

2ej
167



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Facultad de Ciencias

**PRODUCCION DE ACIDO GIBERELICO Y
SUS POSIBILIDADES DE USO EN MEXICO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a

Hilario Rivera Mújica



México, D. F.

1986



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.

CONTENIDO

PAGINA

RESUMEN

OBJETIVO

1. INTRODUCCION	1
1.0 Historia del Descubrimiento	
1.1 Caracterización del Acido Giberlético	
1.1.1 Producción Inicial del Acido Giberético	
1.1.2 Efectos del Acido Giberético	
1.1.3 Interacción con otras Hormonas de Crecimiento	
1.1.4 Descripción del Acido Giberético	
1.1.5 Biosíntesis del Acido Giberético	
1.2 Caracterización de <u>Gibberella fujikuroi</u>	
1.2.1 Posición taxonómica de <u>Gibberella fujikuroi</u>	
1.2.2 Medios de cultivo	
1.2.2.1 Fuente de Carbono	
1.2.2.2 Fuente de Nitrógeno	
1.2.2.3 Factores Físicos	
1.2.2.4 pH y Temperatura	
1.2.2.5 Cinética de Crecimiento	
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Microorganismos	11
2.2.1 Equipo	
2.2.3 Medios de Cultivo	
2.2.4 Extracción del Acido Giberético	
2.2.5 Determinación del Acido Giberético	
2.2.6 Cuantificación del Acido Giberético	
3. RESULTADOS	
3.1 Determinación del Espectro de Absorción	15
3.2 Curva Estándar	

- 3.3 Determinación de la Cinética de Crecimiento
- 3.4 Rendimiento de GA_3 obtenidos por Litro de Medio de Cultivo
- 3.5 Identificación del Acido Giberélico
- 3.6 Cuantificación de la Pureza de los Extractos Obtenidos

4. DISCUSION Y CONCLUSION	18
5. TABLAS Y FIGURAS	21
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
7. ANEXO	42

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la producción de Acido Giberélico (GA_3) a nivel laboratorio, vía fermentación de Gibberella fujikuroi, realizándose una serie de determinaciones que son importantes dentro del proceso de fermentación, como lo son: μ , t_d , X_o , X_t . Para evaluar estos parámetros se utilizó el método de Packing Mycelial Volume (PMV).

El crecimiento máximo fué determinado por la ecuación de Gompertz, realizándose una comparación de resultados con el método gráfico, utilizándose los datos experimentales de crecimiento.

Posteriormente, se procedió a elaborar un espectro de absorción para determinar la longitud de onda a la cual se determinó la curva estándar de GA_3 , además de cuantificar los extractos obtenidos de la fermentación por espectrofotometría UV; además se efectuó la identificación del GA_3 por cromatografía de gases y cromatografía en capa fina, así como una identificación visual, revelándose con UV de onda larga o corta.

Finalmente, se realizó un pequeño análisis de mercado, en el cual se observó las necesidades, volúmenes importados y los precios durante el período 1982-1983, dándose la posibilidad de ser usado en una gran variedad de cultivos de importación económica.

Concluyendo, las posibilidades de producción de GA_3 en el país son muy factibles, ya que los resultados así lo demuestran; aunque se tendría que trabajar un poco más en la optimización del medio de producción, para obtener rendimientos más altos, ya que los obtenidos aproximadamente correspondieron a 0.240 gr/lit. Por otra parte, se vislumbra un mercado nacional prominente (y posiblemente internacional). Eyoenzimas de México está trabajando en obtener un mercado internacional.

OBJETIVO

En México, el Acido Giberélico es un producto de importación, con diversas aplicaciones en agricultura, así como en la industria cervecera.

La producción industrial del Acido Giberélico (GA_3) en México, evitaría la fuga de divisas. El objetivo principal de este trabajo es el de evaluar la producción de GA_3 a nivel laboratorio a partir de la fermentación de Gibberella fujikuroi, por cultivo sumergido al evaluar pureza y rendimiento, lo que puede servir como base para su producción a nivel piloto y posteriormente a escala industrial.

ABREVIATURAS

- GA₃ - Acido Giberélico.
- AIA - Acido Indol Acético
- ABA - Acido Absícico
- X₀ - Biomasa Inicial
- X_t - Biomasa al Tiempo T
- T_d - Tiempo de Duplicación
- T - Tiempo
- μ - Velocidad Especifica de Crecimiento

I. INTRODUCCION

I.0. HISTORIA DEL DESCUBRIMIENTO

En la mayoría de los países, grandes productores de arroz, se registró una enfermedad debida al hongo Gibberella fujikuroi (Sawada), en estado conidial Fusarium moniliforme (Sheldon).

En su conjunto, los síntomas de la enfermedad son similares a los que presentan las plantas atacadas por Fusarium; el hongo penetra por las raíces y base del tallo, causando necrosis local al extenderse por los tejidos del hospedante. El sistema vascular se vuelve pardo, altera su funcionamiento y causa la muerte de las plántulas infectadas.

Se detectó que existía un síntoma temprano típico, denominado etiología del tallo y las hojas de algunas plántulas infectadas, que se alargaban con mayor rapidez en comparación con las plántulas sanas. Esta enfermedad a la que se le tomó gran interés en Japón y Formosa y se le conoció como "Bakanae". (Stodola, 1958; Darken, 1959; Brian, 1961).

El fitopatólogo japonés E. Kurasawa, hizo un importante descubrimiento, el cual consistió en obtener filtrados de cultivos puros de Gibberella fujikuroi, que producían alargamiento parcial de las plántulas de trigo, síntoma característico de la enfermedad. Parecía evidente, por tanto, que el causante del crecimiento era un producto metabólico del hongo (Brian, 1961).

En el Japón se descubrió que también otras especies de plantas de lechuga respondían al hongo de manera similar. (Brian, 1961.)

El principio activo se absorbe en carbón animal o vegetal y es soluble en solventes orgánicos. Posteriormente, se obtuvo una sustancia cristalina con rendimientos aproximados de 10 m. por litro de medio de cultivo, que al aplicarse a raíces de plántulas de lechuga en concentraciones de partes por millón,

estimulaba el crecimiento. A esta sustancia se le denominó Giberelina A. (Brian, 1961).

Posteriormente se incrementó el interés por los productos metabólicos de Gibberella fujikuroi, ya que se descubrió que también existen tres sustancias con actividad fisiológica similar: Giberelina A₁, A₇ y el Acido Giberélico. (Boroom, et al., 1955.)

I.I. CARACTERIZACION DEL ACIDO GIBERELICO

I.I.2. PRODUCCION INICIAL DEL ACIDO GIBERELICO

El método inicial de producción se basaba en el cultivo líquido de Gibberella fujikuroi. La composición del medio de cultivo, consistía en glucosa y sales, o glicerina, con sales y amoníaco como fuente de nitrógeno, e incubarse de 35-45 días a 25°C; el material activo se aislaba por adsorción en carbón y disolución en metanol-amoníaco, (Grove, 1963), para obtenerse rendimientos de 10 mg. por litro de medio de cultivo.

Este rendimiento se logró incrementar a 200 mg. por litro de fermentación, cuando un grupo inglés introdujo el sistema de agitación y recuperación con acetona. (Rainbow y Rose, 1963.)

I.I.3. EFECTOS DEL ACIDO GIBERELICO

Se ha determinado que el GA₃ afecta diversos procesos, como la inducción enzimática de transcripción de ADN. Los efectos variados dependen del tipo de planta, su estado de madurez y las condiciones ambientales. Brian, 1961.)

El efecto más común se da a nivel de crecimiento, por ejemplo, las plántulas de trigo tratadas con GA₃ aumentaron su altura hasta un 50%, acompañadas de un incremento en peso seco y húmedo. (Brian, 1961; Hill, 1977.)

La causa de este incremento parece ser el resultado secundario del aumento del área de las partes fotosintéticas. También induce floración temprana de

las plantas bianuales, que puede ser benéfico para la producción de semillas de ciertas cosechas. (Russell, 1973; Esashi, et al, 1977.)

El Acido Indol Acético también afecta a nivel de crecimiento. En algunos tejidos, si el AIA es aplicado antes que el GA_3 se producen pocos cambios, pero si el GA_3 se aplica primero, entonces este tiene un gran efecto. Esto sugiere que la acción del GA_3 tiene lugar en algún sitio donde precede la acción de las auxinas en una secuencia de reacción para estimular el crecimiento. (Esashi, et al, 1977.)

I.I.3. INTERACCION CON OTRAS HORMONAS DE CRECIMIENTO

Algunas sustancias promotoras de crecimiento antagonizan los efectos del Acido Abscísico, en algunos casos el GA_3 sobrepasa los efectos del ABA. La citinina contrarresta el efecto del ABA, permitiendo que éste estimule la germinación, lo cual se observa en la tabla I.

El letargo de semillas de lechuga es inducido por los días cortos, en los que el Acido Mevalónico se transforma en ABA, el rompimiento de este letargo es provocado por los días largos, en donde el mismo precursor (Acido Mevalónico) se transforma en GA_3 . En la Fig. I se observa la relación GA_3 -ABA con los días largos y cortos. Las citoquininas bloquean el efecto inhibitor y promueven la acción del GA_3 . (Bidwell, 1974.)

Bidwell (1974) indica que Khan realizó un trabajo para reconocer el control hormonal del letargo (latencia) de las semillas de lechuga empleando algunos compuestos como el GA_3 , citoquininas o inhibidores, incluyendo ABA. Encontró que las giberelinas son necesarias para la germinación y que la ausencia de GA_3 o la presencia de un inhibidor produce latencia.

Los resultados de la tabla II sugieren que la latencia está controlada principalmente por la falta de giberelinas.

