

300627

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

8
Zej



CARACTERIZACION DE CEPAS DE

Penicillium chrysogenum

DE ALTA Y BAJA PRODUCTIVIDAD RELATIVA

(PS/PL) DE PENICILINA G.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS

Que para obtener el grado de Licenciatura en:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

TERESA EUGENIA CASTILLO GOMEZ.

Director: Q.B.P. Guadalupe Morales Meza.



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.

I N D I C E G E N E R A L .

INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCION.	1
2. OBJETIVOS.	4
3. ANTECEDENTES.	5
3.1. METABOLISMO SECUNDARIO.	5
3.2. PENICILINA.	9
3.3. FERMENTACION EN MEDIO LIQUIDO (FL).	17
3.4. FERMENTACIONES EN MEDIO SOLIDO.	20
3.5. COMPARACION ENTRE LA FERMENTACION EN MEDIO LIQUIDO Y EN MEDIO SOLIDO.	24
3.6. PRODUCCION DE PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA.	26
4. MATERIAL Y METODOS.	28
4.1. MICROORGANISMOS.	28
4.2. MEDIOS DE CULTIVO.	28
4.3. REACTIVOS	33
4.4. METODOS.	34
5. RESULTADOS.	41
5.1. FERMENTACION COMPARATIVA EN SOLIDO Y EN LIQUIDO PARA LAS DIFERENTES CEPAS.	41
5.2. PURIFICACION GENETICA DE LAS CEPAS:	47

5.3. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES DE LA CEPA AS-P-78.	51
5.4. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES DE LA CEPA R-8.	55
5.5. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES DE LA CEPA V-12.	59
5.6. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES DE LA CEPA P-2.	63
5.7. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES DE LA CEPA WISCONSIN ATCC 54-1255.	67
5.8. COMPARACION DEL DESARROLLO DE LAS CEPAS Y LOS CLONES SELECCIONADOS	71
5.9. EVALUACION DEL METODO DE CILINDROS DE AGAR PARA LA OBTENCION DE CEPAS SOBREPDUCTORAS DE PENICILINA.	75
5.9. CARACTERIZACION DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS.	80
6. DISCUSION DE RESULTADOS.	96
6.1. EVALUACION DEL DESARROLLO DE LAS CEPAS	98
6.2. EVALUACION DEL DESARROLLO DE LOS CLONES	99
6.3. COMPARACION ENTRE CLONES Y CEPAS	101
6.4. OBTENCION DE CEPAS ESPECIALES PARA FERMENTACION SOLIDA	102
6.5. CARACTERISTICAS ASOCIADAS A LA ELEVADA PRODUCCION	103
7. CONCLUSIONES.	105
8. NOMENCLATURA	107
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	109

I N D I C E D E T A B L A S .

1. COMPARACION ENTRE LA FS Y LA FL DE LAS CEPAS	
AS-P-78, R-8, V-12, WISCONSIN Y P-2	46
2. CLONES SELECCIONADOS POR EL METODO DE	
CILINDRO DE AGAR Y SUS RESPECTIVOS HALOS DE	
INHIBICION	50
3. COMPARACION ENTRE FS Y FL DE LOS CLONES DE	
LA CEPA AS-P-78	54
4. COMPARACION ENTRE FS Y FL DE LOS CLONES DE	
LA CEPA R-8	58
5. COMPARACION ENTRE FS Y FL DE LOS CLONES DE	
LA CEPA V-12	62
6. COMPARACION ENTRE FS Y FL DE LOS CLONES DE	
LA CEPA P-2	66
7. COMPARACION ENTRE FS Y FL DE LOS CLONES DE	
LA CEPA WISCONSIN 54-1255	70
8. PRODUCCIONES EN FS Y FL Y PRODUCTIVIDADES	
RELATIVAS OBTENIDAS CON TODAS LAS CEPAS	71
9. RANGOS DE DESARROLLO RELATIVO (FS/FL) DE LOS	
CLONES DERIVADOS DE CADA CEPA DE <i>Penicillium</i>	
<i>chrysogenum</i>	72
10. DESARROLLO EN FL DEL MEJOR CLON DE CADA CEPA	
EN FS Y DESARROLLO EN FS DEL MEJOR CLON DE	
CADA CEPA EN FL	73
11. CLONES QUE PRESENTARON LAS PRODUCTIVIDADES	
RELATIVAS MAS ALTAS EN EL TIEMPO DE MAXIMA	
PRODUCCION	74
12. NIVEL DE PRODUCCION EN SOLIDO DE LAS CEPAS QUE	
RESULTARON ALTAS PRODUCTORAS EN CILINDRO DE	
AGAR	75
13. NIVEL DE PRODUCCION EN SOLIDO DE LAS CEPAS QUE	
RESULTARON BAJAS PRODUCTORAS EN CILINDRO DE	
AGAR	76

14. COMPARACION DEL DESARROLLO DE LOS DISTINTOS CLONES EN LOS DOS SISTEMAS DE FERMENTACION (FS Y FL) CON RESPECTO AL HALO DE INHIBICION 78
15. MEJORAMIENTO DE CEPAS OBTENIDO CON LOS MEJORES CLONES AISLADOS 79

INDICE DE FIGURAS .

1. GENEALOGIA DE CEPAS DE <i>Penicillium chrysogenum</i>	9
2. NUCLEO ESTRUCTURAL DE LAS β -LACTAMAS HIDROFOBICAS (ACIDO 6-AMINOPENICILANICO)	10
3. ORIGEN BIOSINTETICO DE LOS AMINOACIDOS QUE INTERVIENEN EN LA BIOSINTESIS DE PENICILINA	12
4. RUTA BIOSINTETICA DE LA PENICILINA	14
5. PRODUCCION DE PENICILINA POR FEMENTACION LIQUIDA	18
6. COMPARACION ENTRE CEPAS EN FERMENTACION SOLIDA. CINETICAS DE PRODUCCION, pH, HUMEDAD, BIOMASA Y UTILIZACION DE AZUCARES REDUCTORES	44
7. COMPARACION ENTRE CEPAS EN FERMENTACION LIQUIDA. CINETICAS DE PRODUCCION DE PENICILINA, pH, BIOMASA Y UTILIZACION DE AZUCARES REDUCTORES	45
8. CLONES EVALUADOS POR EL METODO DE CILINDROS DE AGAR	48
9. CINETICAS DE PRODUCCION DE PENICILINA EN FS Y FL DE LOS CLONES DE LA CEPA AS-P-78	53
10. CINETICAS DE PRODUCCION DE PENICILINA EN FS Y FL DE LOS CLONES DE LA CEPA R-8	57
11. CINETICAS DE PRODUCCION DE PENICILINA EN FS Y FL DE LOS CLONES DE LA CEPA V-12	61
12. CINETICAS DE PRODUCCION DE PENICILINA EN FS Y FL DE LOS CLONES DE LA CEPA P-2	65
13. CINETICAS DE PRODUCCION DE PENICILINA EN FS Y FL DE LOS CLONES DE LA CEPA WISCONSIN	69
14. COMPARACION DE LA PRODUCCION EN FS, FL Y EL DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION DE CADA UNO DE LOS CLONES DE LA CEPA AS-P-78	74
15. CINETICAS DE pH DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	82

16. CINETICAS DE HUMEDAD DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	83
17. CINETICAS DE BIOMASA DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	84
18. CINETICAS DE CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	86
19. CINETICAS DE PRODUCCION DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	87
20. CINETICAS DE CONSUMO DE O ₂ DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	89
21. CINETICAS DE PRODUCCION DE CO ₂ DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	90
22. CINETICAS DE ESPORULACION DURANTE LA FERMENTACION SOLIDA DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS	91
23. EFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS CLONES PROTOTIPO DE <i>P. chrysogenum</i>	94
24. EFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE LA PRODUCCION DE PENICILINA (MEDIDA COMO HALO DE INHIBICION EN BIOENSAYO	95

