENTRACION ACIDO GIBERELICO $C_{GA3}$ (mg/L)
CONDICIONES		A	B		
CORRIDA SECUENCIA					
1	1	-	-	-	80.1
2	1	+	-	-	255.4
3	2	-	+	-	318.9
4	2	+	+	-	675.0
5	1	-	-	+	318.9
6	1	+	-	+	750.8
7	2	-	+	+	615.6
8	2	+	+	+	690.5
1+	3	-	-	-	75.1
6+	3	+	-	+	898.0
8+	3	+	+	+	793.0

C) RESULTADOS ESTADISTICOS	CONCENTRACION DE ACIDO GIBERELICO $C_{GA3}$ (mg/L)
Promedio; ( P )	463.2
Desviación estándar de la variable de respuesta, ( SY )	72.3
Desviación estándar de los efectos e interacciones; (Se )	51.1
Intervalo de significancia para un 95% de confianza	[ -162.5 , 162.5 ]

+ Estas corridas corresponden a las repeticiones realizadas para determinar la variabilidad de los experimentos.

Cuadro 3. Efectos de las variables y sus interacciones en el primer diseño experimental

Tipo de efecto o interacción	Concentración de ácido giberélico $C_{GA3}$ (mg/L)
A	259.5
B	223.7
AB	-44.1
C	261.6
AC	-6.2
BC	-105.2
ABC	-134.5



en lugar de 28 °C, una concentración de 6% y glucosa en lugar de melaza.

En un segundo diseño, se consideró analizar el tipo de sustrato (sacarosa y glucosa) y su concentración (5 y 8%); la temperatura se fijó en 33 °C.

En el cuadro 4, se presenta el segundo diseño (22), con sus niveles correspondientes. La variable de respuesta siempre es la concentración de ácido giberélico.

En el cuadro 5, se presentan los efectos e interacciones generadas por las variables de sustrato (A) y concentración (B). Para el análisis estadístico se consideró la desviación estándar obtenida en el primer diseño.

El estudio estadístico mostró que sólo la variable B es significativa, es decir que al pasar del nivel de 5% a 8% en la concentración, se produce una mayor concentración de ácido giberélico. El tipo de sustrato resultó no ser significativo, es decir, no hay diferencia entre usar sacarosa y glucosa, resultado congruente con lo obtenido por otros investigadores.

Haber encontrado que es mejor el nivel superior de la concentración, podría inducir a utilizar aún mayores concentraciones, sin embargo, debe tenerse cuidado ya que éste puede tener un efecto de inhibición, ésta es una de las razones por las que se utilizó la concentración del ácido giberélico como variable de respuesta en lugar de rendimiento.

Cuadro 4. Producción de ácido giberélico en el segundo diseño experimental

0A) NIVELES UTILIZADOS		INFERIOR ( - )	SUPERIOR ( + )
Tipo de sustrato:	A	sacarosa	glucosa
Concentración de azúcares	B; % ( p / v )	5	8

B) RESULTADOS EXPERIMENTALES				
Corrida	Secuencia	Condiciones		Concentración Acido giberélico $C_{GA3}$ ( mg / L )
		A	B	
1	1	-	-	364.3
2	1	+	-	415.0
3	1	-	+	509.6
4	1	+	+	526.6

Cuadro 5. Efectos de las variables y sus interacciones en el segundo diseño experimental

Tipo de efecto o interacción	Concentración de ácido giberélico $C_{GA3}$ ( mg / L )
A	33.8
B	128.4
AB	-16.8



#### 4. CONCLUSIONES

- a) Fijar inicialmente el pH en 4.5 y dejarlo libre posteriormente, no afecta el proceso de producción de ácido giberélico ya que éste se mantiene dentro del ámbito óptimo de crecimiento del microorganismo recomendado por la literatura.
- b) Bajo las condiciones estudiadas en este trabajo, se encontró que se logra una mayor producción de ácido giberélico cuando se utiliza glucosa; la melaza reduce la producción del ácido.
- c) Una concentración de 8% de azúcares totales, dió una mejor producción que utilizando una concentración de 5%.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Beaulieu, R. et al. *Reguladores de crecimiento*. Oikostau, S.A. Barcelona, España (1973).
- 2) Barrow et al. "Gibberellic acid, a metabolite product of the fungus *Gibberella fujikuroi*: some observations of its production and insolation". *J. Sci. Food Agric.* 6. pp. 340 (1955).
- 3) Box, G.E.P, Hunter, W.G. y Hunter, J.S. *Statistic for Experiments*. Wiley, Nueva York (1978).
- 4) Darken, M. et al. "Production of gibberellic acid by fermentation". *Appl. Microbiol.* 7, pp. 301-303, (1959).
- 5) Fondo de desarrollo productivo de Chile. *Obtención de Acido Giberélico por Fermentación*. Corporación de fomento de la producción. Santiago, Chile (1989).
- 6) Galston, A.W., Davies, P.J. *Control mechanisms in plant development*. Prentice Hall, Inc. Nueva Jersey, USA (1970).
- 7) Jefferys, E.G. *The Gibberellin fermentation*. Imperial Chemical industries Limited. Gran Bretaña (1969).
- 8) Murillo, G.A. *Estudio técnico para la producción de giberelinas mediante fermentación*. Tesis Lic. Ingeniería Química, UCR (1993).
- 9) Rainbow, R., Rose, A.H. *Biochemistry of Industrial Microorganisms*. The Whitefriars Press Limited, Londres, (1969).
- 10) Stanbury, P.F. y Whitaker, A. *Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Press. Gran Bretaña, (1984).

#### AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación por el financiamiento del proyecto 325-02-93 "Producción de metabolitos secundarios mediante fermentación". Al Instituto de Investigaciones de Ingeniería (INII) por su apoyo administrativo. Así mismo al Lic. Herberth Madrigal V. del Centro Tecnología de Alimentos por su cooperación en el análisis de las muestras.