

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA
Y CONIDOS DE *Penicillium* sp. AISLADO DE SUELOS DE ARROZ DEL
TOLIMA**



Juan Manuel Duque Vidal
Juan Andrés Gutiérrez Beltrán

TRABAJO DE GRADO

Director:
Ivonne Gutiérrez Rojas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
Bogotá D,C. 2011

Tabla de contenido

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Marco Teórico.....	5
Los residuos de los cultivos de arroz.....	6
Diseño de medios de cultivo.....	6
Objetivo general.....	7
Objetivos Especificos.....	7
Metodología.....	8
Resultados y Discusión.....	11
Conclusiones.....	19
Recomendaciones.....	20
Bibliografía.....	20

DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CONIDIOS DE *Penicillium* sp. AISLADO DE SUELOS DE ARROZ DEL TOLIMA

Resumen

Esta investigación consistió en diseñar y optimizar un medio de cultivo para la producción de biomasa (g L^{-1}) y conidios (conidios mL^{-1}) de un aislamiento de *Penicillium* sp, obtenida de suelos de arroz en el departamento del Tolima, con capacidad para degradar las moléculas de celulosa y hemicelulosa que contienen los residuos de cultivos de arroz. En la primera etapa se evaluaron las fuentes de carbono, glucosa, glicerol, almidón, sacarosa y lactosa por medio de un diseño simple (DS), en donde el almidón y la sacarosa fueron las mejores fuentes para la producción de biomasa y conidios. En la segunda etapa se determinó la influencia de estas dos fuentes de carbono en combinación con fuentes de nitrógeno, aminoácidos (lisina y asparagina) y sales, dando como resultado a la sacarosa, la asparagina y el extracto de levadura como las variables estadísticamente significativas e influyentes, gracias a un diseño Placket-Burman (DPB). En la tercera etapa se optimizaron las concentraciones de estas tres fuentes por medio de un diseño central compuesto (DCC), el cual mostró una superficie de respuesta en donde se observó que el extracto de levadura se puede seguir optimizando para obtener mayores concentraciones de biomasa (g L^{-1}). Por otro lado el modelo obtenido a partir de Log_{10} del recuento de conidios mL^{-1} demostró una relación inversamente proporcional con la concentración del extracto de levadura para la producción de conidios, lo que no permitió obtener un medio de cultivo optimizado para la producción de biomasa y propágulos simultáneamente. El medio de cultivo diseñado y optimizado ($49,17\text{g L}^{-1}$ de sacarosa, 6 g L^{-1} de extracto de levadura, $2,99\text{ L}^{-1}$ de asparagina, sales descritas por Weber y pH 6), fue 3,2 veces mayor en términos de productividad comparado con el DPB del comienzo, y 2,97 veces mayor que el medio comercial YPG en la producción de biomasa.

Palabras clave: DS, DPB, DCC, Extracto de levadura y sacarosa.

Abstract

This investigation consisted of designing and optimizing a medium for the production of biomass (g L^{-1}) and conidia (conidia mL^{-1}) from isolation of *Penicillium* sp, obtained from rice soils in the department of Tolima. It has the capacity to degrade cellulose and hemicelluloses molecules contained within the rice crop residue. In the first stage, carbon, glucose, glycerol, starch, sucrose and lactose sources were evaluated through a simple design (SD). It was found that, starch and sucrose were the best sources of production for biomass (g L^{-1}) and conidia (conidia mL^{-1}). The second stage determined the influence that these two sources of carbon in combination with nitrogen sources, amino acids (lysine and asparagine) and salts; resulting, sucrose, asparagine and yeast extract, as the statistical significant variables that influence the best production, according to the Placket-Burman design (PBD). In the third stage, concentrations of these three sources were optimized using a central composite design (CCD), which showed a surface response where it was observed that the yeast extract can be further optimized in order to obtain higher biomass concentrations (g L^{-1}). On the other hand, the model obtained from Log_{10} count conidia mL^{-1} showed an inversely proportional relationship in the concentration of the yeast extract for the production of conidia, which did not allow for the obtainment of an optimized culture medium for the simultaneous production of biomass and propagules. The culture medium designed and optimized (49.17 g L^{-1} sucrose 6 g L^{-1} yeast extract, $2.99\text{ asparagine L}^{-1}$, described by Weber salts and pH 6) was 3.2 times higher in productivity compared with the beginning of BDP and 2.97 times higher than the commercial medium YPG biomass production.

Key words: SD, PBD, CCD, yeast extract, sucrose

1. Introducción:

En Colombia, la industria arrocera es de gran importancia, ya que el arroz es el tercer producto agrícola en extensión después del café y el maíz, además representa el 13% del área cosechada y el 30% de los cultivos transitorios. Esta actividad es responsable del 6% del valor de la producción agropecuaria y el 10% de la actividad agrícola. Por otro lado, en términos competitivos la industria presenta indicadores de mejoramiento que se reportan en menores precios al productor y al consumidor, bajos costos de producción por tonelada si se compara con los observados en los Estados Unidos y rendimientos por hectárea por encima del promedio mundial (1).

A pesar de la importancia económica, un alto rendimiento en la producción de arroz tiene un costo ambiental significativo, ya que en términos generales el 50% del peso seco de las plantas de este producto está compuesto por paja y otros componentes considerados como residuos después de la cosecha; con base en lo anterior, se establece que por cada tonelada de arroz cosechado 1,35 toneladas de residuos de arroz permanecen en el suelo. A nivel de post- cosecha las quemadas a cielo abierto se deben realizar después de 3 a 4 días de la cosecha, ya que aún se encuentran muy húmedos como para realizar la quema, en este periodo se realizan emisiones de CO₂ debido a la alta humedad y a la descomposición de los residuos. A pesar de esto, es la quema a cielo abierto la que se establece como uno de los principales contaminantes ambientales en la emisión de CO₂ debido a la magnitud de residuos que deben ser quemados, ya que a nivel mundial se producen más de 577 millones de toneladas métricas de arroz anualmente (2). Estos residuos podrían ser empleados como materia prima abundante y de bajo costo para la producción de combustibles renovables y otros compuestos químicos como el papel, sin embargo las prácticas agrícolas que se realizan en el tratamiento de residuos para emplearlos de esa forma salen excesivamente costosas para los arroceros en términos económicos de tratamiento y transporte, por lo que la mayoría sigue recurriendo a quemadas a cielo abierto (1).

Por otro lado, se han realizado investigaciones en las cuales se utilizan microorganismos con potencial enzimático para la degradación de este tipo de residuos agrícolas. Estas estrategias novedosas y en desarrollo han utilizado cepas como *Penicillium sp*, hongos con la capacidad de sintetizar enzimas celulolíticas estables y altamente activas que pueden llegar a degradar los componentes de los residuos agrícolas mencionados anteriormente, desarrollando así alternativas limpias y naturales para controlar la acumulación de espiga y cascarilla de arroz en cultivos (3,4).