1. INTRODUCCION .

La fermentación sólida es un método de cultivo microbiano que se empleó en la antigüedad para la elaboración de productos lácteos (quesos madurados), ensilados para alimentación de ganado, productos cárnicos (embutidos madurados), "Koji" japonés (Viniegra-González, 1989), etc. y actualmente ha sido revalorizado y modernizado para la producción de proteína y enzimas, principalmente celulasas y pectinasas (Aldoo y col, 1982; Raimbault y col, 1985; Roussos, 1985; Trejo, 1986). También se ha utilizado en el estudio de la producción de metabolitos secundarios, particularmente aflatoxinas (Barrios González y col, 1986; Barrios González y col, 1990a), así como algunas otras micotoxinas que se han producido en granos y otros productos agrícolas (Hesseltine, 1972). Recientemente se ha reportado también la producción de ácido giberélico (Kumard y Lonsane, 1987), compuesto de gran importancia ya que tiene aplicaciones muy importantes en floricultura y agricultura: aumenta el desarrollo vegetativo de las plantas, acelera la floración, aumenta número y tamaño de los frutos, adelanta la germinación de tubérculos y semillas, etc. (Hernández y Mendoza, 1976).

En 1980 Raimbault y Alazard desarrollaron un método para el estudio del comportamiento de los hongos filamentosos en fermentación sólida, que permitió un control relativamente alto sobre las condiciones de cultivo. El investigador francés que desarrolló esta técnica trabajó en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, en donde se formó un grupo de investigación franco-mexicano. Este grupo ha desarrollado una tecnología para el enriquecimiento protéico de la yuca por fermentación sólida (Raimbault y col, 1985).

Los estudios realizados por este grupo han permitido el desarrollo de procesos de fermentación sólida para la producción de celulasas, pectinasas y aflatoxinas mencionados anteriormente. Algunos de estos procesos han sido escalados hasta 30 Kg. en reactores con diferente configuración (Huerta y col, 1986).

Recientemente, el grupo ha desarrollado nuevos sistemas de fermentación sólida en los que se involucra el uso de soportes inertes impregnados con medios de cultivo líquidos. Este sistema ya ha sido patentado (Barrios González y col, 1988a) y caracterizado (Oriol y col, 1988a). El sistema de fermentación sólida fue probado exitosamente para la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum* cepa Wisconsin 54-1255 (Barrios González y col, 1988b; Barrios González y col, 1989). En este estudio se demostró que es posible producir penicilina por fermentación sólida y que, debido a las ventajas ecológicas que éste método otorga a los hongos, no es necesario mantener condiciones de esterilidad. Además el sistema permite utilizar los medios de cultivo desarrollados para fermentaciones líquidas, de manera que se pueden establecer comparaciones muy precisas entre ambos tipos de fermentación.

En el estudio de Barrios y col (1988b y 1989) se realizó una comparación entre los dos sistemas de fermentación, encontrándose que, bajo las condiciones empleadas, la producción de penicilina en fermentación sólida es 17 veces más elevada que la que se obtiene en fermentación líquida y esta producción se alcanza en un tercio del tiempo. También se observó un rendimiento siete veces mayor y una producción volumétrica 8.5 veces superior (Barrios González y col, 1988b; Barrios González y col, 1989).

Todas estas ventajas, aunadas a los posibles bajos costos de energía del proceso (esterilización, aireación, agitación),

indican que este sistema tiene un importante potencial industrial.

Sin embargo, hemos visto que esta relación -de producción 17 veces mayor en sólido que en líquido-, así como el tiempo al que se obtiene la producción máxima varían en algunas cepas probadas. En estudios realizados por Kumard y Lonsane (1987) sobre la producción de ácido giberélico en fermentación sólida con varias cepas, también se observaron diferencias en el comportamiento. Esto lleva a pensar que deben existir ciertas características en una cepa que le permiten producir más eficientemente en el sistema de fermentación sólida que en la fermentación líquida convencional.

La identificación plena de dichas características permitiría tener una base para desarrollar en un futuro una metodología para el mejoramiento genético de cepas especiales para fermentación sólida.

Además, los conocimientos básicos que se obtengan en este estudio sobre el metabolismo secundario y la biosíntesis de antibióticos podrán ser aplicados para el desarrollo de sistemas de producción de otros compuestos de utilidad.

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el mejor comportamiento observado en la producción de penicilina en Fermentación Sólida es debido al sistema de cultivo (FS) o a que características intrínsecas de la cepa empleada juegan un papel importante. Si éste es el caso, obtener información relacionada a las características que favorecen que una cepa se comporte bien en FS y qué procedimientos deben ser empleados para generar cepas de alta producción especiales para Fermentación Sólida.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la producción y productividad relativa de cada una de las cepas de *Penicillium chrysogenum* (AS-P-78, P-2 ATCC 48271, R-8, V-12 Y WISCONSIN ATCC 54-1255).
- Aislar clones de cada una de las cepas para la evaluación de sus producciones y su productividades relativas.
- Caracterizar los clones de mayor productividad relativa en cuanto a sus cinéticas de esporulación, crecimiento, pH, producción, humedad, utilización de azúcares reductores, respiración y efecto de la presión osmótica sobre el crecimiento y sobre la producción.

3. ANTECEDENTES .

3.1. METABOLISMO SECUNDARIO.

Los hongos filamentosos pueden crecer tanto en medios sólidos como líquidos, colonizando frecuentemente la superficie de manera que un alto porcentaje de sus hifas se encuentre rodeado por aire; estas hifas adquieren sus nutrientes por mecanismos de translocación, de aquellas que están en contacto con el medio (Smith y Berry, 1974).

El crecimiento de los hongos se ha dividido en 5 fases fisiológicas:

Después de la fase inicial de adaptación o latencia hay una fase de crecimiento balanceado (fase logarítmica o exponencial) en la que existe una acumulación de nutrientes y la composición y la morfología de la hifa se mantienen constantes. Durante la fase logarítmica, la rapidez de reproducción celular alcanza su valor máximo. Esta fase finaliza al agotarse uno o varios compuestos necesarios para el crecimiento y en muchos casos por la acumulación de productos inhibidores. Durante la siguiente fase (de almacenamiento), el peso seco del micelio aumenta debido a una acumulación de carbohidratos y grasas almacenadas, mientras que el nivel de compuestos nitrogenados, incluyendo el DNA permanecen constantes. Posteriormente el organismo pasa a una fase de mantenimiento o estacionaria en la que el peso seco permanece constante. Las células conservan cierta actividad metabólica, pero se detiene el crecimiento. Esta fase continúa hasta que se agotan tanto las reservas del organismo como los nutrientes del medio. Entonces ocurre la fase de declinación

en la que el número de células viables comienza a disminuir, la tasa de mortalidad va a aumentar progresivamente debido a una autólisis bajo la acción de enzimas de las células mismas (Smith y Berry, 1974; Leveau y Bouix, 1985).

La reproducción en los hongos ocurre generalmente después de la fase de crecimiento exponencial (también llamada trofofase). La reproducción es inducida cuando factores externos o internos (generalmente nutrientes) se vuelven limitantes para el desarrollo vegetativo. Durante este desarrollo vegetativo se lleva a cabo en la célula una serie de reacciones, tanto de síntesis como de degradación. Esta serie de reacciones componen el metabolismo y este puede ser primario o secundario (Smith y Berry, 1974).

El metabolismo primario involucra una serie interconectada de enzimas que regulan las vías catabólica, anabólica y anfóbica, las cuales proporcionan intermediarios biosintéticos y energía, y convierten los precursores biosintéticos en macromoléculas esenciales, como DNA, RNA, proteína, lípidos y polisacáridos. El metabolismo primario es esencialmente idéntico para todas las formas de vida (Smith y Berry, 1974).