El GA_3 también afecta a la floración de muchas plantas. Su empleo podría reemplazar o alterar la vernalización y el fotoperíodo. La giberelina natural induce

la floración en algunas plantas de días largos y días cortos, el GA₃ provoca floración en plantas de días largos y cortos, la vernalización parece ser un proceso complejo; en algunas plantas puede tener lugar en la semilla, en todos los tejidos o únicamente en el meristemo. (Bidwell, 1974.)

En el reporte de Bidwell (1974) se indica que Melcher propone la existencia de una sustancia hipotética relacionada con la vernalización. E. mismo autor indica que Lang demostró que la aplicación de las giberelinas puede reemplazar la vernalización. En plantas tratadas con GA₃, se induce la elongación del tallo así como la producción de brotes vegetativos que mas tarde florecerán.

Khyan (tomado de Bidwell, 1974), reporta que la vernalina se produce cuando hay bajas temperaturas y que en días largos es convertida a giberelina, ésta última junto con la antesina en plantas de días largos induce la floración. En días cortos la vernalina no es convertida a giberelina, ésta última junto con la antesina en plantas de días largos induce la floración. En días cortos la vernalina no es convertida a giberelina, y por lo tanto, no ocurre la floración. (Fig. 2.) Existe poca evidencia respecto a la antesina y la vernalina, sin embargo se ha comprobado que existe una sustancia de crecimiento que induce la floración, pero la relación en el proceso de vernalización es desconocido. (Bidwell, 1974.)

Existe la evidencia de que el GA₃ juega un papel importante como inductor de los genes responsables de la síntesis de la amilasa. (Cook, 1962.)

Por otra parte, las giberelinas se consideran importantes en los primeros pasos del proceso de germinación, ya que ayudan a la movilización y digestión de proteínas, grasas, almidón y otros carbohidratos. (Rainbow y Rose, 1963; Cook, 1962.)

I.I.4. DESCRIPCION DEL ACIDO GIBERELICO (Ortega, 1970)

Nombre químico: Lactona 1,4 del ácido 2,4,7, trihidroxi-metil-8 metileno-A3-giveno 1,10 dicarboxilico.

Nombre común: Acido Giberélico, Giberelina A3 ó GA₃.

Nombres comerciales: Berelex, Gibrel, Gibrelate, Gibresol, Acido Giberélico.

Apariencia: Sólido blanco cristalino.

Punto de fusión: 233-235°C.

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, hasta 5 g/lit. de agua.

Peso molecular: 346.37 g.

I.1.5. BIOSINTESIS DEL ACIDO GIBERELICO

El GA_3 y el ABA son terpenos compuestos por unidades de isoprenos derivados del Acido Mevalónico. El origen del diterpeno del GA_3 fué primeramente confirmado por un estudio en la incorporación de la molécula y el intermediario del Kaureno. El ácido 7B-hidroxicaurenico y el aldehído, han sido detectados en cultivos de Gibberella fujikuroi incorporados al GA_3 , puesto que el doble enlace no está involucrado en la pérdida del grupo 4-metil durante la formación de giberelinas de diecinueve átomos de carbono, se sugirió que el aldehído intermediario no sigue la oxidación tipo Baeyer-Villiger, para dar un formato, el cual es hidrolizado. La introducción del grupo 2-hidroxilo aparece con la retención de la configuración del proceso normal de hidroxilación microbiana. (Smith, y Berry, 1975.) En la Fig. 3 se puede observar con más detalle la ruta metabólica del GA_3 .

I.2. CARACTERIZACION DE GIBBERELLA FUJIKUROI

Gibberella fujikuroi pertenece a un hongo de la Familia Nectriaceae, la cual se caracteriza por incluir especies que producen su peritecio superficialmente, con un buen desarrollo del estroma o sin un buen desarrollo de éste. El desarrollo del ascocarpio comienza con ciertas hifas, o con la aparición de un ascogonio. Mientras algunas especies de esta familia son saprófitas sobre substratos vegetales, en el suelo y en estiércol. Gibberella fujikuroi es patógeno, encontrándose especialmente en arroz, causando la enfermedad conocida como "Bakanae".

Gibberella fujikuroi fué primeramente descrita como Lisea fujikuroi. Los rangos de los tamaños de las ascosporas son de aproximadamente de 10-20 x 4-7 contra 7-17 x 3.2-63.3 μ , pero son más pequeñas que el rango dado por Sawada para ascosporas de 12-24 x 6-9 μ , siendo también pequeños los peritecios. (Kuhlman, 1982; Alexopoulos y Mims, 1979.)

I.2.I. POSICION TAXONOMICA DE GIBBERELA FUJIKUROI (SAWADA)

Reino:	Mycetae
División:	Anastigomycota
Subdivisión:	Ascomycotina
Clase:	Ascomycetes
Subclase:	Hymenoascomycetes
Orden:	Hypocreales
Familia:	Nectriaceae
Género:	<u>Gibberella</u>
Especie:	<u>fujikuroi</u>

(Tomado de Alexopoulos y Mims, 1979.)

I.2.2. MEDIOS DE CULTIVO

I.2.2.I. FUENTE DE CARBONO

La nutrición de los microorganismos son muy diversas, por lo que es importante suministrar agua, fuente de carbono y energía, nitrógeno y elementos minerales, así como hidrógeno y oxígeno (Stanier, 1976). Los microorganismos satisfacen la mayor parte de sus necesidades de carbono, mediante la incorporación de metabolitos producidos en la degradación de sustancias orgánicas. Se usan principalmente, hexosas, pentosas, hidrocarburos, algunos utilizan metanol, glicerol, acetatos, propanol, butanol; otros microorganismos son más exigentes ya que requieren de aminoácidos como alanina, serina, treonina, prolina, etc. En resumen, podemos dividir las fuentes de carbono con base a su naturaleza bioquímica en siete grupos: (Stanier, 1976; Wang, et al. 1979.)

1. Carbohidratos y derivados de carbohidratos.
2. Compuestos nitrogenados.
3. Acidos dicarboxílicos.
4. Alcoholes primarios.
5. Acidos orgánicos.
6. Acidos grasos.
7. Aminoácidos.

I.2.2.2. FUENTE DE NITROGENO

Como en el caso anterior, existe una gran diversidad respecto a su utilización de las fuentes de nitrógeno. Muchos microorganismos pueden crecer usando nitrato, amoníaco y a veces nitrógeno gaseoso. Otros en cambio, necesitan que se les proporcionen estos elementos en forma de aminoácidos o como bases púricas y pirimídicas. Los microorganismos que requieran aminoácidos, posiblemente son incapaces de sintetizar grupos amino, o bien, no pueden producir determinados aminoácidos. La gran mayoría de los hongos utilizan una fuente de nitrógeno que sea fácilmente asimilable. Este material ha constituido un aditivo muy útil en la industria para conseguir crecimiento de microorganismos, o para aumentar los rendimientos de los productos buscados.

El agua de cocimiento de maíz, por ejemplo, constituye una fuente equilibrada de carbono, nitrógeno, azufre y sales minerales. Por último, los microorganismos, para llevar a cabo sus funciones estructurales o fisiológicas, necesitan de hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio, cobre zinc, molibdeno, cobalto y boro. (Iones constituyentes de enzimas.) (Stanier, 1976.)

Los medios de cultivo pueden ser, químicamente definidos o de tipo industrial; el primero es utilizado en investigación, requiere componentes de grado reactivo, que hace incosteable su empleo para procesos de fermentación a gran escala. Para realizar fermentaciones a nivel industrial es necesario contemplar costos, disponibilidad y normalización de los componentes del medio de

cultivo. Además de los nutrientes existen factores físicos importantes para el desarrollo apropiado del cultivo.

I.2.2.3. FACTORES FISICOS

En los cultivos aeróbicos, un adecuado crecimiento y formación de producto, depende de la eficiencia para proveer oxígeno, así como los sistemas de agitación y aereación es el suministro de oxígeno, aumentando la velocidad de transferencia de oxígeno, pudiéndose observar en la Fig. 4. Por otra parte, la agitación mantiene a los microorganismos en suspensión. Para el suministro de aire en los fermentadores a nivel planta piloto e industrial, se emplea un compresor, y la agitación generalmente es mecánica. En organismos unicelulares como bacterias, levaduras y hongos, el oxígeno aportado por cualquier reacción oxidativa dentro de la célula, es generalmente incorporado como oxígeno disuelto. En otras palabras, el organismo responde a la concentración de oxígeno, el cual puede considerarse como un nutriente análogo a glucosa, aminoácidos y sales orgánicas. (Stanier, 1976.)

La agitación tiene el papel adicional de romper las burbujas de aire, e incrementar el área de contacto. (Solomons, 1969.)

I.2.2.4. pH Y TEMPERATURA

Los cambios de pH afectan los sitios catalíticos y la conformación de la enzima, por lo tanto su actividad sobre rangos de pH es limitado, (Wang, et al. 1979) por ejemplo, la alfa amilasa, tiene su mejor porcentaje de actividad en un rango de pH entre 5 y 7.

Las reacciones enzimáticas, son similares a las reacciones químicas, que son influenciadas por la temperatura. Cuando la temperatura se incrementa, también lo hace la velocidad de la reacción. Por lo tanto, la velocidad de desnaturalización también se aumenta. Así que la temperatura óptima depende también del tiempo de velocidad de reacción. (Ver Fig. 5.)

I.2.2.5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

El crecimiento microbiano es caracterizado por el tiempo requerido para duplicar su masa o el número celular. Si el intervalo entre la duplicación de la masa o el número de células es constante, el microorganismo crece a una velocidad exponencial, bajo estas condiciones, la cinética del crecimiento que da comprendida en las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dX}{dT} = \mu X \quad (1)$$

$$\frac{dN}{dT} = \mu N \quad (2)$$

Donde:

X = Concentración celular en g/lit.

