

FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO: UNA TECNOLOGÍA MICROBIANA PROMISORIA PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Por: T. Robinson, D. Singh y P. Nigam.

Traducido por: Amanda Inés Mejía G.

Referencia bibliográfica: Appl. Microbiol Biotechnol. 55: 284-289, 2001

RESUMEN

La fermentación en estado sólido (FES) se ha usado exitosamente para la producción de enzimas y metabolitos secundarios. Estos productos están asociados con la fase estacionaria de crecimiento microbiano y son producidos a escala industrial para su uso en agricultura y en el tratamiento de enfermedades. Muchos de esos metabolitos secundarios son producidos aún en fermentaciones líquidas sumergidas (FLS), aunque a través de su producción este método ha mostrado ser menos efectivo que la FES, ya que cuando la producción a gran escala se incrementa asimismo lo hacen los costos y la demanda energética. La FES ha mostrado que produce un producto más estable, requiere menor energía, en fermentadores más pequeños que facilitan el proceso de separación de los productos (downstream). En éste artículo los autores revisaron una importante área de la biotecnología, donde la evidencia reciente indica que las bacterias y los hongos creciendo bajo condiciones de FES, son capaces de suplir el crecimiento en la demanda global de metabolitos secundarios.

ABSTRACT

Solid state (substrate) fermentation (SSF) has been used successfully for the production of enzymes and secondary metabolites. These products are associated with the stationary phase of microbial growth and are produced on an industrial scale for use in agriculture and treatment of disease. Many of these secondary metabolites are still produced by submerged liquid fermentations (SMF) even though production by this method has been shown to be less efficient than SSF. As large-scale production increased further so do the costs and energy demands. SSF has been shown to produce a more stable product, requiring less energy in small fermenters, with easier downstream processing measures. In this article we review an important area of biotechnology, since the recent evidence indicates that bacteria and fungi, growing under SSF conditions, are more than capable of supplying the growing global demand for secondary metabolites.

INTRODUCCIÓN

La fermentación en estado sólido (FES) es caracterizada por un proceso de fermentación sobre un soporte sólido, el cual tiene un bajo contenido de humedad (límite inferior $\approx 12\%$) y ocurre en estado no aséptico y natural (Nigam and Singh, 1994). La FES produce una alta concentración de producto con un relativamente bajo requerimiento energético (Mudgett et al, 1992; Yang and Yuan, 1990). La FES ha sido explotada para la producción de alimentos (Bhumiratana et al, 1980; Heseltine, 1983), alimentos para animales (Gumbina Said, 1996; Nigam and Singh, 1996a; Dandhu and Joshi, 1997), combustible (Hinman et al, 1992; Ingram et al, 1999; Lapadatescu and Bonnarme, 1999) y enzimas (Gombert et al, 1999; Nigam and Singh, 1996b) y además degradación de colorantes (Nigam et al, 2000; Robinson et al, 2000), etc. La FES puede ser llevada a cabo sobre una variedad de residuos agrícolas (Ver tabla 1), tales como paja de trigo, cascarilla de arroz y tusa de maíz.

Industrialmente, los metabolitos secundarios son principalmente producidos bajo condiciones sumergidas (FLS) principalmente porque los procesos asociados con el escalamiento son mas simplificados, comparados con aquellos requeridos para el escalamiento en FES. La fermentación líquida permite más control de los parámetros tales como pH, calentamiento, condiciones nutricionales, etc. Y también debe tomarse en cuenta que los científicos occidentales tienen menor conocimiento de los procesos de FES, comparado con los que tiene los del oriente (Johns, 1992; Nigam and Singh, 1994).