Cuando el crecimiento se limita, algunos microorganismos son capaces de sintetizar metabolitos especiales denominados metabolitos secundarios (Smith y Berry, 1974). Son moléculas que se sintetizan generalmente en una fase tardía del ciclo de crecimiento y se denominan también "idiolitos", debido a que se forman durante la idiofase (fase de producción) (Wang y col, 1979). No son esenciales para el crecimiento del hongo y su producción no se asocia con la fase de crecimiento. Probablemente la formación de metabolitos secundarios representa una ventaja para el microorganismo, ya que pueden tener funciones importantes de supervivencia en la naturaleza. Otra característica de los metabolitos secundarios es que son

producidos sólo por algunas especies, contrariamente a los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios más conocidos son los antibióticos, las micotoxinas y los pigmentos (Smith y Berry, 1974). No se conoce el papel específico de estos compuestos en el metabolismo de la célula (Wang y col, 1979).

La proporción de cada componente en la mezcla que se obtiene depende de factores genéticos y ambientales, aparentemente debido a la baja especificidad de las enzimas involucradas en el metabolismo secundario. En contraste, en el metabolismo primario, los procesos biosintéticos son siempre llevados a cabo con gran especificidad, ya que un error en la biosíntesis de los compuestos esenciales para la célula pueden ser letales, mientras que los errores en el metabolismo secundario no tienen consecuencias (Smith y Berry, 1974).

Probablemente, una de las características más importantes del metabolismo secundario es que los idiolitos se producen usualmente cuando los cultivos productores tienen un grado mínimo de crecimiento. Este fenómeno se observó inicialmente durante el desarrollo de la fermentación de penicilina, pero se ha encontrado que la producción durante la idiofase es una característica de muchas fermentaciones (Smith y Berry, 1974).

La separación entre la trofofase y la idiofase no se encuentra bien delimitada en los microorganismos filamentosos (actinomicetos y hongos) (Wang y col, 1979). En muchas fermentaciones de antibióticos, la trofofase y la idiofase se traslapan, de manera que no es posible determinar el momento exacto en el que termina el crecimiento y comienza la producción (Smith y Berry, 1974).

Los factores que desencadenan la formación del producto secundario al final de la trofofase se desconocen. Se sabe únicamente que la formación del producto usualmente comienza

cuando algún nutriente se agota. En algunas fermentaciones el azúcar disponible parece ser el factor limitante; en otras es el nitrógeno o los fosfatos. Quizás estas limitaciones provocan una inducción sobre las enzimas metabólicas secundarias. No hay duda de que al final de la trofofase hay cambios marcados en la composición enzimática de las células y aparecen las enzimas relacionadas específicamente con la formación de productos secundarios (Wang y col, 1979).

3.2. PENICILINA.

3.2.1. DESARROLLO HISTORICO.

Después de la especie descubierta por Fleming en 1929, el *Penicillium notatum*, de baja producción de penicilina, han sido muchos los intentos para obtener variedades de mayor producción. Fruto de ello, en 1951 se aisló en Peoria (Illinois, USA) la cepa *Penicillium chrysogenum* (NRRL, 1951) cuya producción es mayor que la de *Penicillium notatum* y a partir de ella se han obtenido la mayor parte de las cepas existentes (Queener y Swartz, 1979).

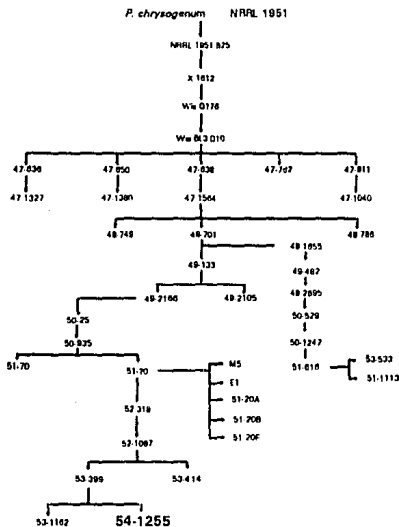


FIG. 1. Genealogía de cepas de *P. chrysogenum* (Elander, 1979).

Las cepas que se muestran en la Figura 1. fueron desarrolladas principalmente en la Universidad de Wisconsin mediante diversas técnicas como:

aislamiento de mutantes espontáneas

rayos X

rayos UV a diferentes longitudes de onda

rayos gamma

nitrógeno mostaza

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

diepoxibutano

ácido nitroso

etilenimina (Elander, 1979; Queener y Swartz, 1979).

La manipulación genética de *Penicillium chrysogenum* ha sido realizada durante muchos años y se han logrado producir cepas de un elevado rendimiento que se utilizan en la producción industrial de penicilina.

3.2.2. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA PENICILINA.

La penicilina es un antibiótico β -lactámico. Su estructura química está formada por un anillo β -lactámico, y un anillo tiozolidínico, formando ambos el núcleo central de la molécula de las penicilinas hidrofóbicas. Este núcleo se denomina ácido 6-aminopenicilánico (6-APA).

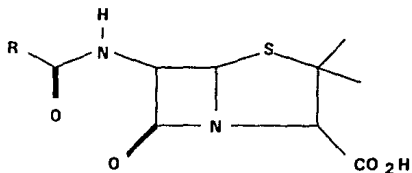


FIG. 2. Núcleo estructural de las β -lactamas hidrofóbicas (ácido 6-aminopenicilánico).

La molécula de 6-APA puede llevar distintos tipos de sustituyentes no polares dando lugar así a varias penicilinas hidrofóbicas (penicilina G, penicilina V, etc.).

Existen también β -lactamas hidrofílicas, pero en la actualidad no se conoce ningún microorganismo capaz de sintetizar ambos tipos de β -lactamas (hidrofóbicas e hidrofílicas), a pesar de que la ruta biosintética tiene una serie de reacciones comunes hasta formar la isopenicilina N, precursor de ambos tipos de β -lactamas. Los intermediarios de esta ruta están en la célula a concentraciones muy bajas, razón por la cual han sido difíciles de detectar.

La estructura básica de la penicilina es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). En las diferentes penicilinas se encuentran diferentes grupos funcionales unidos al grupo amino, como fenilacetato, fenoxiacetato, fenilglicerato, etc (Queener y Swartz, 1979).

3.2.3. BIOSINTESIS DE PENICILINA.

Tres son los aminoácidos que van a intervenir en la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos:

- a) Acido L- α -aminoadípico.
- b) L-cisteína.
- c) L-valina.

Los tres van a intervenir en su forma isomérica L, si bien, la valina va a sufrir una isomerización a la forma D, previa a su incorporación. Estos tres compuestos provienen del metabolismo primario de la célula (Drew y Demain, 1977; Martín, 1981) como se muestra en la Figura 3.

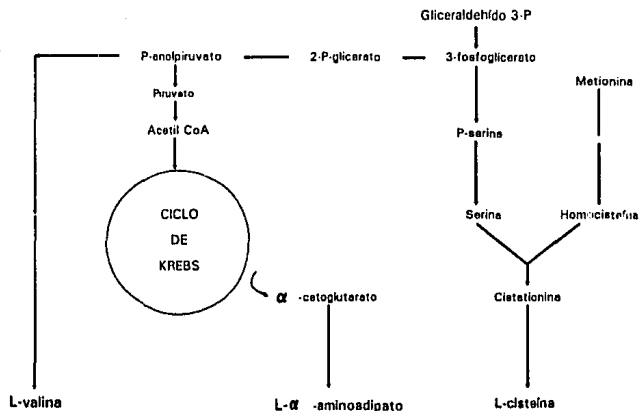


FIG. 3. Origen biosintético de los aminoácidos que intervienen en la biosíntesis de penicilina (Lehninger, 1982).