N = Concentración celular en células/lit.

T = Tiempo dado en Hrs., min. días.

μ = Velocidad específica de crecimiento, células/hrs⁻¹ (Wang, 1975).

En el caso (1) se describe el crecimiento en relación a la masa celular con respecto al tiempo. La ecuación (2) representa el incremento en el número de células con respecto al tiempo. Bajo cualquier circunstancia, el crecimiento se determina en la masa. La integración de la ecuación (1) es dada por:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_{T_0}^T \mu dT \quad (3)$$

Si la velocidad específica de crecimiento es constante; se produce la ecuación (4):

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_{T_0}^T \mu dT \quad (4)$$

de donde:

$$\ln X \int_{X_0}^X = \lambda T \quad (5)$$

Entonces: $\ln X - \ln X_0 = \lambda T$ (6)

Esta ecuación puede tomar la forma:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \lambda T \quad (7)$$

De la ecuación (7) se puede derivar la ecuación (8), para el caso en el que T_d , esto es, el tiempo requerido para que X se duplique $2X$, entonces tenemos que:

$$T_d = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (8)$$

(Wang, et al. 1979)

2.0 MATERIALES Y METODOS

2.1. MICROORGANISMO

Se utilizó la cepa Gibberella fujikuroi número de catálogo I26I6 de American Type Culture Collection (ATCC), proporcionada por el Departamento de Biotecnología del Centro de Estudios Avanzados del I.P.N. El hongo fué incubado a 26°C y conservado en slant (medio inclinado en tubos de cultivo) entre 5 a 7°C, conteniendo papa-dextrosa-agar (PDA), a pH de 7.0.

2.2.I. EQUIPO

La cuantificación del GA₃ se efectuó en un espectrofotómetro Baush & Lomb, modelo Spectronic 2I, con banda espectral de 10 mμ.

Para la determinación cromatográfica, se usaron placas de silica gel G60 Kniezelgier, además de un cromatógrafo HP 5880.

La estimación de biomasa (paquete micelial) se determinó usando una centrifuga clínica Solvat.

Para la agitación se emplearon agitadores magnéticos Corning modelo PC. 353.

Las inoculaciones, tomas de muestras y otras manipulaciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar horizontal Veco, modelo GHAFI, para evitar contaminaciones.

La extracción del GA₃, se realizó primeramente por la separación de micelio por filtración a vacío. Posteriormente, el extracto se lavó con acetono y se adicionó acetato de etilo para su extracción final, se concentró en un rotavapor.

La curva estándar del GA₃ se efectuó en el espectrofotómetro antes mencionado, realizándose tres repeticiones.

Para la identificación del GA₃ se utilizó una lámpara de luz ultravioleta (UV), Mineralight UVSL-25.

El pH del medio de cultivo fué determinado antes y después de esterilizar con un potenciómetro Corning modelo pH 5.

Los reactivos usados fueron tipo reactivo analítico, excepto en el caso del ácido sulfúrico y del alcohol etílico, los cuales fueron grado suprapuro, para eliminar impurezas que pudieran interferir con las lecturas.

Se utilizó carbón activado industrial, Actibon A-6I, así como GA₃ grado reactivo, ICN Pharmaceuticals, INC.

2.2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Para la propagación y mantenimiento, se utilizó medio Bioxon Papa-Dextrosa-Agar (FDA), a un pH de 7.0, en tubos de cultivo con rosca en posición inclinada, a una temperatura de 26°C durante ocho días. Posteriormente fueron almacenados en los mismos recipientes entre 5° a 7°C.

La composición del medio fermentativo utilizado, recomendado por Rainbow y Rose (1963), es la siguiente:

COMPONENTES	CANTIDAD (g/lt)
C ₆ H ₁₂ O ₆	10.00
K ₂ HPO ₄	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
(NH) ₂ SO ₄	0.20
Agua destilada	1000.00 ml

El pH fué ajustado a 4.20 antes de esterilizar. Después de esterilizar a 121°C, a una presión de 1.10 Kg/cm² durante 20 minutos.

Se prepararon ocho matraces de 2000 ml., con 1000 ml. de medio líquido, los matraces se inocularon bajo condiciones estériles con una suspensión de 10 ml. de Gibberella fujikuroi, para esto se utilizaron agua destilada y jeringa desechable estéril. Inoculados los medios se mantuvieron con agitación constante; a temperatura ambiente (aproximadamente 20° a 25°C) durante 13 días (312 hrs.).

Se evaluó la cinética de crecimiento por medio de la cuantificación periódica de la biomasa del cultivo. La cuantificación de biomasa fué realizada en forma indirecta mediante la técnica de "Paquete Micelial" (PMV) descrita en Romero, (1981). El método consiste en medir el volumen de micelio sedimentado después de centrifugar a 5000 rpm durante 20 minutos, expresándose en % del volumen total de micelio utilizado, con la cual la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) se obtienen.

2.2.4. EXTRACCION DEL ACIDO GIBERELICO

Se utilizó el método desarrollado por Kurawasa descrito en el trabajo de Ortega, (1970), las recomendaciones de implementación en el método de extracción, para no obtener extractos que no correspondan al GA_3 . El medio de cultivo se separó por filtración a vacío, el filtrado se agitó durante una hora con carbón activado con 100.00 ml. de acetona, agitándose por 20 minutos, la cual, a continuación se evapora con la ayuda del rotavapor (hasta este paso es el método convencional dado por Kurawasa). El residuo se acidifica a pH 3.0, con HCL al 50%, posteriormente se extrajo con volumen igual de acetato de etilo (1:1), separándose las fases, concentrándose la fase orgánica en el rotavapor (Ortega, 1970).

2.2.5. DETERMINACION DEL ACIDO GIBERELICO

La determinación del GA_3 se llevó a cabo por comparación visual, por cromatografía de gases y en placa fina.

Para el primer caso, se siguió la técnica propuesta por Stahal, (1969); para la cual, a 1.0 ml. del concentrado se adicionó 1.0 ml. de H_2SO_4 -etanólico al 95%, se agitó vigorosamente, comparando la fluorescencia (producida por el complejo $GA_3-H_2SO_4$ -etanólico), con el producido por el estándar de GA_3 , sometido al proceso antes mencionado, expuesto a luz ultravioleta.

Para determinar la pureza de los extractos se llevaron a cabo análisis en cromatografía de gases, en detector de ionización de flama.

Para la cromatografía en placa fina se utilizó sílica gel GH, y como solvente una mezcla de benceno: alcohol butílico: ácido acético en una proporción 75:25:5 V/V, técnica propuesta por Stahal, (1969), y Horgan, (1968). Se efectuó el corrimiento del extracto y del GA₃ estándar (aproximadamente una hora), se espió H₂SO₄-etanólico al 95%, revelándose con luz ultravioleta para medir el rF (coeficiente de corrimiento) de ambos y verificar la presencia del GA₃.

2.2.6. CUANTIFICACION DEL ACIDO GIBERELICO

Se elaboró una solución estándar en H₂SO₄-etanólico de GA₃ a una concentración de 10⁻³ M, con la que se realizó un espectro de absorción.

Se determinó la longitud de onda a la cual se efectuaron las lecturas del GA₃ estándar y para la cuantificación de los extractos. En la elaboración de la curva estándar se prepararon las siguientes concentraciones de GA₃ estándar: 2 X 10⁻², 3 X 10⁻², 4 X 10⁻², 5 X 10⁻², 6 X 10⁻², 7 X 10⁻², 8 X 10⁻², 9 X 10⁻² M.

3.0 RESULTADOS

3.3.1. DETERMINACION DEL ESPECTRO DE ABSORCION

En la tabla III se presentan los resultados de absorción obtenidos, se encuentran valores altos en una longitud de onda de aproximadamente 275 nm, formándose un pico, en donde absorbe mayor cantidad de luz, por lo que, las determinaciones posteriores se realizaron a esa longitud de onda. Estos resultados se visualizan fácilmente en la Fig. 6.

3.3.2. CURVA ESTANDAR

En la tabla IV, se muestran los resultados de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones usadas en la determinación de la curva estándar, con los resultados obtenidos del experimento y sus repeticiones, se realizó un ajuste por mínimos cuadrados, encontrándose que la recta que describe el comportamiento está dado por la ecuación; $Y=0.0135 X - 0.000285$, con un coeficiente de correlación de 0.99, en la Fig. 7, se muestra gráficamente el comportamiento lineal de los datos obtenidos. (Sokal, 1969.)

3.3.3. DETERMINACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO

Para calcular la cinética de crecimiento, se usaron las ecuaciones 7 y 8 descritas en introducción, muestreándose cada 24 hrs.

En la tabla V, se muestran los resultados obtenidos, en la cual se ve que el porcentaje de volumen sedimentado de micelio, alcanza la fase estacionaria a los 10 días aprox. (238 hrs.). En la Fig. 8 se graficaron estos resultados y se marcan las fases de crecimiento que corresponden a la fase lag con duración aprox. de 1 día (24 hrs.), la fase exponencial con duración aprox. de 10 días (240 hrs.), y por último la fase estacionaria con una duración aproximada de 3 días (72 hrs.).

Empleando la ecuación 7 (ver metodología) se calculó la velocidad específica de crecimiento que fue de 0.0125 hrs.⁻¹, y el tiempo de duplicación correspondió a 55 hrs.