El uso de la tecnología de FES para la producción de metabolitos secundarios no debe ser desestimado. La morfología del micelio asociada con los microorganismos predominantemente usados para la producción de metabolitos secundarios, es muy adecuada para el crecimiento sobre soporte sólido. Puede haber también un efecto dañino sobre la formación de productos en

medios líquidos, porque medios líquidos altamente viscosos son requeridos para la producción exitosa de metabolitos y esto puede interferir la transferencia de oxígeno. La morfología de esos microorganismos y además la secreción de esos metabolitos sobre el medio decrecimiento puede incrementar la viscosidad. Por tanto, la tecnología de FES puede ser explotada como una alternativa, permitiendo una mejor circulación de oxígeno (Elibol and Mavituna, 1997).

Debido a la ausencia de agua libre, se emplean fermentadores pequeños para la FES y por tanto se requiere menos esfuerzo para los procesos de separación (downstream). Las cepas nativas o silvestres de bacterias y hongos tienden a un mejor comportamiento en condiciones de FES que los microorganismos genéticamente modificados, reduciendo además costos de energía y de requerimientos (Barrios-González et al, 1993).

Esta revisión mira varios metabolitos secundarios producidos por tecnología de FES (ver tabla 1), explora las ventajas de éste proceso sobre el sistema convencional de FLS y mira las dificultades asociadas con la producción de metabolitos secundarios a gran escala con FES.

Ácido giberélico

El ácido giberélico (AG_3) es producido en fase estacionaria como un metabolito secundario fúngico. Es ampliamente usado en agricultura por su importancia económica e industrial. El AG_3 puede ser usado para terminar la germinación en semillas, promover la floración o germinación acelerada en la industria cervecera (Balakrishnan and Pandey 1996). El AG_3 se produjo primero por fermentación líquida usando *Gibberella fujikuroi* or *Fusarium moniforme*. La Producción en FES está siendo investigada por muchas razones. Una de ellas es el alto costo de producción del AG_3 usando FLS debido a los bajos rendimientos y extensivos procesos de separación. La FES ha mostrado mayor rendimiento en concentración de AG_3 , con mínima producción y costos de ex-

tracción (Balakrishnan and Pandey 1996; Bandelier et al. 1997; Tomasini et al. 1997).

Bandelier et al. (1997) produjeron 300 mg de AG_3 /kg de materia seca, usando granos de harina, al 10-día de fermentación, comparables con 240 mg/kg de materia seca, en 36-h de fermentación, obtenidos por Tomasini et al. (1997), usando casava. Esos resultados contrastan con 23 mg AG_3 /l producidos en fermentación líquida por Tomasini et al. (1997) en 120 h. Balakrishnan and Pandey (1996) compararon el rendimiento en FES y en FLS, mostrando que la FES produce 3.5 más de AG_3 cuando se añade almidón soluble.

Como el AG_3 tiene amplio uso y gran importancia económica, una producción mas eficiente y en mayor volumen serán bienvenidas. Los experimentos a pequeña escala muestran resultados promisorios, con mas altas cantidades de producción en cortos períodos de fermentación. Esos experimentos a pequeña escala ilustran el potencial de la producción de metabolitos secundarios por FES.

Alcaloides del ergot

Los alcaloides del ergot han sido usados desde 1582, (mucho antes de conocer su identidad química), para inducir contracciones uterinas durante el parto (De Groot et al. 1998) y es producido por el *Claviceps* spp y algunas cepas de *Aspergillus Penicillium* y *Rhizopus* spp (Peraica et al. 1999). Se han usado con éxito para tratar enfermedades como la angina de pecho, la hipertensión entérica, migrañas, etc (Demain 1999). Los alcaloides del ergot también han sido usados para tratar enfermedades infecciosas tales como glaucoma y herpes zoster. El alucinógeno LSD, dietilamida del ácido lisérgico es el alcaloide derivado del ergot mas conocido (De Groot et al. 1998). El tartrato de ergotamina es usado hace mucho como una droga farmacéutica.