La ruta biosintética de la penicilina se ramifica a partir del L-α-aminoadipato por un lado hacia la formación de un metabolito primario (lisina) y por otro lado hacia la formación de la penicilina. El ácido α-aminoadípico (AAA) es el precursor de ambos metabolitos (Martín y Demain, 1980).

El primer paso en la biosíntesis de la penicilina (Figura 4) es catalizado por la enzima D-(L-α-aminoadipil)-L-cisteína sintetasa, que lleva a cabo la unión de AAA con la L-cisteína para formar el primer intermediario de la vía. Este se condensa con la L-valina para formar el tripéptido L-α-aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV) (Martín y Demain, 1980).

Posteriormente el tripéptido es convertido en isopenicilina N a través de un intermediario β -lactámico monocíclico (Martín y Demain, 1980). El cierre del anillo ocurre sin rotura del tripéptido. La formación del ciclo de la isopenicilina N a partir del tripéptido ACV requiere de la pérdida de dos átomos de hidrógeno por cada anillo. El proceso de formación del anillo β -lactámico es estereoespecífico (Queener y Neus, 1982).

La isopenicilina N es inestable y debido a la acción de una acil transferasa intercambia en el paso final de la biosíntesis de penicilina el α -aminoadipato de su cadena lateral por ácido fenilacético (AFA) activado en forma de fenilacetil CoA (Arnstein y col, 1969; Arnstein y Morris, 1969) dando origen a a penicilina G o bencil-penicilina.

Los estudios sobre los precursores de la molécula de penicilina pusieron de manifiesto la estimulación que el AFA ejerce sobre la producción de penicilina. Otros ácidos orgánicos, como p-hidrobenczoico o 2-pentenoico, pueden unirse a la molécula de penicilina pero ninguno lo hace con el elevado rendimiento del ácido fenilacético. Por lo general, los precursores de la cadena lateral se adicionan al medio en forma de sal sódica o potásica, derivados de etanolamina, etc. (Demain, 1983).

Dada la relativa inespecificidad del complejo enzimático biosintético por la cadena lateral, muchas son las sustancias que pueden actuar como precursores de dicha cadena lateral, originando así una gran variedad de penicilinas (Demain, 1983).

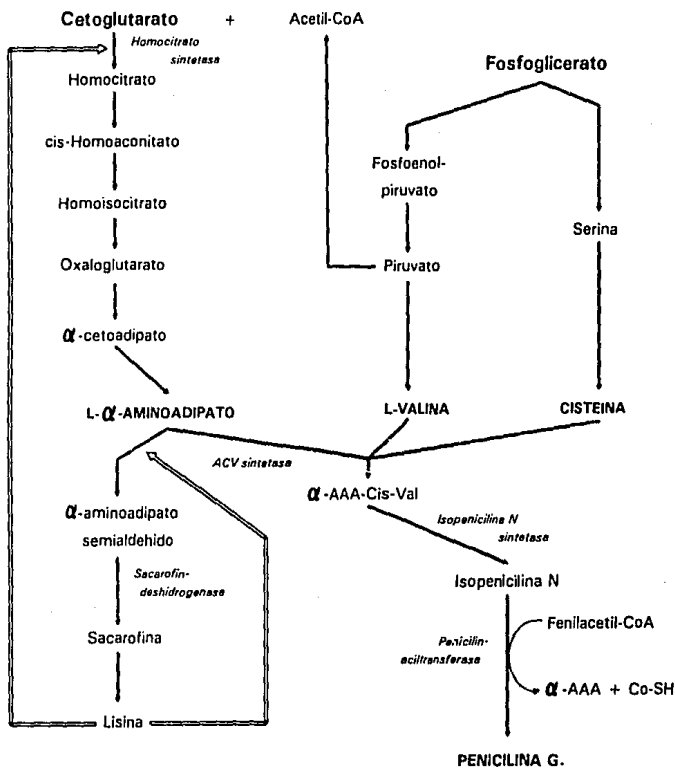


FIG. 4. Ruta biosintetica de la penicilina.

3.2.4. MECANISMOS DE REGULACION.

Durante los primeros años del desarrollo de la producción de penicilina (década de los 40), se encontró que la glucosa se utiliza rápidamente, y que esta es un sustrato muy pobre para la producción de penicilina. En cambio, la lactosa se utiliza lentamente en el crecimiento, pero favorece una excelente formación de penicilina. Esto sugiere que el período de producción máxima de penicilina se asocia con una reducción en la velocidad de crecimiento (Drew y Demain, 1977).

Actualmente se sabe que la biosíntesis de la penicilina está regulada por diversos mecanismos que han sido ampliamente estudiados en fermentación líquida. Estos mecanismos se describen brevemente a continuación:

a) REPRESION CATABOLICA POR LA FUENTE DE CARBONO:

La D-glucosa es capaz de reprimir la formación del tripéptido ACV (por represión de la ACV sintetasa), que corresponde al primer paso de la biosíntesis de la penicilina después de la ramificación del metabolismo primario. Ejerce además un efecto represor sobre la isopenicilina N sintetasa. La D-glucosa también disminuye la poza metabólica de ácido α -aminoadípico por el siguiente mecanismo: actúa como efector positivo para la homocitrato-sintetasa y sacarofin-deshidrogenasa (enzimas de la vía de la lisina) y al mismo tiempo estimula la incorporación de lisina en proteínas.

La adición de ácido α -aminoadípico no revierte el efecto, inhibidor de la formación del tripéptido, ya que la regulación no es por ausencia de este compuesto, sino por represión de la ACV sintetasa (Revilla, y col, 1984; Revilla, y col, 1986).

b) REGULACION POR AMONIO:

El *Penicillium chrysogenum* es capaz de utilizar amonio como única fuente de nitrógeno. El amonio afecta negativamente la formación de la penicilina y su acción es proporcional a la concentración que guarda en el medio de cultivo. Actúa como un efector negativo para las enzimas responsables de la síntesis de glutamina, la cual participa directamente en la formación de los aminoácidos precursores del antibiótico como donador de grupos amino. El amonio sólo incrementa la concentración del glutamato, glutatión, alanina y glutamina, pero no tiene ningún efecto sobre la lisina. El efecto represor se observa claramente a una concentración 100 mM de amonio (Sánchez, y col, 1980).

c) REPRESION E INHIBICION POR LISINA:

La L-lisina tiene la capacidad de inhibir y reprimir (a concentraciones mayores a 50 mM) la síntesis de penicilina actuando negativamente sobre la homocitrato-sintetasa (primera enzima de la vía) de manera que se reduce la formación de α -aminoadipato. Este efecto puede ser revertido con la adición de ácido α -aminoadípico, compuesto que estimula la formación del tripéptido ACV (Luengo, y col, 1989).

d) RETRORREGULACION POR PRODUCTO:

El fin de la síntesis de penicilina durante una fermentación está relacionada con la acumulación de la misma. La penicilina exógena limita la subsecuente acumulación del antibiótico. Se ha demostrado que la capacidad sintetizadora de la cepa es proporcional a la resistencia al antibiótico. Es posible que inhiba a alguna enzima como la aciltransferasa (Gordee y Day, 1972).

3.3. FERMENTACION EN MEDIO LIQUIDO (FL).

En la actualidad la producción de penicilina por fermentación se lleva a cabo en cultivo líquido. Se utilizan fermentadores con capacidad de 40,000 a 200,000 litros. El proceso es aeróbico, para lo cual se requiere introducir una corriente de aire al fluido y utilizar agitadores para aumentar la superficie de contacto entre el aire y el medio de cultivo además de homogeneizar el medio. El aire que entra al sistema debe asegurar condiciones de esterilidad. Este proceso requiere de una gran cantidad de energía: 1 a 4 watts por litro de fluido, incluyendo la fuerza que se necesita para introducir la corriente de aire. Los tanques fermentadores deben de tener sistemas de enfriamiento (por ejemplo chaquetas) y sistemas de control de todos los parámetros (Queener y Swartz, 1979).