Con la ecuación de Gompertz (programa contenido en una calculadora HP 41 CV), los valores teóricos para estimar el tiempo necesario para alcanzar el máximo de crecimiento fué del 5% del total del volumen sedimentado. En los valores teóricos, no existe mucha diferencia con los valores experimentales obtenidos (ver tabla VI). A continuación se presenta la ecuación de Gompertz.

$$U = ca^{bx}$$

Donde:

$$a = 0.0007$$

$$b = 0.5790$$

$$c = 5.51155$$

3.3.4. RENDIMIENTOS DE GA₃ OBTENIDOS POR LITRO DE MEDIO CULTIVO

En lo que respecta a las lecturas obtenidas (absorbancia) de los extractos (ver tabla VII), los rendimientos son bajos aproximados a:

$$Y = (0.0135) X + 0.000285$$

$$Y = 0.24 \text{ g/lit.}$$

3.3.5. IDENTIFICACION DEL ACIDO GIBERELICO

En los resultados obtenidos del análisis visual se encontró que todos los extractos obtenidos presentaron fluorescencia similar al de la muestra estándar del GA₃.

La cromatografía en placa fina registrada, mostró un corrimiento de 8.5 cm., de la mancha de la muestra del GA₃, así como de los diferentes extractos, este valor corresponde a un rF de 0.56 similar al del estándar (Stahal, 1969), tomando en cuenta que la distancia de recorrido del solvente fué de 15.0 cm., y calculado en función de la ecuación:

$$rF = \frac{\text{Distancia recorrida de la sustancia problema}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

$$rF = \frac{8.50 \text{ cm.}}{15 \text{ cm.}} = 0.56$$

3.3.6. CUANTIFICACION DE LA PUREZA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

La cuantificación se efectuó por cromatografía de gases, mostrándose en el cromatograma No. 1, pudiéndose observar un tiempo de retención de 0.26, correspondiendo una pureza del 99.9% del GA_3 estándar. En el cromatograma No. 2, se observa un tiempo de retención de 0.24, el cual corresponde a una pureza del 99.70%, del GA_3 obtenido de los extractos.

Los análisis cromatográficos se repitieron 3 meses después, para observar estabilidad de los extractos obtenidos, bajo condiciones acuosas.

En el cromatógrafo se inyectó un estándar fresco de GA_3 , el cual corresponde al cromatograma No. 3, en el cromatograma No. 4, corresponde a una muestra de un estándar preparado con tres meses de anticipación, y el cromatograma No. 5, corresponde a un extracto que tiene el mismo tiempo de tres meses. En el cromatograma No. 3, la pureza fué de 80.40%; en el cromatograma No. 4, la pureza correspondió a 38.83% y finalmente en el cromatograma No. 5, la pureza correspondió a un 96.20%. (Ver cromatogramas, pág. 38).

En la tabla VIII, se puede observar con más detalle los resultados obtenidos de los análisis cromatográficos.

4.0 DISCUSION Y CONCLUSION

Los resultados de absorbancia obtenidos muestran un comportamiento de absorción máxima de 275 m μ , similar al reportado por Kavanagh y Ksezel, (1958), por lo que todas las lecturas realizadas en el espectrofotómetro fueron a esa longitud de onda. La relación obtenida que nos describe el comportamiento de la curva estándar está dada por:

$$Y = (0.013) X + 0.000285$$

Lo que indica que al aumentar la concentración de GA₃, se incrementó la absorbancia, en forma directamente proporcional.

Los rendimientos obtenidos fueron de 0.24 g/lt que son rendimientos bajos; para que realmente pueda ser costeable económicamente el proceso, se necesita que se produzca alrededor de 1.0 g/lt.

Probablemente los rendimientos obtenidos fueron bajos, ya que las condiciones de crecimiento fueron incompletas, llevándose la fermentación en un matraz, y no en un fermentador, en la cual parámetros como agitación, sistemas de regulación de pH y temperatura, y un buen sistema de aireación (ver introducción, sección factores físicos), intervienen mejorando los procesos de crecimiento microbiano, por lo que el uso de un fermentador sería de gran ayuda para controlar al máximo estos parámetros.

La fermentación fué interrumpida a las 312 hrs., en donde se tiene la fase estacionaria, ya que la formación de GA₃ está asociada con ésta, y no con la fase de crecimiento exponencial, ya que la mayoría de los metabolitos secundarios están asociados con la fase estacionaria, (Wang, et al. 1979; Atkinson, 1974).

Por otro lado el volumen del medio de producción para el GA₃, fué poco y al realizar el proceso de extracción repercute en los rendimientos.

Con lo que respecta a los métodos cromatográficos, usados para la identificación del GA_3 , mostraron ser satisfactorios, ya que los resultados obtenidos son similares a los reportados por Stahal (1969), y al realizar la cromatografía de gases, pudimos obtener, por una parte, la verificación de que los extractos obtenidos correspondieron al GA_3 , en base a los tiempos de retención, siendo similares tanto en el estándar como en los concentrados obtenidos y finalmente pudimos determinar la pureza de los extractos obtenidos, siendo ésta arriba de 90%, ligeramente superior al del estándar usado.

A continuación se da un diagrama de proceso (Fig. 9), en el cual se propone la secuencia a seguir para la producción de GA_3 , teniendo en cuenta que se requiere un trabajo interdisciplinario con Ingenieros Químicos, contribuyendo en:

- a) Diseño de Equipo
- b) Instalación del mismo
- c) Evaluación del Proyecto
- d) Elaboración de un Manual de Operación

En el diagrama de proceso se puede observar tanques de almacenamiento para preparación de medio de cultivo "semillero" y fermentador de producción, además se cuenta con tanques de almacenamiento de ácido, base y antiespumante; el proceso continúa con la separación del GA_3 , en donde se usa un filtro rotatorio para separar micelio, un tanque mezclador, dos tanques de almacenamiento de solventes y un evapocristalizador. (Kirk, et al., 1966; Demain y Piret, 1981).

Por otra parte se realizó un estudio somero del mercado en el país, encontrándose que el GA_3 es de importación, principalmente de Inglaterra (ICI), y los Estados Unidos (Abbott).

Los volúmenes de importación fluctuaron bastante, desde el año de 1980, por problemas relacionados con la devaluación del peso y por la pérdida de crédito.

En el año de 1980, se importó una cantidad de aproximadamente 2000 kg. En el año de 1982, únicamente se importó 602 Kg., y en el año de 1983, la importación fué de 495 Kg.

En el año de 1983, en el mercado de estimulantes de crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas) hubo una captación de \$115,000,000.00, de los cuales \$21,000,000.00 correspondieron a las ventas de GA₃. En la tabla IX se puede observar con más detalle el precio del GA₃ de 1982 a 83.

Por esta razón se pensó en desarrollar la tecnología para la producción de GA₃ en México y así lograr que este producto sea más accesible, en especial para los agricultores.

En México existen tres compañías que venden GA₃; Bioenzimas de México, S.A. de C.V., tiene a la venta un producto formulado a base de Citoquininas, Auxinas y Giberelinas; teniendo presentación líquida y sólida, con nombre comercial de Biosyme. Unión Carbide, S.A. de C.V., tiene a la venta un producto formulado, en base a los mismos promotores de crecimiento. Por último, Pfiizer, S.A. de C.V., tiene un producto sin formular.

Se dan algunas aplicaciones de los productos antes mencionados, principalmente se aplican en la agricultura, en cultivos tales como: soya, frijol y maíz. (En el anexo I se da con más detalle las aplicaciones en la agricultura.)

Por otra parte el GA₃ se aplica en la industria cervecera, como aditivo en la operación de germinación de la cebada. La Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, permite el uso de este producto, bajo condiciones en las cuales los residuos de GA₃ no sobrepasen 2 ppm. Actualmente en México, la industria cervecera y maltera consume 80-100 kg. anuales de este producto. (Cook, 1962., Ortega 1970., Bioenzimas de México, S.A. de C.V., 1983.)

Concluyendo, la factibilidad de producir GA₃ en México, es buena, ya que se estima que el mercado nacional se incrementa en un 25% en 1985, así como el precio por Kg.

5. TABLAS Y FIGURAS

Tabla I.- Efectos del ABA y Cinetina sobre el GA₃ en la estimulación de la germinación de semillas de lechuga almacenadas en la oscuridad (Bidwell, 1974).

Concentración de GA ₃ (mM)	Porcentajes de germinación.			
	Ninguna adición	Cinetina 0.05 mM	ABA 0.04 mM	ABA y Cinetina
0.0	10.00	15.00	0.00	0.00
0.05	21.00	27.00	0.00	17.00
0.50	66.00	69.00	0.00	57.00
5.00	95.00	97.00	0.00	73.00

Tabla II.- Mecanismo hormonal de latencia y germinación de semillas de lechuga (Bidwell, 1974).

Giberelinas	Citoquininas	Inhibidor	Resultado
+	-	-	Germinación
+	+	-	Germinación
+	+	+	Germinación
+	-	+	Latencia
-	-	-	Latencia
-	+	-	Latencia
-	+	+	Latencia

Tabla III.- Resultados obtenidos del barrido del espectro de absorción de GA_3 , mostrando la relación entre la longitud de onda y las absorbancias promedio de tres repeticiones.

Longitud de onda	Absorbancia	Longitud de Onda	Absorbancia
245	0.500	310	0.307
250	0.500	315	0.293
255	0.516	320	0.278
260	0.546	325	0.263
265	0.580	330	0.249
270	0.603	335	0.242
275	0.680	340	0.238
280	0.586	345	0.241
285	0.517	350	0.250
290	0.434	355	0.265
295	0.380	360	0.286
300	0.341	365	0.308
305	0.323	370	0.335

Tabla IV.- Resultados de absorbancia obtenidos de las diferentes concentraciones de GA_3 para la determinación de la curva estándar.