Paralelo a esto, se han reportado numerosas investigaciones en donde la optimización de medios de cultivo ha sido una alternativa para obtener altas concentraciones de biomasa como también metabolitos secundarios, en donde se emplean fuentes comerciales de fácil asimilación que satisfacen los requerimientos nutricionales como glucosa, extracto de levadura, sacarosa y almidón, las cuales favorecen el crecimiento y el desarrollo de los

microorganismos (5). Estos reportes han estado basados en procesos de optimización estadística en donde las técnicas y experimentaciones que se llevan a cabo involucran el estudio de muchos parámetros bioquímicos y físicos, se ha venido trabajando principalmente con cultivos de bacterias y células animales, y solo en los últimos años se han venido diseñando y optimizando medios de cultivo para hongos por medio de diseños Plackett-Burman, los cuales proporcionan una forma eficiente de evaluar un gran número de variables y la identificación de las respuestas más importantes que arrojan los experimentos (6). Una vez se han identificado las variables más significativas, la optimización de éstas se puede lograr mediante superficies de respuesta, las cuales, proveen modelos estadísticos que revelan la interacción de estas variables a distintos niveles, y así determinar los niveles óptimos para obtener las respuestas deseadas del experimento (7).

Con base en lo anterior, a nivel de aplicación en campo es necesario el desarrollo de un medio de cultivo específico para el crecimiento de *Penicillium* sp, en donde se puedan obtener las mayores concentraciones de biomasa y conidios que puedan abarcar las extensas áreas de residuos que se quieren degradar, es por esto que el presente trabajo se enfoca en diseñar un medio de cultivo con los requerimientos nutricionales más significativos y optimizar las concentraciones de éstos para el crecimiento de *Penicillium* sp.

2. Marco teórico

2.3 Género *Penicillium*.

Las especies de este género se caracterizan por ser saprófitas oportunistas, ubicuas en el medio ambiente, pertenecientes a la familia *Deuteromycota*, Clase *Hyphomycetes* (8). Este hongo es comúnmente encontrado en aislamientos de suelo, ya que tiene la capacidad de degradar residuos vegetales que hacen parte de la materia orgánica del suelo. Esta degradación de residuos está mediada por la síntesis de enzimas hidrolíticas de tipo amilasas, celulasas y xilanasas (9); las cuales determinan la importancia de la presencia de este microorganismo en el suelo, ya que contribuye al flujo de carbono en ecosistemas, al degradar moléculas de alto peso molecular hasta CO₂ (10,11), lo cual favorece el proceso de fotosíntesis en plantas ya que el carácter saprófito de hongos como *Penicillium* sp., determina la capacidad de consumir materia orgánica muerta como fuente de carbono para la producción de CO₂; por otra parte la degradación de residuos de plantas también juega un rol importante en el ciclaje de nutrientes como el nitrógeno (11). Teniendo en cuenta lo anterior, diversas especies de *Penicillium* han sido empleadas para la degradación de compuestos lignocelulósicos que darán origen a azúcares de fácil asimilación, por lo tanto se realizan aplicaciones para el manejo de residuos agrícolas en campo y en pilas de compostaje (12, 13).

2.1 Los residuos de los cultivos de arroz

Los residuos vegetales de los cultivos de arroz se componen principalmente de cascarilla de arroz, ésta a su vez contiene aproximadamente un 24% de celulosa y hemicelulosa, las cuales son macro moléculas que se constituyen por polímeros de azúcares complejos organizados de forma lineal que se componen de subunidades de D-glucosa unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos formando el dímero de celobiosa, por otro lado estas cadenas lineales forman microfibrillas altamente ordenadas conformadas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waal's, lo que le brinda a esta molécula alta estabilidad, insolubilidad y resistencia a hidrólisis enzimática (14).

La degradación del polímero de celulosa está mediada por 3 pasos fundamentales: Reducción de tamaño, pre-tratamiento e hidrólisis enzimática. Esta degradación se basa en una actuación simultánea de endoglucanasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas y β -glucosidasas. Las endoglucanasas ingresan al interior de las moléculas de celulosa de forma aleatoria en los enlaces glucosídicos β -1-4, lo que produce cadenas más cortas y con mayor cantidad de sitios activos para que las exoglucanasas rompan los extremos de las cadenas de celulosa liberando celobiosa y glucosa. Paralelo a esto la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa y otros oligómeros formados durante la hidrólisis para liberar más glucosa (15).

Por otro lado los residuos vegetales también están compuestos por lignina, una macro molécula que se caracteriza por ser un polímero aromático que se encuentra en las paredes celulares de organismos del reino vegetal, La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico); el acoplamiento de estas estructuras da origen a un polímero amorfo, de forma muy compleja en relación a su estructura y heterogeneidad (16).

2.2 Diseño de medios de cultivo

Para el cultivo de microorganismos, plantas, células animales y tejidos se necesita un medio de cultivo que contenga los elementos bioquímicos necesarios para el crecimiento, el cual, a su vez dependerá de tres factores: 1) la composición del medio debe reflejar la composición elemental del microorganismo, 2) los elementos del medio deben encontrarse o estar disponibles en moléculas que puedan ser absorbidas y metabolizadas por el organismo, 3) Para la preparación en el laboratorio el número de componentes y combinaciones debe ser lo más sencillo posible (17). Con base en lo anterior, cuando se tiene por objetivo el cultivo y el crecimiento exitoso de un microorganismo es necesario tener en cuenta el tipo de microorganismo que se tiene, las fuentes más apropiadas para su crecimiento y el contexto al que será aplicado en la industria, esto con el fin de preservar las características de interés que tiene durante su cultivo (expresiones enzimáticas, metabolitos, tipo de sustratos que es capaz de degradar etc). Para esto los medios de cultivo juegan un papel fundamental, pues van a permitir obtener la mayor

concentración de biomasa o la mejor actividad degradadora de polímeros, lo que traerá como resultados tratamientos exitosos como la degradación de sustratos específicos u otras aplicaciones biotecnológicas con cepas específicas (2,3).

Durante la selección de las fuentes nutricionales que va a tener el medio de cultivo es indispensable utilizar herramientas estadísticas que arrojan y permiten analizar el número de experimentos y combinaciones necesarios para obtener resultados estadísticamente confiables, resultados que no solo permiten comparar la efectividad entre las distintas fuentes si no la concentración más apropiada para el microorganismo. Para esto, los diseños experimentales son fundamentales en la obtención de resultados basados en la biomasa producida, indicadores de crecimiento o degradación de sustrato (4).

Durante el diseño y la optimización de un medio de cultivo, el diseño experimental puede contener en su primera etapa un diseño simple el cual maneja entre una y tres variables, en donde se analizan las respuestas más significativas de cada una de ellas sobre alguna variable dependiente de éstas. Posterior a esto, el diseño experimental puede volverse más complejo en cuanto al número como a la interacción entre distintas variables, por lo que se recurre a herramientas como el diseño factorial completo, el cual puede arrojar demasiados tratamientos o experimentos para la investigación, un ejemplo de esto se puede ver reflejado para un estudio que pretenda analizar el comportamiento de 10 variables, ya que al calcular el número de tratamientos se tendrían que realizar 1024 experimentos. Con base en lo anterior, muchas investigaciones consideran suponer que la influencia de las interacciones de tercer orden o superior son insignificantes y por ende pueden ser excluidas del modelo polinomial, en este tipo de casos se recurre a un diseño factorial recortado, en donde sólo se determinan los efectos principales suficientes para obtener una significancia estadística (18). De esta manera, se podrán escoger las fuentes nutritivas más significativas para el microorganismo con un menor número de experimentos y con resultados estadísticamente significativos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general:

Diseñar y optimizar un medio de cultivo a partir de fuentes nutricionales comerciales para la producción de biomasa y conidios de *Penicillium* sp., aislada a partir de suelos de arroz del Tolima

3.2 Objetivos específicos:

1. Seleccionar las fuentes de carbono, nitrógeno, micronutrientes y factores de crecimiento (lisina y asparagina) adecuadas para la producción de biomasa y conidios de *Penicillium* sp.
2. Optimizar las concentraciones de las fuentes de carbono, nitrógeno, sales, aminoácidos seleccionadas.