El primer paso en el proceso de fermentación es el inóculo de un tubo con medio de esporulación a partir de esporas liofilizadas. Una vez esporulado se hace una suspensión y se inocula un matraz con medio vegetativo (o medio semilla). Cuando se obtiene una buena cantidad de biomasa se inocula un tanque con medio semilla. El propósito de estos inóculos es incrementar la concentración de biomasa a una velocidad elevada, la cual se obtiene durante la fase de crecimiento logarítmico. Una vez que se obtiene cierto nivel de biomasa se inocula un tanque fermentador el cual contiene un medio específico para la producción de penicilina (FIG 5). En este fermentador se controlan parámetros como son: tiempo de producción, cambios en el pH, concentración de carbohidrato residual, volumen celular, respiración, etc. (Queener y Swartz, 1979).

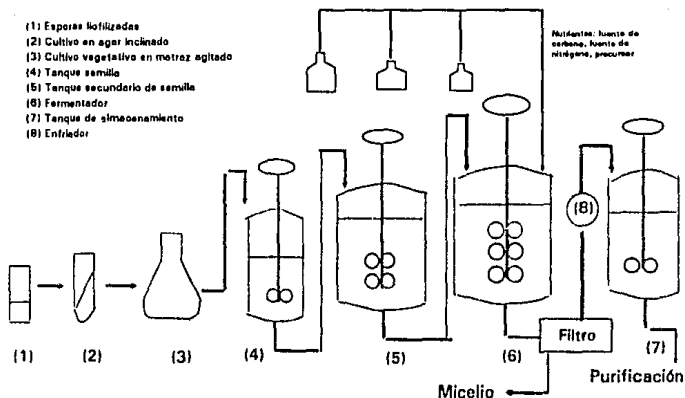


FIG. 5. Producción de penicilina por fermentación líquida (Queener y Swartz, 1979).

La producción de penicilina puede hacerse por lote, lote alimentado o semi-continua, y en cada caso el tiempo de fermentación está limitado por distintos factores.

En la producción por lote los principales factores limitantes son la capacidad de transferencia de oxígeno, la acumulación de sustancias tóxicas o inhibidores o bien, el agotamiento de nutrientes.

En el caso de los sistemas de fermentación semi-continua existe una pérdida de nutrientes que no se utilizan, ya que se debe permitir la salida de una parte del volumen del medio. En este caso también es un factor limitante la transferencia de

oxígeno y la concentración de nutrientes (Queener y Swartz, 1979).

Para recuperar la penicilina del medio inicialmente se filtra el cultivo para eliminar el micelio y otros sólidos, aunque esto no siempre es necesario. Posteriormente se añade ácido fosfórico o sulfúrico para disminuir el pH a 2-2.5, ya que la forma ácida es más soluble en compuestos orgánicos. De aquí se pasa a una extracción con un solvente orgánico, como acetato de amilo, acetato de butilo o metil isobutil cetona. En algunas ocasiones, el solvente con la penicilina se trata con carbón activado para eliminar pigmentos y otras impurezas. Posteriormente se realiza una extracción con agua mediante la adición de hidróxido de sodio o de potasio para obtener la sal de la penicilina. Por último se realiza la cristalización de la penicilina para obtenerla en estado sólido (Casida, 1968).

La penicilina obtenida por fermentación usualmente es penicilina G o V. A partir de estas se producen las penicilinas semisintéticas. Primero se produce el 6-APA y posteriormente se añaden los diferentes grupos funcionales (Queener y Swartz, 1979).

3.4. FERMENTACIONES EN MEDIO SOLIDO.

En los últimos años se ha estudiado la producción de diversos compuestos mediante un método denominado fermentación en sólido, esto es, la transformación de materiales sólidos mediante acción microbiana. El término fermentación sólida ha sido objeto de numerosas definiciones.

Hesseltine (1977) la define como una fermentación en la cual el sustrato no se encuentra en estado líquido.

Moo-Young y col (1983) la designan como un proceso en el cual los microorganismos utilizan materiales insolubles para su crecimiento y su metabolismo.

La definición propuesta por Aideo y col (1982) dice que la fermentación en medio sólido engloba todas las fermentaciones que contienen un sustrato sólido o semi-sólido o un soporte sólido inerte.

En 1987 Eric Oriol propone una nueva definición designando a la fermentación sólida como un cultivo microbiano de superficie que se fija al interior de una matriz sólida porosa que contiene el sustrato y que se encuentra en ausencia de agua libre.

El material sólido se encuentra generalmente en forma fragmentada, granulada o fibrosa que permite retener agua mediante higroscopía o capilaridad. El soporte o matriz porosa sólida puede o no ser biodegradable, y debe tener una elevada área superficial por unidad volumétrica (10^3 - 10^6 m²/l). Además, la matriz debe ser capaz de absorber una cantidad de agua igual o mayor a su peso seco con una actividad de agua elevada en la interfase sólido/gas (Viniestra-González, 1989). Según el tipo de material utilizado, la cantidad de agua varía enormemente. Los materiales con alto contenido amiláceo (arroz, yuca, cebada) son generalmente fermentados con una humedad inicial entre 25 y 60 %, mientras que los materiales

que contienen grandes cantidades de celulosa (salvado, bagazo, paja) permiten utilizar humedades iniciales de 60 - 80 % sin la aparición de agua libre (Oriol, 1987).

Los microorganismos cultivados en medio sólido son preferentemente hongos filamentosos, ya que sus hifas fácilmente colonizan matrices sólidas porosas. Además los hongos filamentosos son capaces de crecer y desarrollarse en humedades más bajas que 12 % y soportar presiones osmóticas elevadas (Beuchat, 1983). Estas características por lo general no las presentan las levaduras y las bacterias (Oriol, 1987).

3.4.1. APLICACIONES DE LA FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO.

A) PREPARACION DE ALIMENTOS:

En el Extremo Oriente se utiliza la fermentación sólida en los procesos tradicionales destinados a mejorar las cualidades nutritivas y organolépticas de ciertos productos agrícolas, como el arroz, la soya, el trigo y los corazones de las palmas (Oriol, 1987). El proceso de fabricación típico es el Koji, con el que se produce un concentrado de elevada actividad enzimática y en el cual el substrato está constituido por granos de arroz o de soya utilizando *Aspergillus oryzae* (Hesseltine, 1965; Streinkraus, 1983).

Otro proceso tradicional de fermentación sólida es la elaboración de quesos franceses fermentados tipo Camembert, Brie y Roquefort caracterizados por el desarrollo superficial o profundo de hongos del género *Penicillium* (Oriol, 1987).

Las fermentaciones tradicionales presentan un gran número de ventajas desde el punto de vista nutricional: producción de enzimas digestivas, destrucción de sabores y olores

desagradables, incorporación de sabores y olores agradables, producción de vitaminas y aumento de la digestibilidad, además de aumentar el tiempo de conservación de los alimentos.

Estas ventajas han sido aprovechadas en los últimos veinte años para la fabricación de alimentos para ganado enriquecidos en proteínas (AFEP) con un bajo costo de producción (Raimbault, 1981).

B) PRODUCCION DE ENZIMAS.

Se ha utilizado la FS en la producción de diversas enzimas, obteniéndose en muchos casos rendimientos superiores a los que se obtienen en FL.