Concentración de GA_3 (M)	Absorbancia ₁	Absorbancia ₂	Absorbancia ₃
2×10^{-2}	0.152	0.151	0.150
3×10^{-2}	0.221	0.223	0.223
4×10^{-2}	0.310	0.315	0.315
5×10^{-2}	0.382	0.380	0.381
6×10^{-2}	0.460	0.462	0.462
7×10^{-2}	0.530	0.531	0.531
8×10^{-2}	0.601	0.601	0.603
9×10^{-2}	0.701	0.690	0.690

Tabla V.- Cinética de crecimiento de Gibberella fujokuroi.

Tiempo (días)	Tiempo (hrs.)	volimen de micelio sedimentado.
0	0	0.10
1	24	0.10
2	48	0.50
3	72	1.00
4	96	2.00
5	120	3.00
6	144	4.00
7	168	4.50
8	192	4.70
9	216	4.90
10	238	5.00
11	264	5.00
12	288	5.00
13	312	4.40

Tabla VI.- Valores teóricos del crecimiento de Gibberella fujikuroi,
obtenidos de la ecuación de Gompertz.

Tiempo (días)	Tiempo (hrs.)	Volumen de micelio sedimentado.
0	0	0
1	24	0
2	48	0.40
3	72	0.90
4	96	1.90
5	120	2.90
6	144	3.90
7	168	4.40
8	192	4.60
9	216	4.80
10	236	4.90
11	264	4.90
12	288	4.90

Tabla VII.- Resultados obtenidos, en la cual se muestra la relación de los extractos concentrados, con sus respectivas absorbancias.

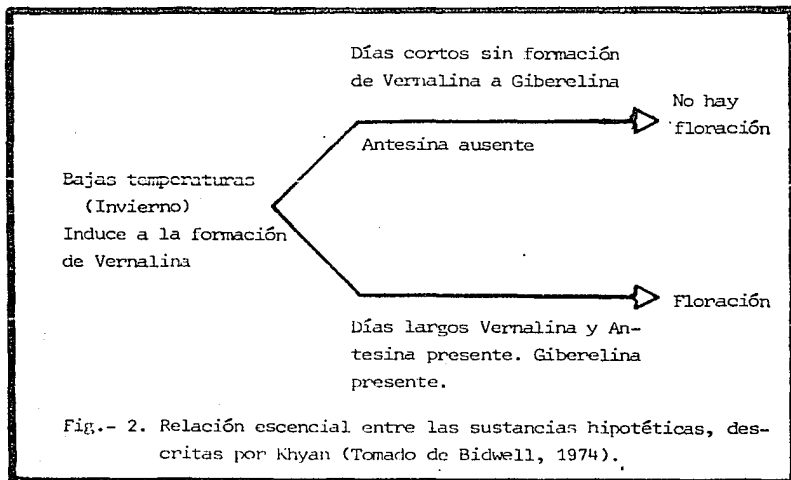
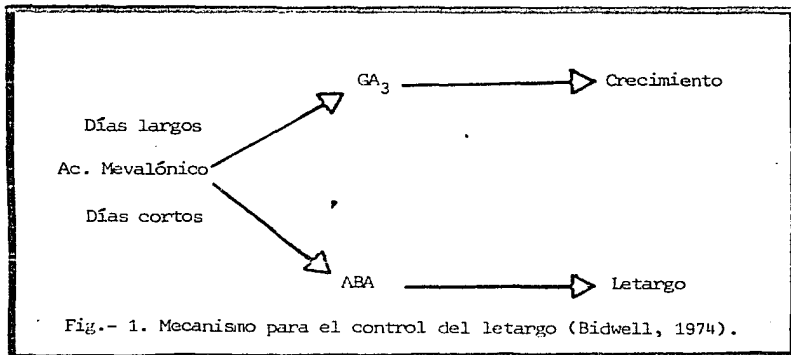
Extracto	Absorbancias obtenidas
1	0.092
2	0.092
3	0.092
4	0.093
5	0.092

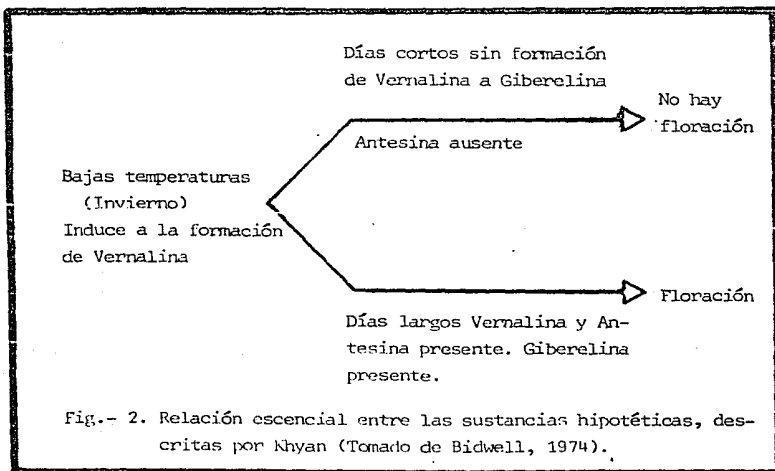
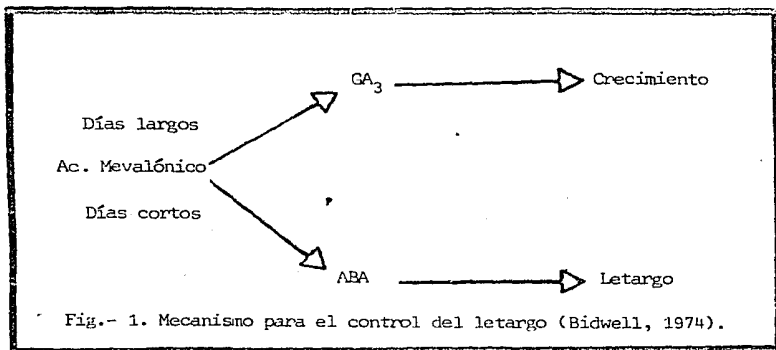
Tabla VIII.- Resultados de los cromatogramas obtenidos.

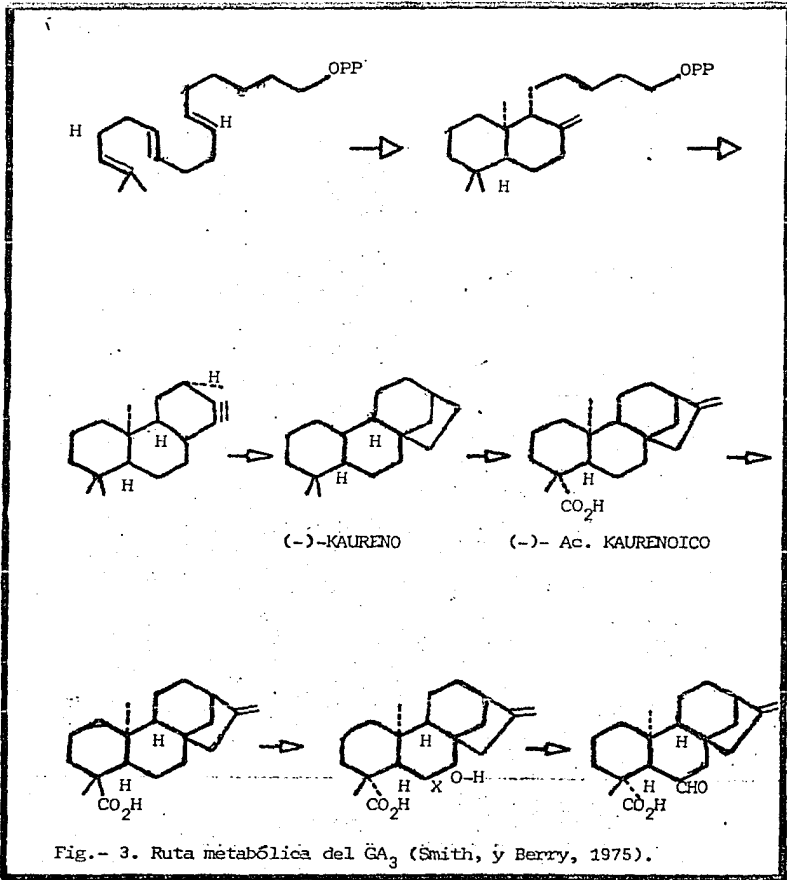
Origen	No. de cromatograma	Tiempo de retención	% de pureza
Estándar	1	0.26	99.90
Extracto obtenido	2	0.24	99.70
Estándar fresco	3	0.32	80.40
Estándar con tres meses de preparación	4	0.37	38.83
Extracto con tres meses de preparación	5	0.33	96.20

Tabla IX.- Resultados obtenidos de la evaluación de mercado de 1982 a 1983, en donde se muestra la variación de precios.