La producción de alcaloides del ergot por FES ha demostrado ser 3.9 veces mayor que la producida por *C. fusiformis* en FLS (Hernandez

et al. 1993). El uso de antiespumantes químicos y la rata de cizalladura causada por la agitación, evitan la alta producción en FLS. Por FES también se obtiene una mejor circulación del aire, incrementando por consiguiente el rendimiento (Balakrishnan and Pandey 1996). Por disminución de los costos y de los problemas asociados con los antiespumantes químicos, y maximizando el rendimiento, la FES parece ser una opción viable para escalar la producción de los alcaloides derivados del ergot

Surfactina

La Surfactina se descubrió en 1968. Su nombre se debe a su actividad surfactante (Peypoux et al, 1999) y es uno de los más poderosos biosurfactantes conocidos. También es usado como inhibidor de coagulación (Arima et al, 1968), y puede lisar eritrocitos y los estereoplastos y protoplastos de algunas bacterias (Ohno et al, 1995).

Las actividades surfactante (Cooper et al, 1981) y antibiótica (Bernheimer and Avigad, 1970) de la Surfactina son las causantes de la gran demanda de producción de esa sustancia. La producción de Surfactina ha sido principalmente obtenida en condiciones de fermentación líquida sumergida (FLS) en un medio con requerimientos adecuados para el *Bacillus spp*, que aunque simple es costoso. Esto llevo a experimentar en cultivos agrícolas (Peypoux et al, 1999).

La Surfactina es capaz de reducir la tensión superficial del agua desde 72 nM/m³ a 27 nM/m³ (Ohno et al, 1995) pero éste constituyente es solo una pequeña fracción de los metabolitos secundarios producidos por el *Bacillus spp*. El *B. subtilis* MTCC 2423 produce casi 1 g de biosurfactante en 96 horas: y esto ha hecho que se investigue en maximizar la producción de Surfactina por medio de la FES. La demanda de Surfactina y la alta producción que la FES produce, significa que si la producción a gran escala puede lograrse con ésta tecnología, un gran mercado podrá hacer de éste un método muy atractivo económicamente.

Tabla 1. Algunos metabolitos secundarios producidos por fermentación en estado sólido.

PRODUCTO	MICROORGANISMO	SUSTRATO	REFERENCIAS
Actinorhodina metilenomicina	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Agar	
Aflatoxina	<i>Aspergillus niger</i>	Casava	Barrios-Gonzalez et al. (1990)
Aflatoxina	<i>A. parasiticus</i>	Arroz, maíz, maní	
Antibiótico	<i>Alternaria brassicicola</i>	Harina, tusa de maíz	Hesseltine (1972)
Endotoxinas bacteriales	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Coco	
Cefalosporina	<i>Streptomyces</i>	Granos de arroz	Wang et al. (1984)
Cefalosporina	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Barley	Jermine and Demain (1989)
Alcaloides del ergot	<i>Claviceps fusiformis</i> , <i>C. purpurea</i>	Bagazo	Hernández et al. (1993)
Ácido giberélico	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i>	Granos de trigo	Kumar and Lonsane (1987a, b, c): 30) Prema et al. (1988)
Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>	Okara	Ohno et al. (1992 a,b, 1993, 1995, 1996)
Micotoxina	<i>Aspergillus flavus</i>	Tusa de maíz, harina, avena	Hesseltine (1972)
Micotoxina	<i>A. niger</i>	Casava	Barrios-Gonzalez et al. (1990)
Micotoxina	<i>Penicillium viridicatum</i> , <i>A. ochraceus</i>	Harina, tusa de maíz, arroz.	Hesseltine (1972)
Micotoxina	Varios microorganismos	Soya	Bhumiratana et al. (1980)
Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimoi</i>		
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagazo	Barrios-González et al. (1988)
Intermediarios de esteroides	<i>Mycobacterium</i>		
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Soya	Ohno et al. (1995)
Tetraciclina	<i>Aspergillus</i>	Papa dulce	Yang and Ling (1989)
Tetraciclina, clorotetraciclina	<i>Streptomyces viridifaciens</i>	Papa dulce	Yang and Ling (1989)
Zearalenona	<i>Fusarium moniliforme</i>	Tusa de maíz	Hesseltine (1972)