A partir de la fabricación del koji, Takamine (1917) desarrolló el primer proceso industrial de producción de enzimas, particularmente amilasas, utilizando salvado de trigo y almidón como sustrato y *A. oryzae* como inóculo. Recientemente otros autores se han interesado en la producción de amilasas y glucoamilasas por FS (Bajracharya y Mudgett, 1980; Narahara y col, 1982; Raimbault y col, 1985; Roussos, 1985; Trejo, 1986).

La formación de proteasas en la elaboración de alimentos orientales tradicionales fermentados juegan un papel muy importante. Sin embargo, a excepción de la producción de Koji, la literatura contiene pocas referencias relativas a la producción de proteasas en medio sólido. Sólo Hesseltine (1977) y Arima y Uozumi (1967) reportan la existencia de un proceso industrial para producción de proteasas por medio de *Mucor pusillus* en fermentación sólida, tomando como base el procedimiento utilizado para el Koji.

La producción de celulasas se hizo inicialmente mediante la adaptación del procedimiento Koji utilizando *Trichoderma reesei* sobre paja y arroz (Toyama 1976). Se han desarrollado posteriormente otros métodos utilizando *Trichoderma* (Vilela y col, 1977), *Talaromyces* (Nishio, y col, 1981), *Pestalotiopsis* (Rao y col, 1983) y *Sporotrichum* (Hoe-Kim y col, 1985). También se ha trabajado sobre la producción de enzimas destinadas al tratamiento de subproductos de la madera, como las xilanasas (Kitpreechavanich y col, 1984).

La síntesis de pectinasas, utilizadas en la clarificación de jugos, se puede realizar por fermentación sólida sobre bagazo de caña (Trejo, 1986) o bien sobre pulpa de café (Favela, 1989).

Además de las enzimas mencionadas se han encontrado reportados trabajos sobre FS para la producción de invertasas, lactasas, lipasas y catalasas (Raimbault, 1981; Pandey, 1992; Rivera-Muñoz y col, 1991; Karanth, 1986).

C) PRODUCCION DE ACIDOS ORGANICOS Y OTROS METABOLITOS:

Los procedimientos de FS para la producción de ácidos orgánicos se comenzaron a utilizar desde principios de siglo y se han desarrollado para la obtención de ácidos con gran demanda industrial (gálico, glucónico, y kójico), entre los cuales el ácido cítrico es el principal producto fúngico (Herrick y May, 1928; Pandey, 1992; Shankaranand, 1992).

Por otro lado, los principales metabolitos secundarios que se han producido en FS son las toxinas fúngicas, aflatoxinas (Hesseltine, 1977; Barrios-González y col, 1990a) y ocratoxinas (Lindenfelser y Ciegler, 1975), destinadas a estudios toxicológicos.

3.5. COMPARACION ENTRE LA FERMENTACION EN MEDIO LIQUIDO Y EN MEDIO SOLIDO.

Las fermentaciones que se realizan actualmente en la industria farmacéutica y en la de alimentos en los países industrializados utilizan cultivos líquidos sumergidos (FL) para la producción de biomasa, enzimas y metabolitos. Esta clase de proceso fue desarrollado para acortar el tiempo de proceso de las fermentaciones en superficie.

La fermentación sólida es un proceso que se maneja por lote, y gran parte de la investigación más reciente se realiza como una posible alternativa sobre los cultivos sumergidos convencionales.

Existen diferencias importantes entre la FS y la FL. A continuación se mencionan algunas de ellas:

- El medio de FL contiene una gran cantidad de agua que tendrá que ser separada de las pequeñas cantidades de productos microbianos, que generalmente se encuentran a concentraciones menores a 50 g/l (5%).
- El agua residual debe de ser tratada en ocasiones por la misma planta de fermentación. La cantidad de agua residual que se produce en FL es considerablemente más elevada que la que se produce en FS.
- La contaminación por bacterias y levaduras debe ser evitada mediante técnicas de esterilización del equipo, del aire y del medio, ya que muchos metabolitos importantes, como los antibióticos, se producen mediante hongos que crecen lentamente en medios líquidos ricos, que pueden ser utilizados rápidamente por microorganismos contaminantes.
- Las concentraciones de producto y precursores son muy bajas, lo cual provoca procesos de recuperación de elevado costo y son un factor clave en la economía del proceso.
- La solubilidad del oxígeno en agua es muy baja, por lo cual se hace necesario utilizar maquinaria compleja y de elevado

costo para los procesos de agitación y aireación forzada con un elevado consumo de energía (Viniegra-González, 1989).

Por otro lado la FS presenta ventajas sobre la FL como por ejemplo:

- El medio de fermentación usualmente contiene menos agua que la FL.
- La actividad de agua baja que se tiene en una FS proporciona ventajas ecológicas en el crecimiento lento de los hongos sobre el de bacterias y levaduras, reduciendo la necesidad de operaciones de esterilización.
- Los hongos pueden utilizar y transformar azúcares impregnados en materiales sólidos a bajas concentraciones y producir elevadas concentraciones de productos importantes como ácido giberélico (Kumard y Lonsane, 1987), penicilina (Barrios González, 1988), pectinasas (Trejo, 1987). Por ello, los costos de recuperación pueden ser reducidos.
- El oxígeno no es un factor limitante significativo, debido a que es completamente soluble en aire, el cual es el fluido en la FS. Por lo tanto, la FS tiene menores consumos de energía que la FL (Viniegra-González, 1989).

Sin embargo la FS también tiene importantes limitantes:

- El control del proceso se dificulta en una FS debido a la calidad heterogénea del material de fermentación, además de que el mezclado en la mayoría de las ocasiones es nulo o mínimo.
- La recuperación del producto puede ser difícil.
- Aún existe poca experiencia sobre el uso de la FS en producciones a gran escala y únicamente se utiliza en Japón para la producción industrial de alimentos fermentados (Viniegra-González, 1989).

3.6. PRODUCCION DE PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA.

En 1980 se desarrolló un método (Raimbault y Alazard) para el estudio del comportamiento de los hongos filamentosos en fermentación sólida. En este trabajo se permitió un control elevado sobre las condiciones de cultivo. A partir de este trabajo se formó un grupo de investigación franco-mexicano el cual desarrolló la tecnología para el enriquecimiento proteico de la yuca por fermentación sólida (Raimbault y col, 1985). Los estudios realizados por este grupo han permitido el desarrollo de procesos de fermentación sólida para la producción de celulasas, pectinasas y aflatoxinas mencionados anteriormente. Algunos de estos procesos han sido escalados hasta 30 Kg. en reactores con diferente configuración (Huerta y col, 1986).

Recientemente, el grupo ha desarrollado nuevos sistemas de fermentación sólida en los que se involucra el uso de soportes inertes impregnados con medios de cultivo líquidos. Este sistema ya ha sido patentado (Barrios González y col, 1988a) y caracterizado (Oriol y col, 1988a).

El sistema de fermentación sólida fue considerado como una posibilidad viable durante las etapas tempranas de producción de antibióticos, pero fue desplazado entonces por los sistemas de FL a gran escala (Viniegra-González, 1989).

En las últimas décadas, la producción de antibióticos por FS ha sido seguramente objeto de estudio de numerosos laboratorios industriales, pero, dadas las restricciones del "secreto industrial", prácticamente ningún resultado ha sido publicado sobre estos hechos

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ha desarrollado un proceso de producción de penicilina sobre

fibra de trigo en un sistema semi-sólido. Aunque ha sido llevado hasta el nivel de producción industrial, con una eficiencia aceptable, este proceso presenta enormes problemas de producción y de costos debido a la necesidad de mantener estrictas condiciones de esterilidad (Ziffer, 1988).