3. Validar los resultados obtenidos de concentraciones óptimas de las fuentes seleccionadas para el crecimiento de biomasa de *Penicillium* sp.

4. Metodología

4.1. Microorganismo.

El hongo *Penicillium* sp utilizado para la presente investigación fue aislado a partir de una muestra de suelo de un cultivo de arroz en el departamento del Tolima. La reactivación del aislamiento se realizó en agar PDA, la siembra se realizó a partir de un vial conservado en agua destilada en condiciones de refrigeración, el cual se incubó a 30°C durante 10 días. A partir de la siembra, se realizó el respectivo banco de trabajo, el cual consistió en agregar 1 mL de agua destilada en 30 crioviales, a los que posteriormente se les agregó un disco de agar con el microorganismo crecido, los crioviales fueron conservados a 4°C en la nevera de conservación de cepas del laboratorio de Biotecnología Aplicada.

4.2. Condiciones experimentales.

El inóculo se obtuvo sembrando un disco de agar tomado de un criovial previamente conservado con el aislamiento de *Penicillium* sp, en agar avena, el cual se incubó a 28°C durante 10 días. Pasado el tiempo de incubación se tomaron 10 discos de agar de 5mm de diámetro, empleando una pipeta Pasteur invertida, y se inocularon en matraces de 250 mL con 45mL del medio a evaluar (Ver diseño experimental), cada medio se incubó a 100 rpm durante 6 días a 27°C. Una vez se cumplió el tiempo de incubación, se determinó la biomasa para cada experimento mediante peso seco; para ello se agregó cada medio con el microorganismo crecido en tubos Falcon de 50mL (previamente secados y pesados), se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó la biomasa con solución salina al 0,85%, este procedimiento se repitió tres veces con cada experimento. Posterior a esto, se secó la biomasa en un horno a 80°C; el peso seco fue obtenido pesando diariamente los tubos Falcon hasta obtener peso constante en días consecutivos. Por otro lado a cada muestra se le determinó el recuento total de conidios, mediante cámara de Neubauer, empleando la formula universal de la cámara (Ecuación 1).

Ecuación 1. Formula universal de la cámara de Neubauer.

$$\text{recuento de conidios} = \left[\frac{\text{conidios contados} * \frac{1}{fD}}{0,1\text{mm} * 1\text{mm} * 1\text{mm}} \right] * \frac{1000\text{mm}^3}{1\text{mL}}$$

Dónde: fD = factor de dilución.

4.3 Diseño experimental.

4.3.1 Diseño simple (DS).

Se realizó un diseño simple para la selección de la fuente de carbono. Se evaluaron 5 fuentes de carbono establecidas según bibliografía consultada (19-22). La concentración de cada fuente se determinó ajustando una concentración de carbono constante de 4g por litro de medio, con base en lo anterior la concentración de cada fuente se estableció de la siguiente manera; Glucosa 10gL^{-1} , Almidón 10gL^{-1} , Glicerol $10,2\text{gL}^{-1}$, Sacarosa $9,5\text{gL}^{-1}$ y Lactosa $9,5\text{gL}^{-1}$. La fuente de nitrógeno empleada fue extracto de levadura establecida según bibliografía a una concentración constante de 3gL^{-1} ; el medio base consistió en una solución de sales descrita por Weber ($2\text{gL}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$, $1,4\text{gL}^{-1}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,3\text{gL}^{-1}$ de Urea, $0,3\text{gL}^{-1}\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,3\text{gL}^{-1}\text{CaCl}_2$, $5\text{mgL}^{-1}\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,56\text{mgL}^{-1}\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, $1,4\text{mgL}^{-1}\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), empleada para mantener el potencial osmótico y como fuente de micronutrientes (3).

Para la determinación de la fuente de carbono se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de un factor, para así lograr determinar diferencias significativas entre las fuentes de carbono evaluadas, posteriormente se realizó un análisis Post hoc, para identificar las fuentes de carbono estadísticamente diferentes (SPSS software vs 17).

4.2.2 Diseño Plackett Burman (DPB).

Una vez seleccionadas las mejores fuentes de carbono en términos de producción de biomasa y conidios, se procedió a determinar la influencia de la fuente de carbono en combinación con fuentes de nitrógeno, aminoácidos (Lisina y asparagina) y sales. En la producción de biomasa y conidios por medio de la implementación de un diseño Plackett Burman; las fuentes de nitrógeno, aminoácidos y sales corresponden a: sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y extracto de levadura; ausencia-presencia de Lisina y asparagina (23), y diferentes concentraciones de las sales de Weber.

Las combinaciones y concentraciones de cada fuente se presentan en la Tabla 2. Para la determinación de las variables significativas se realizó un análisis estadístico mediante un ANOVA multivariado, para así lograr determinar las fuentes cuya respuesta es significativa en los medios. Para el análisis estadístico de resultados se empleó Design Expert versión 6.0.6.

4.2.3. Diseño Central Compuesto (DCC).

Teniendo en cuenta las variables significativas arrojadas por el Plackett Burman, se realizó un diseño factorial 2^3 , para optimizar la concentración de las variables significativas (sacarosa, asparagina y extracto de levadura); las sales de Weber se emplearon a una concentración del 20%, y el pH se ajustó a un valor constante de 6, para este diseño se modificó el tiempo de incubación a 3 días, esto debido al aumento en el crecimiento del hongo a través del tiempo. La función de cada variable, su interacción y el análisis estadístico para obtener los valores predichos fueron mostrados mediante la aplicación de la siguiente ecuación cuadrática (Ecuación 2):

Ecuación 2.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde Y es la variable de respuesta; X_i y X_j son las variables independientes; β_0 es una constante; β_i es el coeficiente lineal; β_{ii} es el coeficiente cuadrático y β_{ij} es el coeficiente de interacción.

Se obtuvo un total de 15 experimentos incluyendo el punto central y los puntos axiales, cada experimento se realizó por duplicado. Las combinaciones y concentraciones se muestran en la tabla 3. El DCC se muestra como una superficie de respuesta de tres dimensiones (3D). El análisis de los resultados del presente diseño y la representación gráfica se realizó empleando Design Expert versión 6.0.6 como software estadístico.

4.3 Comparación de diseños y validación del modelo para *Penicillium* sp.

Se realizó la comparación de los diseños evaluados (DS, DPB y DCC) en términos de productividad de biomasa (Biomasa $\text{gL}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$), y conidiogénesis (Log_{10} conidios. mL^{-1}); para poder comparar los resultados de la optimización. También se realizó la comparación de los medios evaluados con el medio comercial YPG (Extracto de levadura 10g/L, Peptona 20 g/L y glucosa 20 g/L), con el fin de comparar la biomasa producida empleando este medio y el medio optimizado.