Mes	Año	Precio por Kg. en pesos
Enero	1982	26,000.00
Febrero	1982	29,000.00
Abril	1982	35,000.00
Julio	1982	53,000.00
Diciembre	1982	70,000.00
Enero	1983	100,000.00
Junio	1983	150,000.00
Diciembre	1983	170,000.00







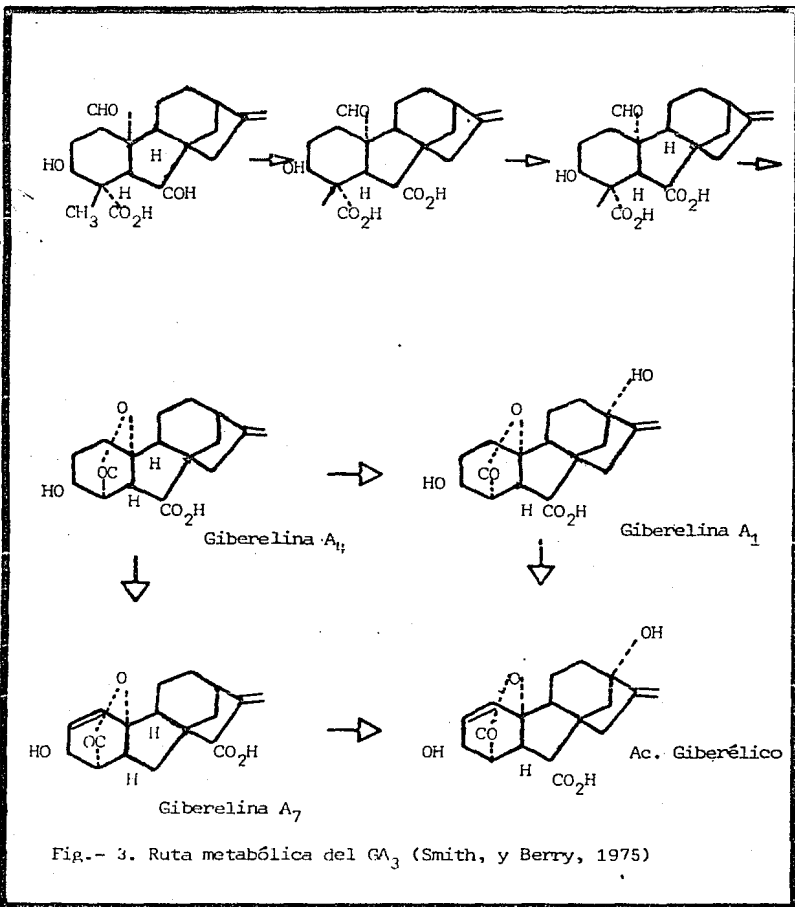


Fig.- 3. Ruta metabólica del GA₃ (Smith, y Berry, 1975)

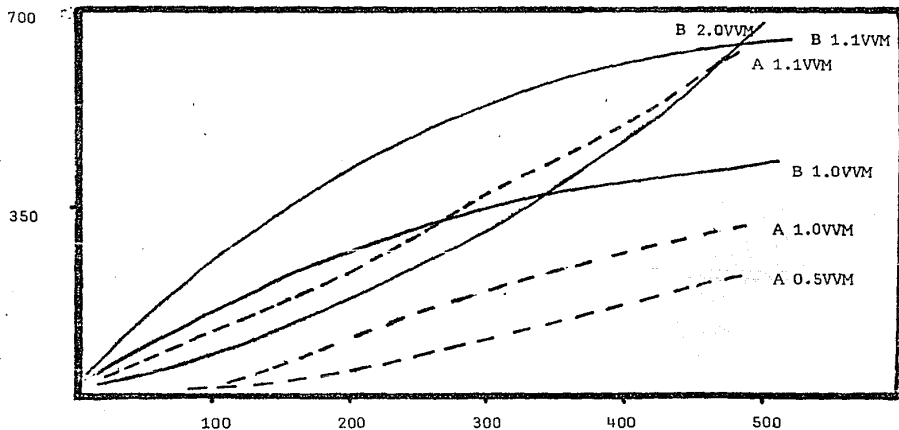


Fig.- 4. Velocidad de transferencia de oxígeno, en la producción de proteína unicelular en el crecimiento de *Candida utilis*. Así como la velocidad de oxidación por sulfito (New Brunswick Scientific Co. Inc. New Jersey).

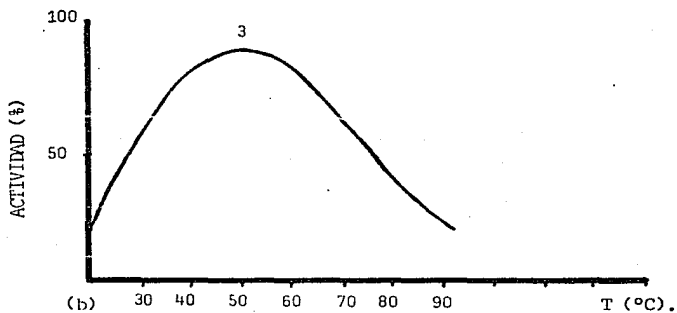
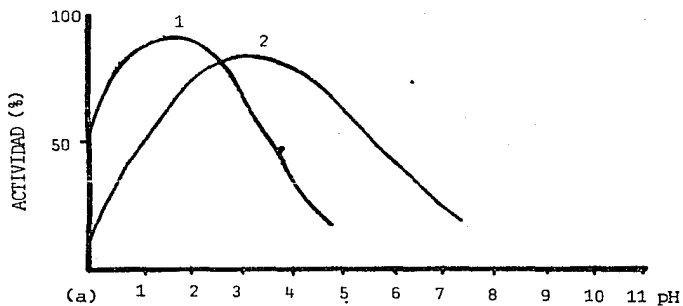


Fig.-5. Actividad enzimática en relación al pH (a) y a la temperatura (b). (1) Invertasa de levadura, (2) alfa amilasa, de *Bacillus* sp., (3) aminoaciclase de *Aspergillus oryzae*.

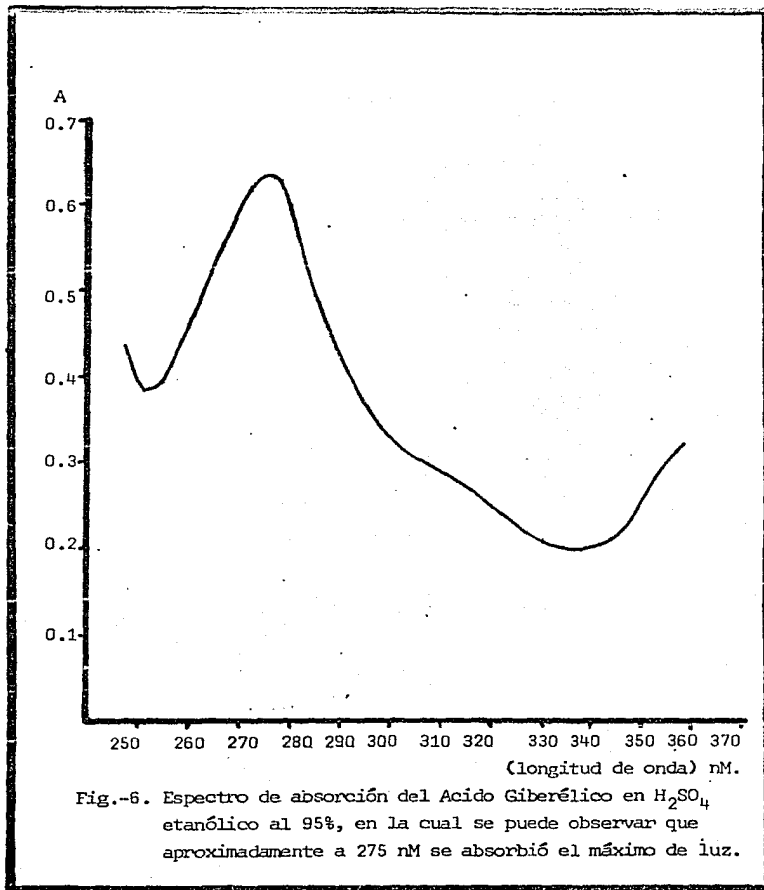


Fig.-6. Espectro de absorción del Acido Giberélico en H_2SO_4 etanólico al 95%, en la cual se puede observar que aproximadamente a 275 nM se absorbió el máximo de luz.

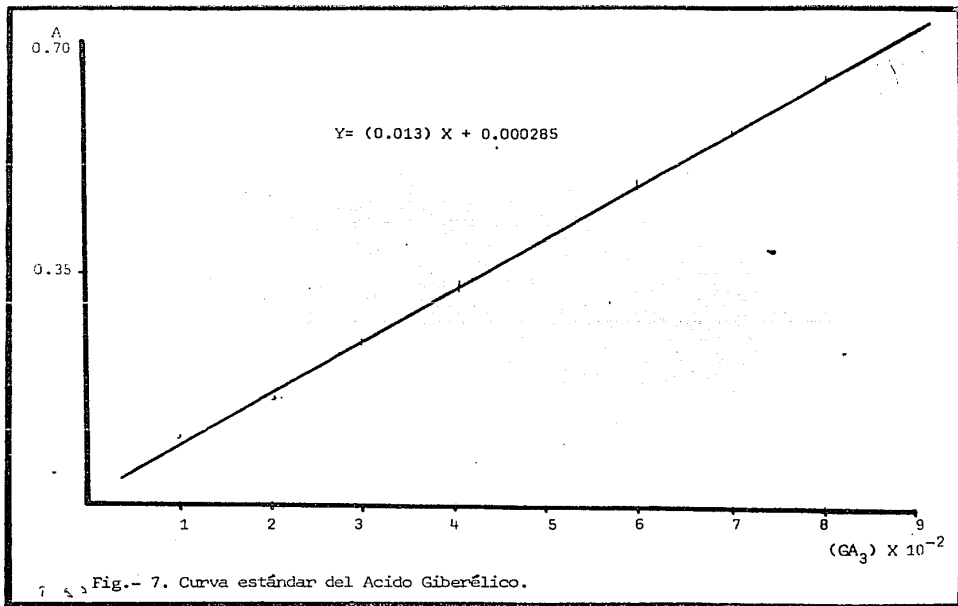


Fig.- 7. Curva estándar del Acido Giberélico.