Antibióticos

Los Antibióticos son productos de la fermentación y son producidos en fase estacionaria, generalmente en respuesta a condiciones de estrés (Asanza Teruel et al, 1997). Ellos pueden ser definidos como productos orgánicos naturales de bajo peso molecular (metabolitos secundarios) producidos por microorganismos y los cuales son activos contra otros microorganismos a bajas concentraciones (Demain, 1999). Se pueden producir ya sea por procesos de fermentación, de síntesis o de semisíntesis. Los Antibióticos se requieren en muchas cantidades en la lucha continua contra las enfermedades bacteriales y de ahí que las investigaciones estén concentradas en obtener altas concentraciones de ellos con bajo gasto energético. Los Antibióticos se han obtenido tradicionalmente por fermentación líquida o FLS, pero la producción tiende a ser baja con relación al gasto energético y se requiere un extensivo proceso de separación y purificación (downstream) (Balakrishnan and Pandey, 1996; Bandelier et al, 1997; Tomasini et al, 1997). Se ha encontrado que la actividad de los Antibióticos decrece después de una prolongada incubación durante la fermentación líquida, debido a autólisis celular (Yang and Ling, 1989). Como se requieren grandes cantidades de antibióticos a escala mundial, la producción de esos metabolitos secundarios por FES permite obtener un producto mas concentrado. No siendo la esterilidad del producto un parámetro, hay una real posibilidad de que ésta tecnología se pueda usar una vez su escalamiento se haya optimizado.

Cefaminina C.

La Cefamicina C (Cef C) es un antibiótico b-lactámico de amplio espectro producido por una variedad de organismos, que incluyen la *Nocardia lactamdurans*, *Streptomyces catteya* y *S. clauverigerus*. Esta es usada como droga básica para la semisíntesis de productos como cefotaxina y cefametadazol.

El uso de la tecnología de FES para la producción de Cef C se ha investigado porque la producción tradicional por medio de FLS requiere mucho gasto energético. Kota and Sridhar (1998) mostraron que la CEF C producida por FES es un antibiótico más estable que el obtenido por FLS. La fermentación se hizo sobre harina cruda, empezando la producción de Cef C a los tres días y alcanzando su máximo de producción a los 5 días. La adición de torta de algodón desengrasada y granos de maíz incrementaron la producción. Balakrishnan and Pandey (1996), quienes también suplementaron con almidón, soportaron este hallazgo. Las condiciones de temperatura y pH para la producción de CEF C fueron las mismas que las usadas para la FLS (Kota and Sridhar, 1998) aunque mantener una temperatura uniforme fue difícil.

Penicilina

La penicilina se obtuvo primero a partir de una cepa aislada de *Penicillium notatum*, pero hoy se produce a partir de una cepa aislada altamente productora de *P. chrysogenum* (Balakrishnan and Pandey, 1996; Penalva et al, 1998). Las penicilinas, incluyendo las cefalosporinas, carbapencinas y monobactams, son bien conocidos como antibióticos b-lactámicos. La producción de penicilina por medio de FES es alta en rendimiento en un corto período de tiempo (Balakrishnan and Pandey, 1996).

Barrios-González et al (1993), ilustraron como altas cantidades de penicilina se obtienen en corto tiempo por FES, un atributo muy benéfico cuando se trata de producir uno de los antibióticos de mayor uso en el mundo. Bajo condiciones de FLS, un máximo valor de 9,8 mg/l se obtuvo, mientras que por FES se obtuvieron 13 mg de penicilina/l. Esto ilustra la ventaja económica de la FES si se optimiza a gran escala.