Por otra parte, a partir de los resultados obtenidos en el DCC se procedió a validar el modelo con base en el polinomio de primer orden que se obtuvo del análisis estadístico. Para la validación se reemplazaron las concentraciones arrojadas por el modelo para la máxima obtención de biomasa y de conidios, posterior a la incubación se compararon los resultados experimentales con los valores predictivos arrojados por el modelo, los resultados se analizaron teniendo en cuenta una variación no mayor al 20% respecto al valor proporcionado por el polinomio. Debido a que se evaluaron dos variables de respuesta diferentes (biomasa gL^{-1} y Log_{10} conidios mL^{-1}), se obtuvieron dos polinomios de primer orden en el DCC. Para la producción de biomasa se empleó la siguiente formulación: Sacarosa 49,17 gL^{-1} , Extracto de levadura 6 gL^{-1} , Asparagina 2,99 g L^{-1} ; respecto a la producción de conidios la formulación fue: Sacarosa 50g/L, Extracto de levadura 3g L^{-1} .

5. Resultados y discusión.

5.1. Diseño simple.

En la Figura 1 se muestra los resultados experimentales del diseño simple para determinar la fuente de carbono teniendo en cuenta el peso seco y el recuento de conidios. El análisis de varianzas (ANOVA), mostró una significancia de 0,059 para biomasa y 0,034 para conidios, lo cual indica que hay diferencias significativas entre las fuentes de carbono empleadas (Ver anexo 1). Las pruebas Post hoc mostraron que la sacarosa, la lactosa y el almidón tuvieron una respuesta estadísticamente igual para la producción de biomasa, respecto a la conidiogénesis las fuentes cuya respuesta fue estadísticamente igual fueron la sacarosa y el almidón (Ver anexo 1). Por lo tanto se decidió evaluar como fuentes de carbono a optimizar la sacarosa y el almidón, debido a que fueron las variables con mayor influencia en la producción de biomasa y conidios. Especies de *Penicillium* sp., aisladas a partir de suelo poseen la capacidad de sintetizar amilasas de alta estabilidad, las cuales actúan en la degradación del almidón presente en las plantas como reserva de energía, de esta manera degradan este polímero para la obtención de glucosa, lo cual justifica el mayor crecimiento de biomasa y producción de conidios empleando almidón como fuente de carbono (9). Por otro lado se ha reportado el uso de sacarosa en medios de cultivo para la producción de biomasa de *Penicillium* sp, debido a la producción de la enzima invertasa capaz de desdoblar la sacarosa e hidrolizarla para producir una molécula de fructosa y otra de glucosa (24- 26). *Penicillium* tiene la capacidad de integrar moléculas de fructosa al metabolismo por medio de la glicolisis en donde entra a fructosa 6 fosfato (27), por ende la sacarosa resulta una fuente adecuada en la producción de biomasa de *Penicillium* sp.

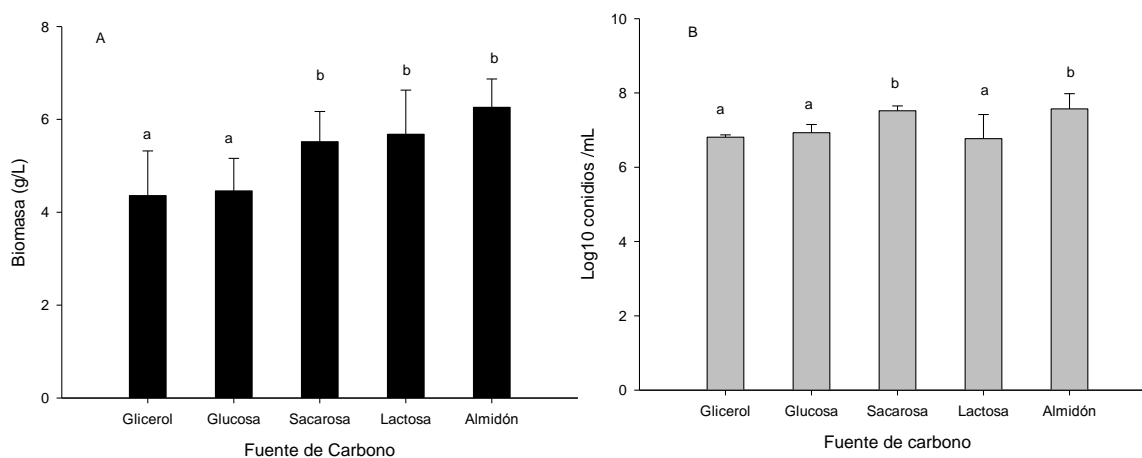


Figura 1. Biomasa (A), conidios (B) de *Penicillium* sp. empleando diferentes fuentes de carbono. La respuesta fue estadísticamente igual en las barras con letras iguales

Por otro lado se pudo evidenciar el crecimiento de *Penicillium* sp. con forma de pellets, los cuales variaron en morfología y tamaño según la fuente de carbono evaluada (Datos no mostrados), los pellets con mayor regularidad en morfología y tamaño, se encontraron en los medios que contenían glucosa y sacarosa como fuente de carbono, el medio con mayores irregularidades en los aspectos mencionados fue el que contenía almidón como fuente de carbono. Entre los factores que afectan la morfología de los pellets en hongos están la difusión de oxígeno y nutrientes, por lo tanto algunos nutrientes de compleja asimilación pueden generar variaciones en las morfologías de los pellets, lo cual puede afectar la estabilidad del mismo ocasionando lisis (28).

5.2 Diseño Placket Burman (DPB).

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a biomasa gL^{-1} y el Log_{10} del recuento de conidios, teniendo en cuenta las combinaciones obtenidas por el diseño Placket Burman; por otra parte en la Tabla 2 se muestra el análisis estadístico realizado para los resultados de biomasa y conidios del diseño anteriormente mencionado. Con respecto a la biomasa, el análisis estadístico muestra una significancia del 0.0271 ($R^2=0,9734$), lo cual indica que es estadísticamente significativo y que solo un 2,71% de la variación total no puede ser explicada por el modelo propuesto. Dentro de las variables evaluadas, se obtuvo una respuesta significativa por parte de la Sacarosa, Almidón y Asparagina al nivel 5%; y extracto de levadura al nivel 10% (Ver Tabla 3); la variable más influyente fue la sacarosa ($F= 53,67$), por lo cual se estableció trabajar con ésta como única fuente de carbono, debido a su significancia y mayor influencia, junto con la morfología regular de los pellets formados por el hongo en cultivo sumergido, respecto al almidón.

Con base en lo anterior se escogieron 3 variables para optimizar su concentración, sacarosa ($p = 0,0053$), extracto de levadura ($p = 0,0620$) y asparagina ($p = 0,0266$), las cuales obtuvieron un coeficiente estimado de 0,62, 0,24 y 0,34 respectivamente; lo que significa que a mayor concentración de estos componentes se espera mayor producción de biomasa de *Penicillium* sp. El diseño también arrojó que las variables $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sales de Weber y el pH no tuvieron influencia significativa, por consiguiente se decidió emplear a valores constantes las sales de Weber al 20% y el pH igual a 6.