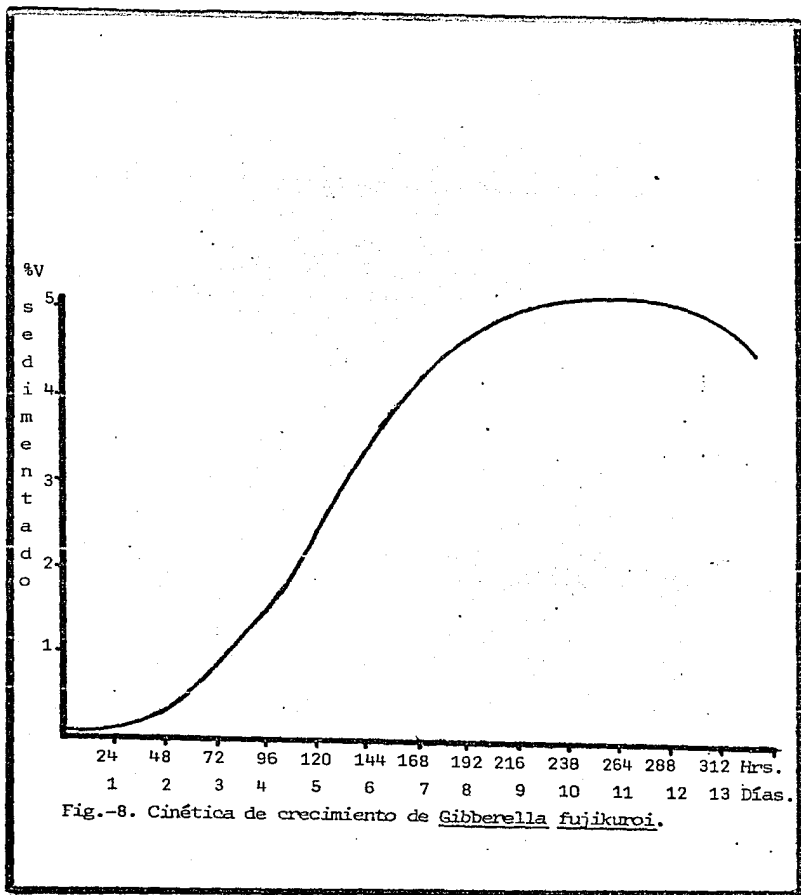
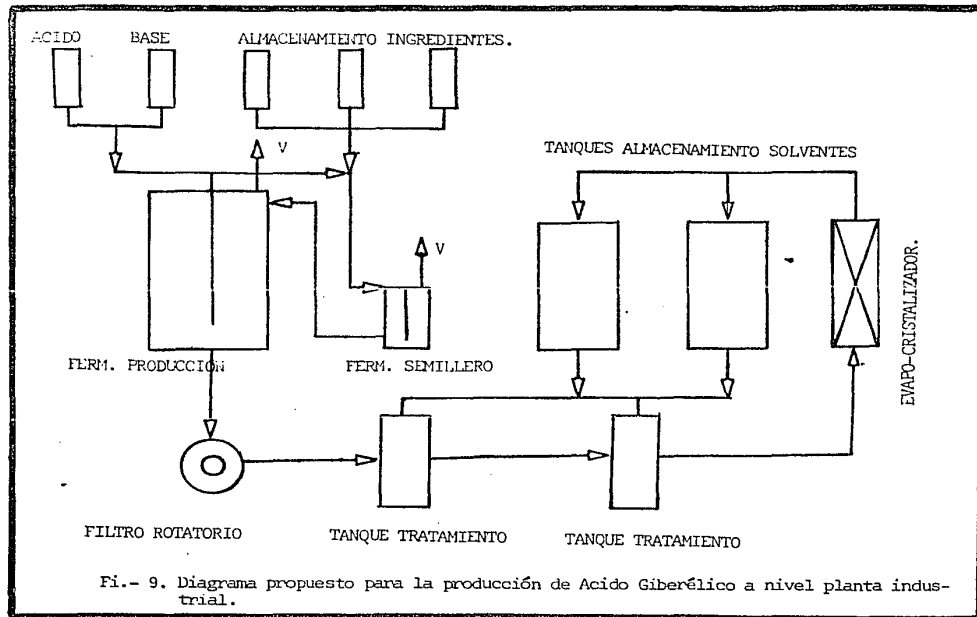


Fig.-8. Cinética de crecimiento de Gibberella fujikuroi.



CROMATOGRAMAS

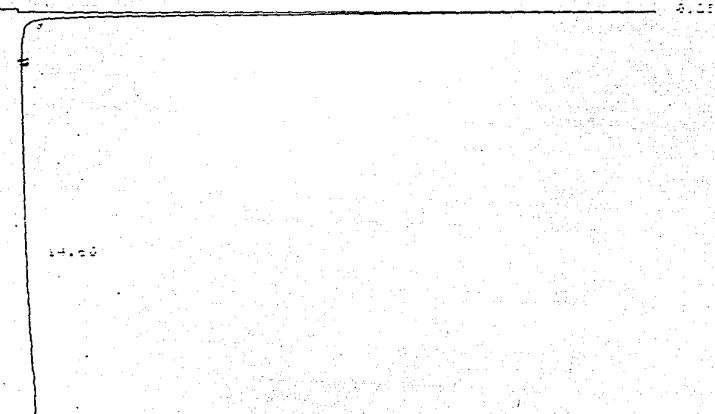
DATA

CROMATOGRAMA NO. 1

29

RTN: 1 3

AGE: 5 PRUEBA * 1



RT: STOP RUN

INSTR: 88101 MANUAL INJECTION @ 12:11
AREA: 1

RT	AREA	TYPE	AREA %
14.60	11070.30	B7	99.999
14.60	1.00	B6	0.001

TOTAL AREA = 11070.30
MULTIPLIER = 1

CROMATOGRAMA NO. 2

INITIALS
 START
 READY FOR INJECTION

3.165
 4.111
 7.34
 8.81
 9.55
 11.13
 13.63
 15.87
 15.87
 19.20
 23.96
 24.92
 RT STOP RUN

30

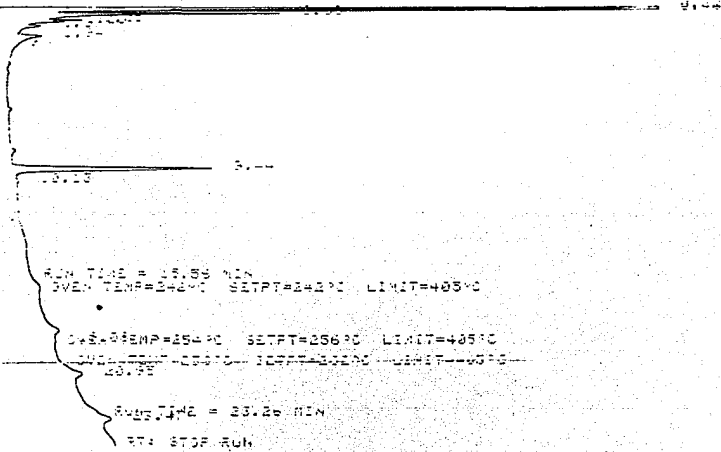
EXP 51300 MANUAL INJECTION @ 12:45
 AREA 1

RT	AREA	TYPE	AREA %
8.24	1167430.58	SB	99.716
1.85	718.13	SB	0.000
4.11	91.81	SB	0.000
7.34	39.43	SB	0.000
8.81	48.66	SB	0.000
9.55	53.67	SB	0.000
11.13	67.93	SB	0.000
13.63	252.55	SB	0.000
15.87	48.59	SB	0.000
15.87	1071.36	SB	0.000
20.20	17.59	SB	0.000
23.96	1990.10	SB	0.000
24.92	1978.17	SB	0.000

TOTAL AREA = 2173699.00
 MULTIPLIER = 1

CROMATOGRAMA NO. 3

INJECTION



RUN TIME = 23.26 MIN
 OVEN TEMP=151°C SETPT=151°C LIMIT=400°C
 OVEN TEMP=151°C SETPT=206°C LIMIT=400°C
 OVEN TEMP=151°C SETPT=206°C LIMIT=400°C
 RUN TIME = 23.26 MIN
 RT: STOP RUN

126

INJ 5680A MANUAL INJECTION @ 15:15
 AREA %

RT	AREA	TYPE	AREA %
0.32	5367.19	SV	60.458
1.14	4235.93	VV	47.354
1.17	3627.91	VV	40.866
1.17	421.73	VV	4.741
1.17	648.96	VV	7.324
1.27	948.23	VV	10.671
1.37	530.29	SV	5.950
9.47	1478.92	SB	16.538
10.13	66.10	SBP	0.742
11.05	17.66	SB	0.196
19.35	199.41	SB	2.247
19.35	1333.66	SB	14.936