Recientemente, un sistema de FS sobre soporte inerte impregnado con medio de cultivo líquido fue probado de manera exitosa para la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum* cepa Wisconsin 54-1255 (Barrios González y col, 1988b y 1989). En este estudio se demostró que es posible producir penicilina en fermentación sólida y que, debido a las ventajas ecológicas que la fermentación sólida otorga a los hongos, no es necesario mantener condiciones de esterilidad. Además el sistema permite utilizar los medios de cultivo desarrollados para fermentaciones líquidas y la recuperación de los productos se puede realizar mediante extracción o prensado del medio sólido, de manera que se pueden establecer comparaciones muy precisas entre la fermentación líquida y la fermentación sólida.

En el estudio de Barrios se realizó una comparación entre los dos sistemas de fermentación encontrándose que, en las condiciones empleadas, la producción de penicilina en fermentación sólida es 17 veces más elevada que la que se obtiene en fermentación líquida y esta producción se alcanza en un tercio del tiempo. También se observó un rendimiento siete veces mayor y una producción volumétrica 8.5 veces superior (Barrios González y col, 1988b; 1989).

Estos autores sugieren también que es posible la producción de otros antibióticos - como la rifamicina, producida por el actinomiceto *Nocardia mediterranei*, y algunos otros producidos por ciertos estreptomicetos - mediante la utilización del sistema de FS.

4. MATERIAL Y METODOS .

4.1. MICROORGANISMOS.

MANTENIMIENTO Y PRESERVACION:

Se utilizaron 5 cepas distintas de *Penicillium chrysogenum* para la producción de penicilina G: Wisconsin ATCC 54-1255, P-2 ATCC 48271, AS-P-78 (proporcionada por el Dr. J. F. Martín, Universidad de León, España), R-8 y V-12 (Barrios González, 1990b).

Para la realización de los bioensayos de actividad antibiótica se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633, el cual fue mantenido en medio de esporulación (ME) a 4°C y liofilizado para preservación a largo plazo.

4.2. MEDIOS DE CULTIVO.

4.2.1. MEDIO PARA LA REALIZACION DE BIOENSAYOS.

TSA: AGAR DE SOYA Y TRIPTICASEINA (en g/l).

Peptona de caseína	17
Peptona de soya	3
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2.5
Dextrosa	2.5
Agar bacteriológico	10
pH	7.3
Agua destilada	hasta 1000 ml

4.2.2. MEDIOS DE ESPORULACION.

ME: MEDIO DE ESPORULACION PARA *Bacillus subtilis* (en g/l).

Peptona	8
Extracto de carne	3
MnCl ₂	10 ⁻⁵ M.
pH	7.2
Agua destilada	hasta 1000 ml

POWER: MEDIO DE ESPORULACION PARA *Penicillium chrysogenum* (en g/l).

Sacarosa	15
Lactosa	15
NaNO ₃	1
K ₂ HPO ₄	0.25
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0005
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0015
KH ₂ PO ₄	0.03
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.275
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005
Bactopeptona	2.5
Líquidos de maceración de maíz	0.25
NaCl	2
Agar bacteriológico	20
Agua destilada	hasta 1000 ml

POWER DE PRODUCCION: MEDIO DE ESPORULACION Y PRODUCCION
 PARA LA ELABORACION DE CILINDROS DE AGAR PARA
Penicillium chrysogenum (en g/l).

Sacarosa	15
Lactosa	15
NaNO ₃	1
K ₂ HPO ₄	0.25
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0005
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0015
KH ₂ PO ₄	0.03
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.275
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005
Bactopeptona	2.5
Líquidos de maceración de maíz	0.25
NaCl	2
Acido fenilacético	2.5
Agar bacteriológico	30
Agua destilada	hasta 1000 ml

4.2.3. MEDIOS PARA FERMENTACION LIQUIDA.

CI: MEDIO COMPLEJO DE INOCULO PARA LAS CEPAS P-2,
 R-8, V-12 Y WISCONSIN 54-1255 (Somerson y col, 1961)
 (en g/l).

CaCO ₃	5
Líquidos de maceración de maíz	20
Extracto de levadura	5
Melazas de remolacha	26
pH	6-6.5
Agua destilada	hasta 1000 ml

CP: MEDIO COMPLEJO DE PRODUCCION PARA LAS CEPAS P-2, R-8, V-12 Y WISCONSIN 54-1255. (Somerson y col, 1961) (en g/l).

Lactosa	55
CaCO ₃	10
Líquidos de maceración de maíz	35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3
KH ₂ PO ₄	7
Aceite de maíz	2.5
Acido fenilacético	2.5
pH	6.5
Agua destilada	hasta 1000 ml

CI-A: MEDIO COMPLEJO DE INOCULO PARA LA CEPA AS-P-78 (en g/l).

Líquidos de maceración de maíz	20
Sacarosa	20
Extracto de levadura	5
CaCO ₃	5
pH	5.7
Agua destilada	hasta 1000 ml

CP-A: MEDIO COMPLEJO DE PRODUCCION PARA LA CEPA AS-P-78 (en g/l).

Lactosa	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
CaCO ₃	5
Pharma med	20
Acido fenilacético	2.5
pH	6.8
Agua destilada	hasta 1000 ml

4.2.4. MEDIOS PARA FERMENTACION SOLIDA.

CFS: MEDIO COMPLEJO DE FERMENTACION SOLIDA PARA LAS CEPAS P-2, R-8, V-12 Y WISCONSIN 54-1255. (Somerson modificado) (en g/l).

Lactosa	110
Glucosa	14
CaCO ₃	20
KH ₂ PO ₄	6
MgSO ₄	6
Líquidos de maceración de maíz	70
Acido fenilacético	1.3
Agua destilada	hasta 1000 ml

CFS-A: MEDIO COMPLEJO DE FERMENTACION SOLIDA PARA LA CEPA AS-P-78 (en g/l).

Glucosa	14
Lactosa	75
CaCO ₃	7.5
Pharma med	30
Acido fenilacético	1.2
pH	6.5
Agua destilada	hasta 1000 ml

4.3. REACTIVOS.

4.3.1. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS PARA EXTRACCION DE PENICILINA.

Se preparó el amortiguador para la extracción de penicilina disolviendo 6.4056 g de KH_2PO_4 y 0.2523 g de K_2HPO_4 en un litro de agua destilada, y una vez disuelto se ajustó el pH para obtener un valor de 5.5.

4.3.2. AMORTIGUADOR DE FOSFATOS PARA HPLC.

Para la preparación del amortiguador para HPLC se pesaron 6.4056 g de KH_2PO_4 y 0.5046 g de K_2HPO_4 en agua destilada y desionizada para obtener un pH de 6.

4.3.3. REACTIVO DE DNS.

Se pesaron 7.5g de ácido 2,4-dinitro salicílico, 14 g de NaOH, 216 g de Tartrato doble de sodio y potasio, 5.6 g de fenol y 5.9 g de metabisulfito de sodio y se disolvieron en este orden en agua destilada.

4.4. METODOS.

4.4.1. CONSERVACION DE CEPAS.

Las cepas fueron mantenidas en congelación a -20°C y a -80°C en solución de glicerol (al 25%) para mantenimiento a mediano plazo, y para preservación a largo plazo se mantuvieron liofilizadas. A partir de estas cepas se aislaron 36 clones de cada una manteniéndose bajo las mismas condiciones y estas últimas se utilizaron para el desarrollo de este trabajo.

4.4.2. OBTENCION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS.

Se prepararon matraces con 40 ml. de medio POWER, se inocularon con 0.25-0.3 ml de suspensión de esporas y se incubaron a 25°C durante el tiempo necesario para alcanzar la esporulación (variable según la cepa utilizada). Una vez que se presentó la coloración verde característica de la formación de esporas, éstas se suspendieron en agua estéril con Tween 80 al 0.2% con ayuda de agitador y barra magnética, con cuidado de no desprender micelio (cosecha de esporas). Se realizó la cuenta de las esporas cosechadas en una cámara de Neubauer. La suspensión obtenida se utilizó para inocular tanto los medios de inóculo para fermentación líquida (CI y CI-A) como los medios para fermentación sólida (CFS y CFS-A).