Tabla 1. Respuesta de la biomasa y recuento de conidios mediante un diseño Plackett Burman.

Run	Sacarosa gL^{-1}	Almidón gL^{-1}	Extracto de levadura gL^{-1}	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gL^{-1}	Sales %p/v	Lisina gL^{-1}	Asparagina gL^{-1}	pH	Biomasa peso seco gL^{-1}	Log_{10} Conidios mL^{-1}
1	10,2	10	0	3	30	0	3	5	15,05 ± 0,05	5,88 ± 0,05
2	0	10	0	0	10	6	3	7	7,34 ± 0,043	5,06 ± 0,09
3	10,2	10	0	3	10	0	0	7	6,83 ± 0,01	6,05 ± 0,05
4	0	0	0	0	10	0	0	5	0,097 ± 0,02	6,25 ± 0,15
5	0	0	3	3	30	0	3	7	2,59 ± 0,01	5,56 ± 0,06

6	10,2	0	3	0	10	0	3	7	9,75 ± 0,01	6,17 ± 0,13
7	10,2	0	0	0	30	6	3	5	7,42 ± 0,03	5,37 ± 0,21
8	10,2	10	3	0	30	6	0	7	12,13 ± 0,01	5,35 ± 0,49
9	10,2	0	3	3	10	1	0	5	9,3 ± 0,01	6,28 ± 0,14
10	0	0	0	3	30	1	0	7	0,87 ± 0,01	6,47 ± 0,03
11	0	10	3	3	10	1	1	5	7,85 ± 0,01	5,54 ± 0,03
12	0	10	3	0	30	0	0	5	4,03 ± 0,00	7,54 ± 0,21

Tabla 2. Análisis de varianza diseño Plackett Burman

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Valor de F	Significancia
Variable: Biomasa gL⁻¹					
Modelo	9,33	8	1,17	13,74	0,0271*
A: Sacarosa	4,56	1	4,56	53,67	0,0053*
B: Almidón	2,31	1	2,31	27,26	0,0137*
C: Extracto de Levadura	0,72	1	0,72	8,47	0,0620**
D: (NH ₄) ₂ SO ₄	0,013	1	0,013	0,15	0,7238
E: Sales	0,088	1	0,088	1,03	0,3839
F: Lisina	0,17	1	0,17	1,99	0,2534
G: Asparagina	1,41	1	1,41	16,64	0,0266*
H: pH	0,062	1	0,062	0,73	0,4550
Residual	0,25	3	0,085		
Total Corr	9,59	11			
R² = 0,9734; R² ajustado = 0,9026; Precisión adecuada = 10,715					
Variable: Log10 Conidios					
Modelo	3,31	8	0,41	0,81	0,6401
A: Sacarosa	0,15	1	0,15	0,29	0,6284
B: Almidón	0,039	1	0,039	0,076	0,8006
C: Extracto de Levadura	0,15	1	0,15	0,30	0,6231
D: (NH ₄) ₂ SO ₄	1,35E-4	1	1,35E-4	2,646E-4	0,9880
E: Sales	0,057	1	0,057	0,11	0,7606
F: Lisina	0,95	1	0,95	1,86	0,2658
G: Asparagina	1,57	1	1,57	3,07	0,1781
H: pH	0,40	1	0,40	0,79	0,4400
Residual	1,53	3	0,51		
Total Corr	4,84	11			
R² = 0,6840; R² ajustado = -0,1587; Precisión adecuada = 3,256					

*Valores significantes al nivel 5%.

**Valores significantes al nivel 10%.

Los resultados obtenidos coinciden con lo esperado debido a que hongos heterótrofos como *Penicillium* sp., tienen mayor producción de biomasa cuando se emplean fuentes de nitrógeno orgánicas como el extracto de levadura, comparado con fuentes de nitrógeno inorgánicas como el sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), lo anterior se debe a que en la composición del extracto de levadura se encuentran aminoácidos esenciales que actúan como cofactores de crecimiento, lo cual aumenta los rendimientos en la producción de biomasa (27), por otro lado también está reportado que las fuentes de nitrógeno orgánicas son de lenta degradación debido a su complejidad estructural, lo cual favorece el proceso

de oxidación del amonio ya que no se presenta acumulación de intermediarios en la producción de nitratos que serán asimilados por el hongo (30). Por otra parte la influencia positiva de la asparagina puede deberse a que la degradación de este aminoácido está implicada en la síntesis aminoácidos esenciales para el crecimiento como el glutamato y la síntesis de macromoléculas como proteínas (11,27).

Respecto al recuento de conidios, los resultados mostraron que el modelo no es estadísticamente significativo ($p = 0,6401$); lo cual puede deberse a que en cultivos sumergidos no se ve favorecida la producción de conidios, ya que en estudios realizados por Boualem *et al*; en el año 2008, se evaluó la expresión de genes involucrados en el proceso de conidiogénesis en cultivo sumergido y en cultivo sólido, en donde se comprobó que la expresión de los genes involucrados en la diferenciación de las estructuras especializadas para la producción de conidios, denominadas fialides, no se da de manera eficiente en cultivo sumergido, paralelo a esto, se observó microscópicamente la ausencia de fialdes en cultivo sumergido; por lo tanto en el estudio mencionado se llegó a la conclusión de que la producción de conidios esta mediada por genes que no se expresan de manera eficiente en cultivo sumergido (31). Otro aspecto a tener en cuenta es que en las últimas décadas la optimización de medios de cultivo para la producción de conidios por especies de *Penicillium* esta orienta a procesos de fermentación sólida, debido a que se obtienen mayores rendimientos a menores costos respecto a la fermentación líquida (32-34). A pesar de los resultados obtenidos se decidió seguir evaluando la conidiogénesis como variable de respuesta en el diseño central compuesto para determinar si la optimización de las concentraciones tenía una respuesta significativa en este proceso.

5.3 Diseño Central compuesto (DCC).

En la tabla número 3 se muestran los experimentos realizados a diferentes concentraciones con las variables estadísticamente significativas e influyentes que arrojó el Plackket Burman, esto con el fin de lograr la optimización en la concentración de sacarosa, extracto de levadura y asparagina con respecto a las variables de respuesta (biomasa y conidios). Además muestra los valores predictivos que el DCC propone como respuesta a la interacción de las variables.