TOTAL AREA = 7404.00
 MULTIPLIER = 1

LIST OVEN TEMP
OVEN TEMP=135°C SETPT=130°C LIMIT=405°C

START OVEN TEMP 1

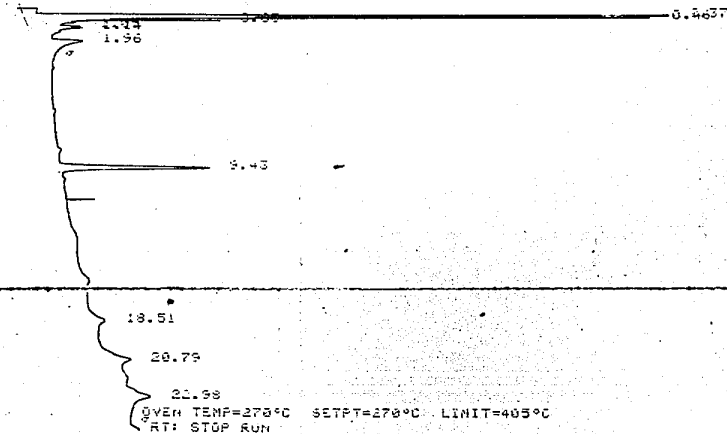
1.37

READY FOR INJECTION

CHROMATOGRAMA NO. 4

PATRON GA, → START

READY FOR INJECTION



127

END 5830A MANUAL INJECTION @ 15:50
AREA %

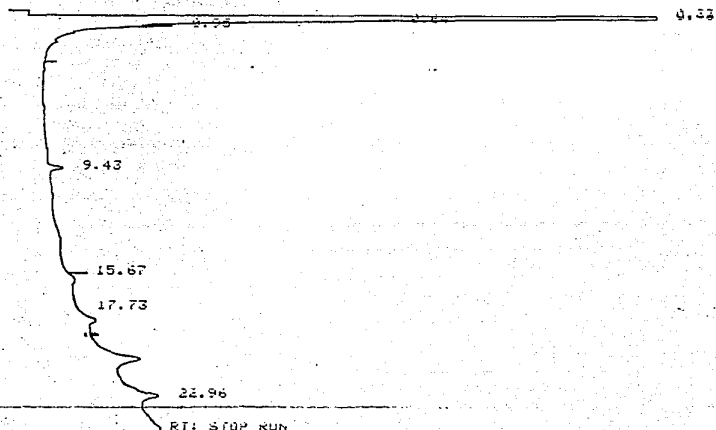
RT	AREA	TYPE	AREA %
1.37	3113.84	SV	38.835
1.96	3860.36	VV	18.573
3.43	1278.19	VV	6.373
1.96	358.17	VV	1.334
1.14	533.45	VV	2.410
1.96	1038.17	SV	4.931
3.43	2778.41	BB	13.150
18.51	245.73	BB	1.170
20.79	1036.29	SV	4.360
22.98	1774.36	BH	8.493

TOTAL AREA = 20892.90
MULTIPLIER = 1

GA₂ EXTRACTO E₂ START

READY FOR INJECTION

CHROMATOGRAMA NO. 5



RT: STOP RUN

Exp 1 5880A MANUAL INJECTION @ 16:23

AREA %

RT	AREA	TYPE	AREA %
0.33	539235.00	BV	96.195
0.46	1259.68	VV	2.425
0.54	5753.26	VV	1.027
0.95	1144.21	VV	0.204
9.43	267.92	BB	0.048
15.67	4.38	BV	0.001
17.73	0.40	BP	0.000
22.96	562.79	BB	0.100

TOTAL AREA = 560566.00

MULTIPLIER = 1

128

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexopoulos, C.J., y C.W. Mims (1979). Introductory Mycology. John Wiley & Sons. Nueva York.
- Atkinson, B. (1974). Biochemical Reactors. Limited Bristol. Londres.
- Bidwell, R.G.S. (1974). Plant Physiology. Collier Mac Millan International. Nueva York.
- Brian, P.W. (1961). Gibberellins; a New Group of Plant Hormones. *Sci. Progr.* 49:1-16.
- Chao, A. (1983). Comunicación Personal (Gerencia de Mercadotecnia de la compañía Bioenzymas de México, S.A. de C.V.).
- Cook, A.H. (1962). Barley and Malt. Academic Press. Nueva York.
- Demain, A.R., y Piret J. (1981). Why Secondary Metabolism? *American Society for Microbiology*. 363-364.
- Darken, M.A., A.L. Jansen, y P. Chu. (1959). Production of Gibberellic Acid by Fermentation. *Appl. Microbiol.* 7: 301-303.
- Esashi, Y., H. Katoh, y C.A. Leopold. (1977). Dormancy and Impotency of Cocklebur Seeds. Effects of Gibberellic Acid, Benzyladenin, Thiourea, and potassium nitrate on growth of embrionic axis and cotiledon segments. *Plant Physiology*. 59: 117-121.
- Grove, J.F. (1963). In Biochemistry of Industrial Microorganisms. Academic Press. Nueva York.
- Hill, T.A. (1977). Hormonas Regulatoras del Crecimiento Vegetal. Omega. Barcelona.

Horgan, R.C. (1968). Modern Methods for Plant Hormone Analysis. Progress Phytochemistry. 48: 120-160.

Kavanagh, F. y N.R. Keszal. (1958). Gibberellins assay fluorometric determination of Gibberellic and Gibberellenic acids in fermentations products, commercial formulations and purified materials. Agriculture and Food Chemistry. 6: 459-463.

Kirk, E.R., F.D. Othmer, y J. Scott. (1966). Enciclopedia de Tecnología Química. 3. Hispano-Americana. México. 309-339.

Kuhlman, E.G. (1982). Varieties of Gibberella fujikuroi with anamorphs in Fusarium section Liseola.

New Brunswick Scientific Co. Inc. (1977). Fermentation Equipment. New Brunswick Scientific C. Nueva Jersey.

Ortega, E.R. (1970). Evaluación Técnico-Económica de una planta productora de Acido Giberélico en México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas U.N.A.M.

Rainbow, P., y W. Rose. (1963). Biochemistry of Industrial Microorganisms. Academic Press. Nueva York.

Romero, G.J. (1981). Mecanismo de Regulación en la Producción de Eritromicina. Tesis profesional. Facultad de Ciencias U.N.A.M.

Russell, L.J. (1973). Gibberellins, their physiology role. Ann. Rev. plant physiology. 24: 571-578.

Smith, E.J. y A. Berry. (1975). Industrial Mycology. William Clowes & Sons. Londres.

Sokal, R., y J.F. Rohlf. (1969). Biometry. Freeman. San Francisco.

Solomons, G.L. (1969). Materials and Methods in Fermentation. Academic Press. Londres.

Stahl, E. (1969). Thin-Layer Chromatography. Springer-Verlag. Berlin.

Stanier, R. (1976). The Microbial World. Prentice-Hall. Nueva Jersey.

Stodola, F.M. (1958). Sources book on Gibberellins. American Research Service U.S.A. Dept. de Agricultura de los Estados Unidos.

Wang, D.C.I., et al. (1979). Fermentation & Enzyme Technology. John Wiley Interscience. Nueva York.

7. ANEXO. USOS Y RECOMENDACIONES DE LOS PRODUCTOS COMERCIALES QUE CONTIENEN GA₃ EN ALGUNOS CULTIVO COMUNES EN MEXICO

<u>NOMBRE COMERCIAL Y CULTIVO</u>	<u>RECOMENDACIONES TECNICAS</u>	<u>EFFECTOS</u>
ACIDO GIBERELICO DE PFZEIR		
Crisantemo (<u>Chrysanthemum marifolium</u>)	50 p.p.m., dos semanas después de desarrollar raíces	Planta más alta y floración temprana
Dalias (<u>Dahlia sp</u>)	50 p.p.m., asperjar tallos	La floración se adelanta y los tallos son más gruesos
Café (<u>Coffea arabica</u>)	20 p.p.m. cuando las ramas con yemas florales estén bien desarrolladas	Se logra una maduración uniforme y se reduce el número de cortes
Cítricos en producción (<u>Citrus sp</u>)	100-500 p.p.m. al terminar la floración y cuando los frutos están aún pequeños	Aumenta considerablemente la cosecha
Cítricos en vivero (<u>Citrus sp</u>)	50 p.p.m. al germinar, asperjar las yemas terminales, a los dos-tres meses repetir	Se acelera el crecimiento en un 600% y forma de cuatro-cinco ramas que el no tratado

Alfalfa (<u>Medicago sativa</u>)	50 p.p.m. de diez a quince días antes de cada corte, únicamente durante el invierno	Aumenta el rendimiento de un 15-30% y reduce el tiempo entre cortes
Fresa en vivero (<u>Fragaria mexicana</u>)	200 p.p.m. antes de florear	Promueve la formación de estolones y puede inhibirse la floración al repetir el tratamiento
Fresa en producción	15-20 p.p.m. quince días después de iniciada la floración. Repetir al volver a florear	Aumento de rendimientos hasta un 60%
Jitomate (<u>Sycopersicon esculentum</u>)	15-20 p.p.m. cuando la planta tiene ocho días de inflorescencia	Puede incrementar y adelantar la producción
Chícharo (<u>Pisum sativum</u>)	5 p.p.m. uno o dos antes de iniciarse la floración	Mayor crecimiento de la planta que permite más aereación y sanidad de las vainas. El rendimiento aumenta en un 50%
Vid (<u>Vitis Labrusca</u>)	20 p.p.m. durante la floración esparciendo los racimos únicamente	Aumenta el tamaño de la uva Thomson sin semilla
Apio (<u>Apium graveolens</u>)	50 p.p.m. veinte a treinta días antes de cosechar	El tamaño y el peso aumenta del 20-50%

Papa
(Solanum dulcamara)

1 p.p.m. antes de sembrar por
inmersión de la semilla

Interrumpe el estado de latencia,
favorece la formación de tubérculos
produciendo mayores rendimientos

Chile
(Capiscum annum)

20 p.p.m. al principiar la flora-
ción

Mayores rendimientos del 20-40%

Melón
(Cucumis melo)

15 p.p.m. dos o tres días antes de
florear

Los frutos son más grandes con mayo-
res rendimientos

Pepino
(Cucumis sativum)

15 p.p.m. dos o tres días antes
de florear

Los frutos son más grandes con mayo-
res rendimientos

Sandía
(Citrulus vulgaris)

15 p.p.m. dos o tres días antes de
florear

Los frutos son más grandes con mayo-
res rendimientos

Berenjena
(Solanum melongena)

25 p.p.m. al principiar la flora-
ción

Rendimientos del 20-30%