Ciclosporina A

La Ciclosporina A (Cic A) es un undecapeptido cíclico que se usó primero como un péptido antifúngico a partir de *Fusarium solani*, *Neocos-*

mospora varinfecta y *Tolypocladium inflatum* (Sekar and Balaraman, 1998; Sekar et al, 1997). Se encontró que éste antibiótico tiene actividad antifúngica, antiparasitaria, antiinflamatoria e inmunosupresiva. Se ha usado exitosamente en pacientes transplantados del corazón, hígado y riñón, con ventas por encima de US\$1 billón en 1994 (Balakrishnan and Pandey, 1996; Demain, 1999) y con un potencial de incrementar este panorama utilizando una producción con rendimiento más rápido por medio de la FES. La Cic A ha sido producida principalmente por FLS pero también puede ser producida sintéticamente, lo cual es complejo en comparación con la FES. Debido a lo complejo del proceso sintético, la atención se ha tornado hacia la FES para una más alta producción de ésta droga (Ramana Murthy et al, 1999).

Ramana Murthy et al (1999) produjeron Cic A bajo FES usando una cepa mutante de *T. inflatum*. La cepa mutante fue capaz de producir 1.031g mas ó menos 12 mg de Cic A/kg de harina de salvado dos veces más comparado con lo que se ha producido con harina bajo FLS (Balakrishnan and Pandey, 1996). A través de la FES existe la posibilidad de obtener mas Cic A comercialmente disponible e incrementar las posibles ventas del mismo.

El uso de la FES ha sido investigado por su producción con altos rendimientos. Sekar and Balaraman (1998) usaron harina de salvado como sustrato sólido, y recorrieron el efecto de algunos parámetros como perforaciones en los lechos de la FES, espesor del sustrato sólido, tipo de inóculo y humedad, que incidieron sobre la producción de Cic A. La optimización de los parámetros de la FES puede incrementar la producción de Cic A y otros antibióticos.

Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro, comúnmente producidos por FLS con un gran gasto energético y una alta producción de desechos. Ellas pueden ser usados contra bacterias gram positivas y negativas, coccidios,

tricomonas, amibas, micoplasmas y balantidi. Las tetraciclinas trabajan inhibiendo la formación de un complejo necesario de los ribosomas, el mRNA y el aminoacil tRNA (Yang and Ling, 1989).

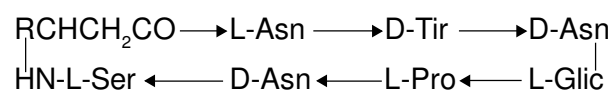
Yang and Ling, (1989) mostraron que la tetraciclina puede ser producida en 3 días de fermentación sobre residuos de papa dulce, alcanzando un máximo valor a los 5-6 días. La producción de tetraciclina por FLS decrece después de una fermentación prolongada, debido a autólisis celular. Yang and Ling, (1989) reconocieron la habilidad de la FES para producir un antibiótico más estable, con gran potencial de almacenamiento.

Oxitetraciclinas

La producción de oxitetraciclinas en FLS también ha mostrado una disminución en su rendimiento debido a autólisis celular. La producción de oxitetraciclina bajo condiciones de FES da lugar a un producto más estable. Yang and Wang (1996) encontraron una correlación positiva entre fragmentos largos de micelio y el rendimiento de antibiótico. Esto provee un buen indicador de la actividad del antibiótico en tales sistemas.

Iturina

La Iturina es un antibiótico antifúngico producido por *Bacillus subtilis* (Balaakrisnan and Pandey, 1996) y se ha mostrado en ensayos de campo, que es muy efectivo contra plantas patógenas. La Iturina es un heptapéptido cíclico (ver figura 1) de α -aminoácidos conectados a una larga cadena de β -aminoácidos (Ohno et al, 1992^a, b, 1993, 1996).



R es un ácido graso con una cadena lateral de un β -amino ácido

Figura 1. Estructura de la Iturina.

Ohno et al (1992b, 1993, 1996) usaron residuos de soya prensada, conocido como okara y tradicionalmente quemado como un desecho industrial. El potencial de okara como un sustrato en FES para la producción de Iturina fue estudiado por Ohno et al (1993).