Tabla 3. Combinaciones diseño central compuesto

Run	Sacaros a gL ⁻¹	Extracto de levadura gL ⁻¹	Asparagina gL ⁻¹	Biomasa peso seco gL ⁻¹		Log ₁₀ Conidios mL ⁻¹	
				Experimental	Predicho	Experimental	Predicho
1	50	6	0	20,107	19,688	5,587	5,49
2	40	7,02	1,50	19,196	25,280	5,062	5,15
3	40	1,98	3	11,622	10,591	5,947	6,09
4	50	3	3	14,744	14,296	6,061	5,94
5	50	6	3	23,878	24,047	5,183	5,39

6	56,82	4,50	1,50	16,878	17,116	5,776	5,78
7	50	3	0	9,481	11,705	5,902	6,05
8	23,18	4,5	1,50	17,185	15,643	5,127	5,46
9	40	4,50	4,02	22,063	19,298	5,566	5,53
10	40	4,50	0	19,711	13,874	5,802	5,71
11	30	6	3	23,637	22,874	5,527	5,20
12	30	6	0	18,893	18,728	5,171	5,30
13	30	3	3	11,730	13,599	5,703	5,76
14	40	4,50	1,50	18,493	16,281	5,798	5,62
15	30	3	0	8,778	11,134	6,133	5,86

Por otro lado, los resultados de la tabla 4 muestra el análisis de varianza (ANOVA) de las distintas concentraciones de las variables evaluadas con respecto a la biomasa en gL^{-1} y Log_{10} del recuento de conidios. El modelo que se obtuvo para la respuesta de biomasa gL^{-1} fue estadísticamente significativo ya que tuvo un valor de $p=0.0016$ ($R^2=0.7367$), como se expresó anteriormente este valor refleja que tan solo el 0.16% de la varianza no es explicada por este modelo. El extracto de levadura mostró una significancia igual a 0.0003 con un valor de $F=26.82$, lo que significa que esta variable es la más influyente sobre la respuesta de la biomasa de *Penicillium sp.* Por otro lado la asparagina fue la otra variable estadísticamente significativa en la producción de biomasa en gL^{-1} con un nivel de significancia del 10% con un $p=0.0806$. El coeficiente estimado igual a 0.26 para extracto de levadura y 0.096 de asparagina (ver anexo 4), reflejan una relación directamente proporcional de estas dos fuentes nutricionales con la biomasa al ser valores positivos, es decir a mayor extracto de levadura y asparagina mayor producción de biomasa, dentro de los rangos evaluados.

Los resultados obtenidos con respecto al Log_{10} del recuento de conidios (Tabla 4) arrojaron que el modelo es estadísticamente significativo con un $p=0.0022$ ($R^2=0.7218$). en éste, las distintas concentraciones de extracto de levadura también ejercieron una varianza estadísticamente significativa con un $p=0.0004$ a un nivel de significancia del 5% y con una influencia de 24.83, sin embargo a pesar de que ésta es la variable significativa del modelo, a diferencia de la biomasa mostró un coeficiente estimado igual a -0.28, es decir la concentración de esta fuente de nitrógeno ejerce un efecto negativo sobre la conidiogénesis, lo que indica que a menores concentración de extracto levadura mayor será la producción de conidios.

Tabla 4. Análisis de varianza Diseño Central Compuesto

Efecto	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	Valor de F	Significancia
Variable: Biomasa gL^{-1}					
Modelo	1.06	3	0.35	10.26	0.0016
A: Sacarosa	8.866E-0.003	1	8.866E-0.003	0.26	0.6212
B: Extracto de levadura	0.92	1	0.92	26.82	0.0003

C: Asparagina	0.13	1	0.13	3.7	0.0806
Residual	0.38	11	0.034		
Total Corr	1.43	14			
R² = 0.7367; R² ajustado = 0.6649; Precisión adecuada = 9.129					
Variable: Log10 Conidios					
Modelo	1.23	3	0.41	9.51	0.0022
A: Sacarosa	0.12	1	0.12	2.84	0.1202
B: Extracto de levadura	1.07	1	1.07	24.83	0.0004
C: Asparagina	0.037	1	0.037	0.87	0.371
Residual	0.47	11	0.043		
Total Corr	1.7	14			
R² = 0.7218; R² ajustado = 0.6459; Precisión adecuada = 8.783					

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos por el modelo del DCC, donde el modelo que mejor ajustó al planteamiento realizado fue un polinomio de primer orden, tanto para biomasa como para conidios. Las ecuaciones obtenidas se muestran a continuación:

Ecuaciones 4 y 5.

4)

$$\ln(\text{biomasa}) = 1,81762 + (2,54789E - 3)A + 0,17305 B + 0,064285C$$

5)

$$\text{Log} \frac{\text{Conidios}}{\text{mL}} = 6,13593 + (9,45316E - 3)A - 0,18641B - 0,034886C$$

Donde: A= concentración de sacarosa, B= concentración de extracto de levadura, C= concentración de asparagina.

En la grafica A de la Figura 2 se puede observar el crecimiento de la biomasa (gL^{-1}) en respuesta a mayores concentraciones de extracto de levadura y asparagina. Por otro lado, en la grafica B se observa un efecto negativo del extracto de levadura a mayores concentraciones en la producción de conidios (conidios.mL^{-1}). Según el modelo obtenido para la respuesta de conidios, esta fuente de nitrógeno es la única variable significativa, lo cual, se puede observar al ver la poca influencia que tienen distintos niveles de sacarosa para la producción de estas estructuras.

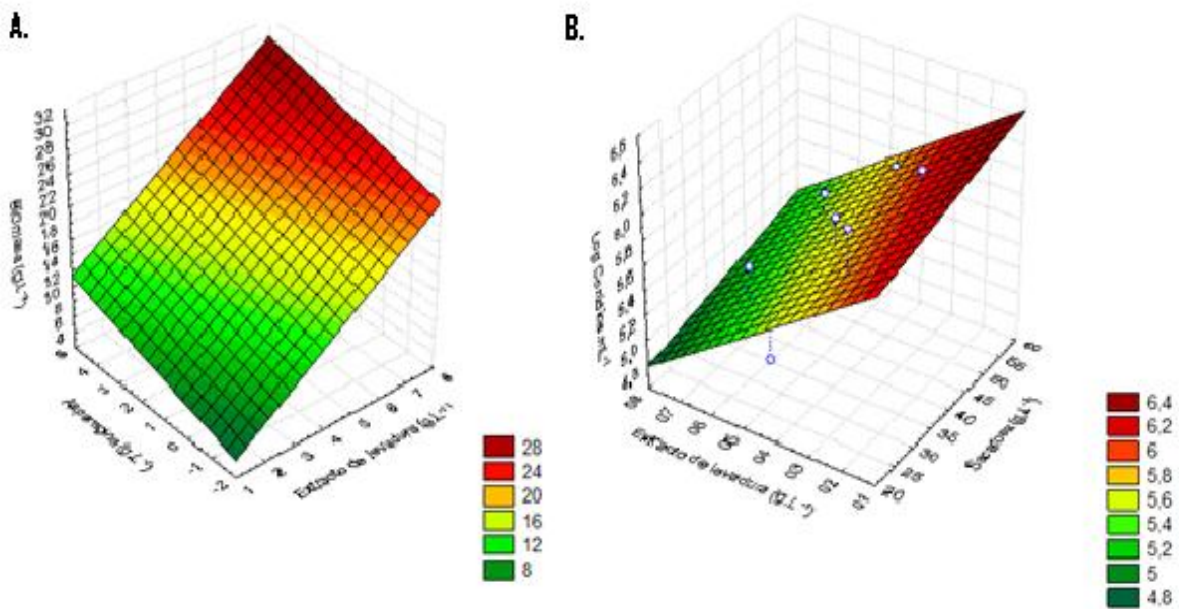


Figura 2. Superficie de respuesta de: **A)** biomasa gL^{-1} según la influencia del extracto de levadura y Asparagina, **B)** Log_{10} Conidios mL^{-1} Según la influencia del extracto de levadura y la sacarosa.

Los resultados obtenidos por el DCC, muestran al extracto de levadura como la fuente nutricional que más efecto ejerció sobre *Penicillium* sp, además concuerdan con los resultados que se han discutido con respecto a la conidiogénesis, ya que en la grafica B se observa una relación inversamente proporcional de la concentraciones de extracto de levadura con la producción de estas estructuras reproductivas. A diferencia de lo anterior, si se pretende obtener mayores concentraciones de biomasa, la grafica A refleja que se podría seguir optimizando la concentración del extracto de levadura.

Como se dijo anteriormente la producción de conidios en un cultivo sumergido no es muy eficiente, estudios anteriores afirman como la mayoría de hongos filamentosos se mantienen en forma vegetativa cuando están en cultivos sumergidos, lo que respalda otras investigaciones que han diferenciado características y estructuras de este tipo de micelios con respecto a los micelios aéreos que crecen en medios sólidos. De acuerdo a lo anterior el micelio que se genera en cultivo sumergido puede tener ciertas características que mantienen baja la síntesis de conidios, además estas investigaciones también hacen referencia a como distintas fuentes de nitrógeno inorgánicas juegan un papel importante en la conidiogénesis, ya que obtuvieron una mayor síntesis de propágulos con KNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ principalmente (35,36). A diferencia de esas investigaciones, el diseño y la optimización de este medio de cultivo no contiene fuentes inorgánicas de nitrógeno pues cuando se evaluó el sulfato de amonio y el extracto de levadura, fue el último el que obtuvo una diferencia significativa en el Plackett Burman para optimizar biomasa.

Por otro lado en una revisión bibliográfica realizada por Roncal y Ugalde en el año 2003, respecto a la inducción de la conidiogénesis en el género *Penicillium*, se reporta que en condiciones limitadas de nitrógeno a nivel nutricional y ambiental, se ve favorecida la producción de estas estructuras (37), el estudio citado corrobora los resultados obtenidos anteriormente en cuanto a la influencia de las concentraciones de extracto de levadura evaluadas en el modelo.

5.4. Comparación de diseños y Validación del modelo para *Penicillium* sp.

Se realizó la comparación entre los medios con mayor producción de biomasa de los diseños montados (DS, DPB, y DCC); como control se empleó el medio YPG; los resultados se expresaron en términos de productividad y se muestran en la Gráfica 3. Estos resultados muestran mayor productividad para el DCC a comparación de los otros diseños evaluados y el control. Por lo tanto se dió una respuesta significativa debido a que la productividad fue 3,2 veces mayor comparado con el DPB, y 2,97 veces mayor que el medio control, lo cual significa un resultado positivo, ya que, se logró una optimización de concentraciones de las fuentes evaluadas con respecto a las fuentes de carbono y nitrógeno orgánicas que utilizan medios como el YPG y que son ampliamente utilizados en cultivo de hongos filamentosos como *Penicillium* sp. Por estimular el crecimiento en hongos saprófitos (25, 38, 39).

Paralelo a esto se realizó la comparación de los medios con mayor producción de conidios en cada diseño montado (DS, DPB y DCC); y el control YPG. Los resultados obtenidos ratifica la hipótesis planteada respecto a la producción de conidios en cultivo sumergido. Por otra parte también se ratifica la hipótesis a cerca de la influencia que tienen las bajas concentraciones de nutrientes en la producción de conidios, debido a que tanto en el control usado como en el DCC se emplearon fuentes de carbono y nitrógeno en altas concentraciones en comparación con el DS y DPB, y se obtuvieron valores menores para la conidiogénesis.

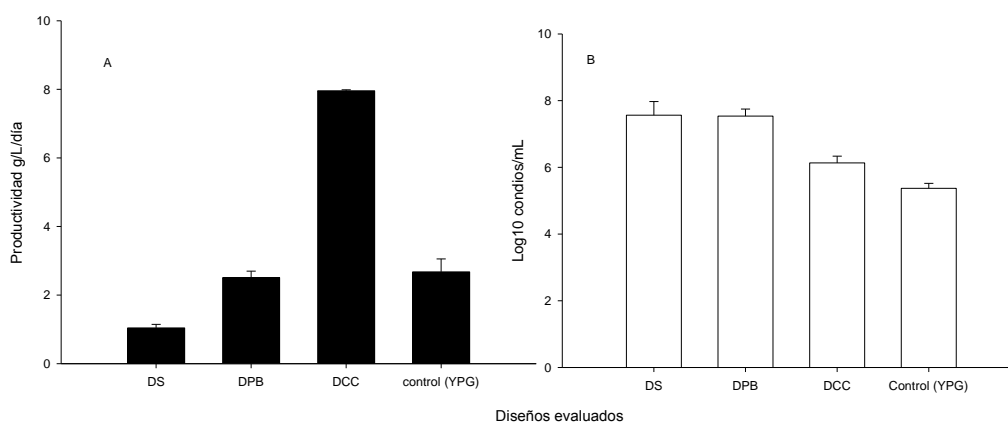


Figura 3. Parte A, Productividad de la biomasa máxima en cada diseño evaluado. Parte B producción máxima de conidios en cada diseño evaluado. Diseño simple biomasa obtenida con almidón como fuente de carbono; DPB Diseño Plackett-Burman medio 1; DCC Diseño central compuesto Medio 5, medio control.

La Figura 4, muestra los resultados de la validación de los polinomios de primer orden obtenidos, tanto para la producción de biomasa como para la producción de conidios (Ecuación 4 y 5) por parte de *Penicillium* sp. Estos resultados fueron satisfactorios, ya que para poder realizar la validación efectiva de los modelos obtenidos en el DCC se esperaba una variación menor al 20% entre los resultados predichos por el modelo, y los resultados obtenidos experimentalmente. Se obtuvo una variación igual a 7,6% para el modelo de producción de biomasa, y 9,3% para la producción de conidios; lo cual significa que se logró la validación efectiva de los modelos obtenidos, debido a que los resultados experimentales estuvieron muy cercanos a los predichos por el mismo.

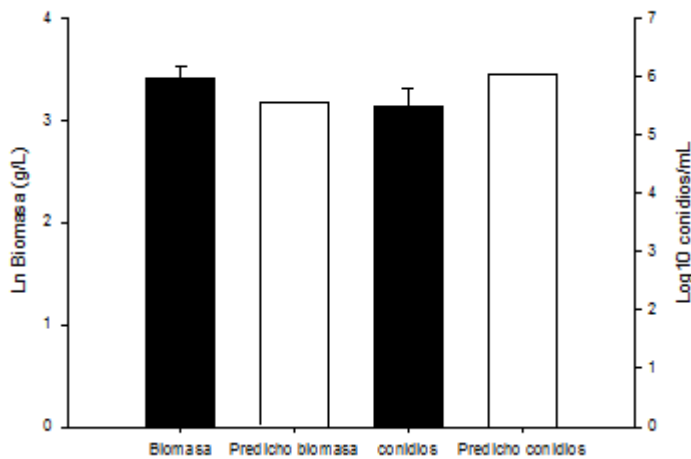


Figura 4. Validación del modelo obtenido en el DCC. Las barras color negro corresponden a los resultados obtenidos. Las barras color blanco corresponden a los resultados predichos por el modelo.