Ohno et al (1993) mostraron que la producción total de Iturina fue superior en FES comparada con la FLS. La productividad de Iturina (por gramo de cultivo húmedo por día) fue 1,0-1,65 mg, 0,5-1,0 mg y 0,55-0,8 mg en 15 g, 100-500 g y 3 kg de fermentación en procesos de FES. Ohno et al (1993) también notaron que la Iturina producida por FES tenía una fuerte actividad antibiótica, debido a que el antibiótico tenía una cadena lateral más larga.

La máxima producción de Iturina ocurrió en FES después de 2 días, comparado con 5 días en FLS, y la FES se encontró ser 6-8 veces más eficiente (Balakrisnan and Pandey, 1996; Ohno et al, 1992a). Ohno et al (1992^a) también demostraron que la extracción de Iturina fue mucho más simplificada en FES y requiere menos solvente.

Makkar and Comeotra (1999) reportaron que la rata de crecimiento del *Bacillus subtilis* y la formación de Iturina fueron mucho mayores cuando se uso desechos industriales que un medio sintético. Las melazas son el medio soporte sólido usado en la India para la producción de Iturina, principalmente debido a su bajo precio y a la presencia de azúcares y otros compuestos esenciales (Nigam, 1994).

Principales conclusiones

El uso de la FES para la producción de metabolitos de valor comercial está subutilizada hasta el presente, porque hay una fuerte preferencia por las fermentaciones líquidas, familiares y convencionales. Su tardanza a ser adoptada por la industria parece extraño, dado que la investigación en FES muestra altos rendimientos en cortos períodos de tiempo. Es fácil ver

como la FLS prevalece aún para la producción de metabolitos secundarios: esta es un técnica familiar, escalar del laboratorio a nivel industrial es más simple que en la FES, con parámetros que son más fáciles de monitorear y controlar. Sin embargo hay problemas asociados con la producción de metabolitos secundarios en la FLS, tales como las fuerzas de cizalladura, el incremento en la viscosidad debido a la secreción de metabolitos y la reducción de la estabilidad de los metabolitos; y hay un incremento demandante en la ciencia relacionada con la producción de antibióticos, por el incremento en la demanda y por los casos de resistencia a los antibióticos. Por tanto, el uso de la FES puede ser considerado por la industria, especialmente cuando se requiere gran cantidad de metabolitos secundarios, en cortos períodos de tiempo, con mínimos desembolsos relacionados con los medios y procesos de separación.

Aunque la FES puede ser una tecnología posible para incrementar los rendimientos, los problemas ocurren cuando los experimentos son escalados. Una buena mezcla como la alimentación del bioreactor por lotes es difícil de operar a gran escala, pero un bioreactor de flujo continuo puede ser mucho mejor industrialmente, con mucha mayor producción comparada con la FES por lotes. Aunque la FES produce un producto mas concentrado que la FLS, se difunde a través del medio sólido y por lo tanto se requiere extracción. Al extraer grandes cantidades de sólidos, se pueden extraer impurezas mas concentradas, con costos de purificación proporcionales a la concentración de éstos compuestos inertes. Esto puede llevar a un incremento en los costos de recuperación, especialmente para la recuperación de metabolitos secundarios, cuya pureza es estrictamente regulada por las agencias gubernamentales. Con la remoción del agua libre, se recupera un producto mas concentrado, pero la dificultad de separar el medio sólido del producto, puede oponerse a esta ventaja.

El escalamiento de la FES también puede tener un efecto deletéreo sobre la formación de los metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son extremadamente sensibles a factores ambientales y esos factores son más difíciles de controlar en FES a gran escala. La pérdida de humedad de la superficie a través del soporte sólido caliente, necesita ser monitoreada cuidadosamente.

Si bien se puede ver que la FES permite la formación de producto más concentrado (y

en muchos casos en un período de tiempo más corto), otros factores tales como la impureza del producto y el monitoreo de la fermentación a escala industrial, necesitan ser considerados. Si los parámetros de la FES se controlan correctamente, y se define la impureza del producto, entonces la FES puede ser un proceso más competitivo que el comúnmente usado y ser una opción viable para la producción industrial de metabolitos secundarios.