6. Conclusiones.

Se logró la optimización de un medio para la producción de biomasa de *Penicillium* sp. La composición para la máxima producción de biomasa fue: medio base de sales descrito por Weber (3), suplementado con $49,17\text{g L}^{-1}$ de sacarosa, 6 g L^{-1} de extracto de levadura, $2,99\text{ L}^{-1}$ de asparagina, el pH fue ajustado a un valor de 6. El medio obtenido tuvo una productividad 2,97 veces mayor a un medio comercial empleado para el crecimiento de hongos. Se logró validar el modelo obtenido con un 7,6% de variación respecto a las predicciones realizadas por el mismo. Respecto a la producción de conidios se logró validar un modelo propuesto para su producción, en donde se evidenció el efecto negativo del extracto de levadura sobre la conidiogénesis, sin embargo los resultados

condujeron a que en la fermentación líquida no fue posible realizar la optimización en la producción de estas estructuras.

7. Recomendaciones

Se recomienda seguir optimizando el extracto de levadura como fuente para la producción de biomasa de *Penicillium* sp., debido a que esta es la variable más influyente en el modelo propuesto.

Por otro lado se recomienda que para la optimización del medio en la producción de conidios, se empleen estrategias de fermentación sólida, debido a que está reportado que en medios sólido se favorece el desarrollo de estructuras especializadas para que se de la conidiogénesis de manera efectiva.

Por último se recomienda evaluar la posible represión catabólica para la expresión de enzimas celulolíticas, ocasionada por el medio formulado en la presente investigación.

Bibliografía:

1. Espinal C, Martínez H, Acevedo X. La cadena del arroz en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica. *Ministerio de agricultura y desarrollo rural observatorio agrocadenas Colombia 1991-2005*, 1-5.
2. Kadam K, Forrest L, Jacobson W. Rice straw as a lignocelulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, 2000; **18**; 369-389.
3. Henning J, Astrid M, Kristian B.R, Krogh, Lisbeth O. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis, *Enzyme and Microbial Technology*.2004; **36**; 42-48
4. Fuerte A, Garcia E. *Diseño de medios de cultivo para la producción de biomasa de penicillium sp. y paecilomyces sp. aislados de una plantación de arroz en el departamento del Tolima, Tesis de pregrado*, Facultad de ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C, 2010; 2-6.
5. Pareek N, Singh RP, Ghosh S. Optimization of medium composition for enhanced chitin deacetylase production by mutant *Penicillium oxalicum* SAE_M-51 using response surface methodology under submerged fermentation. *Process Biochemistry* 2011; **46**, 1693-1697.
6. Djekrif D, Gheribi A, Meraihi, Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*, 2006; **73**; 190–197.

7. Yishan S, Xiaoyuan Z, Zhongwen H. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. *New Biotechnology* 2011; **28**;40-47.
8. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. Third edition. Springer link 2009, p 169.
9. Sun X, Liu Z, Qu Y, Li X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass_hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Applied Biochemical Biotechnology* 2008; **146**, 119-128.
10. Berner RA. The long-term carbón cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature* 2003; **426**, 323-329.
11. Carlier MJ, Watkinson SC, Gooday GW. *The fungi as mayor group of organisms*. Segunda edición. Elsevier Ltd. 2001, 297-366p.
12. Jorgensen H, Morkeberg A, Krogh KBR, Olsson L. Growth and enzyme ´production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *Journal of Biotechnology* 2004; **109**, 295-299.
13. Mannan S, Fakhru'l-Razi A, Alam MdZ. Optimization of process parameters for the bioconversion of activated sludge by *Penicillium corylophilum*, using response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences* 2007; **19**, 23-28.
14. Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 2006; **24**, 452-481.
15. Zhang YPH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology Bioengineering*. 2004; **88**, 797-824.
16. Anvar U, Buranov G, Mazza. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*. 2008; **28**; 237–259.
17. Dirk H. Spaargaren. The design of culture media based on the elemental composition of biological material. *Journal of Biotechnology*.1996; **45**; 97- 102.
18. Torbjo L, Elisabeth S, Lisbeth A, Bernet T, Nystro A, Jarle P, Rolf B. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 1998; **42**; 3-40
19. Gomes P, Batista J, Aparecida J, Vieira M, Fernandez E. Overexpression of the *plg 1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2008; **35**, 159-166.
20. Ming G, Yan H, Li H, Lian D, Ning Y, He G, Bing J. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2006; **22**, 317-324.
21. Campos C, Fernández FJ, Sierra EC, Fierro F. Improvement of penicillin yields in solid-state and submerged fermentation of *Penicillium chrysogenum* by amplification of the penicillin biosynthetic gene cluster. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2008; **24**, 3017-3022.

22. Qian D, Du G, Chen J. Isolation and culture characterization of a new polyvinyl alcohol-degrading strain: *Penicillium* sp. WSH02-21. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2004; **20**, 587-591.
23. Zeng GM, Yu HY, Huang HL, Huang DL, Chen YN, Huang GH, Li JB. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2006; **22**, 317-324.
24. Ndagijimana M, Chavez-Lopez C, Corsetti A, Tofalo R, Sergi M, Paparella A, Guerzoni ME, Suzzi G. Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology* 2008; **127**, 276-283.
25. Cabañas R, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Cabañes. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish Market. *Food Microbiology* 2008; **25**, 642-647.
26. Rundberget T, Skaar I, Flaoyen A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *International Journal of Food Microbiology* 2004; **90**, 181-188.
27. Henriksen CM, Christensen LH, Nielsen J, Villadsen. Growth energetic and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biotechnology* 1996; **45**, 149-164.
28. Papagianni M, Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology Advances* 2004; **22**, 189-259.
29. Joo AR, Jeya M, Lee KM, Lee KM, Moon HJ, Kim YS, Lee JK. Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry* 2010; **45**, 851-858.
30. Wang L, Yu Q. Study on Characteristics of a strain of *Penicillium* sp. capable of heterotrophic ammonium oxidation. *Agricultural Sciences in China* 2010; **9**(12):1816-1820.
31. Boualem K, Waché Y, Garmyn D, Karbowski T, Durand A, Gervais P, Cavin JF. Cloning an expression of genes involved in conidiation and properties of *Penicillium camemberti* grown in liquid and solid cultures. *Research in Microbiology* 2008; **159**, 110-117.
32. Leudemann V, Greco M, Rodríguez MP, Basílico JC, Pardo AG. Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. *LWT_Food Science and Technology* 2010; **43**, 315-318.
33. Pandey A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 1992; **27**, 109-117.
34. Liu YT, Luo ZY, Long CN, Wang HD, Long MN, Hu Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran. *New Biotechnology* 2011; **28**(6): 733-737.

35. Krasniewski I, Molimard P, Feron G. Impact of solid medium composition on the conidiation in *Penicillium camemberti*. *Process Biochemistry* 2006; **40**,1318–1324.
36. Marzluf G. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**, 17–32.
37. Roncal T, Ugalde U. Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology* 2003; **154**, 539-546.
38. Kokkonen M, Jestoi M, Rizzo A. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 2005; **99**, 207-214.
39. Ak O, Guray T. Isolation of a chitosan degrading fungus, *Penicillium spinulosum*, and chitosanase production by the isolate. *Studies in Organic chemistry* 1998; **53**, 265-268.