REFERENCIAS

- Arima K. Kakinuma A. Tamura G (1968). Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterisation and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* 31:-188-194
- Asanza Teruel ML. Guntier E. Biencime C. Nava Saucedo JE. Barbotin JN (1997) Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilised *Streptomyces aureofaciens*. *Enzymol Microbiol Technol*. 121:314-320
- Balakrishnan K. Pandey A (1996) Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *J Sci Ind Res* 55:365-372
- Bandelier S. Renaud R. Durcind A (1997) Production of gibberellic acid by fed batch solid state fermentation in an aseptic pilot scale reactor. *Proc Biochem* 32:141-145
- Barrios-Gonzalez J. Tomassini A. Viniestra-Gonzalez G. Lopez L. (1988) Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol Lett* 10:793-798
- Barrios-Gonzalez J. Rodroquez GM. Tomassini A (1990). Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava SSF. *J Ferment Bioeng* 70:329-333
- Barrios-Gonzalez J. Castillo TE. Mejia A (1993) Development of high penicillin-producing strains for solid state fermentation. *Biotechnol Adv* 11:525-537
- Bernheimer AW. Avigad LS. (1970) Nature and properties of a catalytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 6:361-366
- Bhumiratana A. Flegel T. Glinsukon T. Somporan W (1980). Isolation and analysis of molds from soy sauce koji in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 39:425-430
- Cooper DG. MacDonald CR. Duff SFB. Kosaric N (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions: *Appl Environ Microbiol* 42:408-412
- De Groot ANJA. Dongen PWJ van. Vree TB. Hekster YA. Roomalen J van (1998) Ergot alkaloids: Current status and review of clinical pharmacology and therapeutic use compared with other oxytocics in obstetrics and gynaecology. *Drugs* 56:523-535
- Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:455-463
- Elibol M. Muvituna F (1997) Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. *Proc Biochem* 32:417-422
- Gombert AK. Pinto AL. Castilho LR. Freire DMG (1999) Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Proc Biochem* 35: 85-90
- Gumbina Said E (1996) Packed-bed solid state cultivation systems for the production of animal feed. *J Sci Ind Res* 55:431-438
- Hernandez MRT. Lonsane BK. Raimbault M. Roussos S (1993). Spectra of ergot alkaloids produced by *Calviceps pupea* 1029 C in solid state fermentation system: influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar cane pith bagasse. *Proc Biochem* 28:23-27
- Hesseltine CW (1972) Biotechnology report: solid state fermentations. *Biotechnol Bioeng* 14:517-532
- Hesseltine CW (1983) Microbiology of oriental fermented foods. *Annu Rev Microbiol* 37:575-601

- Hinman ND. Schell DJ. Riley CJ. Bergeron PNV. Walter PJ (1992) Preliminary estimate the cost of ethanol-production for SSF technology. *Appl Biochem Biotechnol* 34-5:639-649
- Ingram LO. Aldrich HC. Borges ACC. Causey TB. Martinez A. Morales F. Saleh A. Underwood SA. Yomono LP. Zaldivar J. Zhou SD (1999). Enteric bacteria for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog* 15:855-866
- Jermini MFG. Demain AL (1989) Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporin acremonium*. *Experientia* 45:1061-1065
- Johns MR (1992) Production of secondary metabolites. *Solid Substrate Cultiv* 17:341-352
- Kota KP, Sridhar P (1998) Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for producing cephamycin C. *J Sci Ind Res* 57:587-590
- Kumar PKR. Lonsane BK (1987a) Gibberellic acid by S\$F: consistent and improved yields. *Biotechnol Bioeng* 30:267-271
- Kumar PKR. Lonsane BK (1987b) Extraction of gibberellic acid from dry mouldy bran produced under solid-state fermentation. *Proc Biochem* 22:139-143
- Kumar PKR. Lonsane BK (1987c) Potential of fed-batch culture in solid-state fermentation for the production of gibberellic acid. *Biotechnol Lett* 9:179-182
- Lapadatescu C. Bonnarme P (1999) Production of aryl metabolites in solid state fermentations of the white rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Biotechnol Lett* 21:763-769
- Makkar RS. Cameotra SS (1999) Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources: *J Surfact Deterg* 2:237-241
- Mudgett RE. Nash J. Ruther R. (1992) Controlled gas environments in solid state fermentations. *Dev Ind Microbiol* 34:1217-1233
- Nigam P (1994) Process selection for protein enrichment: fermentation of the sugars industry by-products molasses and sugar beet pulp. *Proc Biochem* 29:337-342
- Nigam P. Singh D. (1994) Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *J Basic Microbiol* 34:405-423
- Nigam P. Singh D (1996a) Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for microbial protein production. *J Sci Ind Res* 55:373-380
- Nigam P. Singh D (1996b) Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for cellulolytic enzyme production. *J Sci Ind Res* 55:457-467
- Nigam P Armour G. Banat IM. Singh D. Marchant R (2000) Physical removal of textile dyes from effluents and solid state fermentation of dye-adsorbed agricultural residue. *Biol Res Technol* 72:219-226
- Ohno A. Ano T. Shoda M (1992a) Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin, by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. *Biotechnol Lett* 14:817-822
- Ohno A. Takashi A. Shoda M (1992b) Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett* 14:1165-1168
- Ohno A. Ano T. Shoda M (1993) Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin, by *Bacillus subtilis* N822 in solid state fermentation. *J Ferm Bioeng* 75:23-27
- Ohno A. Takashi A. Shoda M (1995) Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 47:209-213
- Ohno A. Ano T. Shoda M (1996) Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. *Proc Biochem* 31:801-806
- Penalva MA. Rowlands RT. Turner G (1998) The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends Biotechnol* 16:483-489
- Peraica M. Radic B. Lucic A. Pavlovic M (1999) Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull W H O* 77:754-766
- Peypoux F. Bonmatin J11. Wallach J (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:553-563
- Prema P Thakur MS. Prapulla SG. Ramakrishna SV Lonsane BK (1988) Production of gibberellic acid by solid-state fermentation. *Indian J Microbiol* 28:78-81
- Ramana Murthy MV. Mohan EVS. Sadhukhan AK (1999) Cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation. *Proc Biochem* 34:269-280
- Robinson T. McMullan G. Marchant R. Nigam P (2000) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with proposed alternative. *Biol Res Technol* (in press)
- Sandhu DK. Joshi VK (1997) Solid state fermentation of apple pomace for concomitant production of ethanol and animal feed. *J Sci Ind Res* 56:86-90
- Sekar C. Balaraman K (1998) Optimization studies on the production of cyclosporin A by solid state fermentation. *Biol Eng* 18:293-296
- Sekar C. Rajasekar VW. Balarannan K (1997) Production of cyclosporin A by solid state fermentation. *Biol Eng* 17:257-259
- Tomasini A. Fajardo C. Barrios-Gonzalez J (1997) Gibberellic acid production using different solid state fermentation systems. *World J Microbiol Biotechnol* 13:203-206
- Wang HH, Chiou JY. Hong CY. Tein WC (1984) Cephalosporin production by SSF of rice grains. *J Microbiol Immunol* 17: 55-69

Yang SS. Ling MY (1989) Tetracycline production with sweat potato residue by solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 33:1021-1038

Yang SS. Wang JY (1996) Morphogenesis. ATP content and oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid substrate cultivation. *J Appl Bacteriol* 80:545-550

Yang SS. Yuan SS (1990) Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid substrate cultivation on sweet potato residues. *World J Microbiol Biotechnol* 6:236-244

Fecha de Recibo: Agosto 27 de 2002

Fecha de aceptación: Octubre 29 de 2002