4.4.3. REALIZACION DE LA FERMENTACION LIQUIDA.

a) Inóculo:

La FL requiere de un inóculo en forma de micelio, para lo cual se preparó medio CI ó medio CI-A (dependiendo de la cepa utilizada). Se inoculó con 1×10^6 esporas/ml. Se incubó en

matraces de 250 ml con 50 ml de medio a 25°C y con una agitación de 270 rpm. Este medio se utilizó para la obtención de micelio necesario para la inoculación del medio complejo de producción.

b) Producción:

Para la producción de penicilina se prepararon matraces de 250 ml con 45 ml de medio CP ó medio CP-A. Se inocularon con 5 ml de micelio crecido en medio complejo de inóculo y se incubaron a 25°C y 270 rpm. El tiempo de producción varía según la cepa conforme se verá en los resultados presentados.

4.4.4. REALIZACION DE LA FERMENTACION SOLIDA.

a) Pretratamiento del soporte:

Durante el desarrollo de este proyecto se empleó como soporte bagacillo de caña de azúcar obtenido en el ingenio azucarero de Zacatepec, Morelos, México.

El bagacillo se tamizó en mallas No. 30 y 50 utilizando únicamente las partículas retenidas entre estas dos mallas, correspondiendo a un tamaño entre 0.297 y 0.59 mm.

Para el pretratamiento del bagacillo, se mezcló éste con el 35% del agua total que se iba a utilizar en el medio y se llevó a 3 lb/in² de presión durante 30 min. una vez transcurrido el tiempo de pretratamiento se esterilizó a 15 lb/in² durante 15 min.

b) Preparación del medio de cultivo:

Al bagacillo de caña de azúcar así tratado se le adicionó el medio CFS ó CFS-A (dependiendo de la cepa utilizada) para la obtención del medio de cultivo sólido. Este medio contenía 70% de humedad y 30% de sólidos, incluyendo el soporte inerte (bagacillo de caña). Es importante mencionar que se tomó en cuenta el aporte de agua que proviene de la suspensión de esporas, y que este varía dependiendo de la cuenta que se

obtenga, de lo contrario, la humedad del medio se ve afectada. El pH del medio se ajustó para comenzar la fermentación con un pH de 6.5.

c) Condiciones de cultivo:

El cultivo se realizó según la descripción de Raimbault y Alazard (1980), en columnas que contenían 12 g de medio de cultivo con una densidad de empaque de 0.23 g/ml., sumergidas en un baño de agua a 25°C para control de la temperatura y con una aireación (aire húmedo) de 2.4 l/h. El medio sólido se inoculó con una cuenta de 2×10^6 esporas/ml. No fue necesario utilizar un medio de inóculo como en el caso de la FL.

4.4.5. ANALISIS DE LAS MUESTRAS.

a) Fermentación líquida:

Las muestras de FL se filtraron, se lavaron y se secaron en un horno a 80°C hasta peso constante para determinar la cantidad de biomasa. El filtrado se separó (antes de los lavados) y se centrifugó durante 3 min a 17000 g en una IEC CENTRA-Mcentrifuge. La cantidad de penicilina, pH y azúcares reductores fueron determinados en el filtrado.

b) Fermentación sólida:

Para el muestreo en FS se tomaron dos columnas completas en cada tiempo, pesando la cantidad de medio de la columna. De aquí se tomó 1 g para la determinación de pH, 0.5 g se utilizaron para extraer la penicilina producida y para realizar la cuantificación de azúcares reductores, 4 g se lavaron y se secaron para determinar la cantidad de biomasa producida y otros 4 g se secaron sin lavar para determinar la humedad del medio.

4.4.6. DETERMINACION DEL pH.

La determinación del pH en las muestras de FL se realizó directamente sobre el medio antes de filtrar.

Para las muestras de FS se mezcló 1 g de muestra con 10 ml de agua destilada agitando durante 10 min (agitador magnético) antes de la determinación.

4.4.7. EXTRACCION DE LA PENICILINA.

Se pesaron 0.5 g. de las muestras de FS y se añadieron 3 ml de amortiguador de fosfatos de potasio (pH 5.5, 0.01 M.), se agitó y se ajustó el pH entre 5 y 5.1 con H_3PO_4 diluido (midiendo la cantidad de ácido agregado para tomarlo en cuenta en los cálculos de dilución). Se centrifugó a 2700 rpm (669 g), durante 20 min y se separó el sobrenadante, el cual se utilizó para determinar la concentración de penicilina y la concentración de azúcares reductores.

4.4.8. CUANTIFICACION DE AZUCARES REDUCTORES.

Esta determinación se realizó mediante el método del Acido Dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959), el cual se basa en la oxidación del grupo reductor del azúcar y en la reducción del DNS para la obtención de un producto colorido característico que se cuantificó por espectrofotometría a 575 nm. Se utilizó el filtrado de la FL y el extracto de la FS. La solución patrón fue de glucosa.

4.4.9. CUANTIFICACION DE PENICILINA.

Se utilizaron dos métodos para determinar la concentración de penicilina. El primero fue el bioensayo con

Bacillus subtilis ATCC 6633 y medio TSA (agar soya-tripticaseína) al 1%. Esta técnica se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento, cuyo diámetro es proporcional al logaritmo de la concentración de penicilina.

Para la realización del bioensayo primero fue necesario obtener una suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* inoculando el medio ME con 2 asadas procedentes de una colonia aislada previamente en agar nutritivo. Se realizó la incubación en matraces de 250 ml con 125 ml de medio a 30°C durante 24 hrs con agitación de 200 rpm. Cuando se obtuvo la suspensión, se determinó su densidad óptica (DO) a 340 nm y se inoculó el medio TSA.

Se utilizaron cajas de acrílico de 30x30 cm y se colocaron 350 ml de TSA inoculados con *B. subtilis* (0.2 ml de suspensión de esporas con una D.O. de 1 para 100 ml de medio TSA). Una vez solidificado el medio se hicieron pozos con un sacabocados y se llenaron con 60 µl de muestra o solución patrón. Las placas se guardaron durante 60 min a 4°C para permitir la difusión del antibiótico y posteriormente se incubaron a 35°C durante 16 hrs para la formación de los halos de inhibición.

El segundo método fue la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); para la cuantificación de penicilina se utilizó una columna de fase reversa C¹⁸ con una fase móvil de amortiguador de fosfatos de potasio (pH 6, 0.1 M) (80%) y acetonitrilo (20%) y un flujo de 1 ml/min. La penicilina absorbe a una longitud de onda de 230 nm en el detector de ultravioleta.

En ambos casos, el patrón utilizado fue una solución de sal potásica de penicilina G.

4.4.10. METODO DE CILINDROS DE AGAR PARA LA SELECCION DE CEPAS DE *Penicillium chrysogenum*.

Se prepararon cajas de Petri de 90 mm. con 30 ml de medio POWER (con AFA y agar al 3%). Cuando el medio se solidificó completamente, se hicieron los cilindros con un sacabocados de 8 mm de diámetro. Cada cilindro se inoculó en el centro con esporas de *Penicillium chrysogenum* y se incubaron a 25°C. Una vez que esporularon (96 hrs) se realizó un bioensayo. Con los resultados obtenidos se realizó una selección de mutantes espontáneas de las cepas disponibles para probarlas posteriormente en FS y FL.

4.4.11. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE OXIGENO Y BIOXIDO DE CARBONO.

Para la cuantificación de la concentración de oxígeno y de bióxido de carbono durante las fermentaciones se utilizó un cromatógrafo de gases GOW-MAC con muestreo automático. Las muestras que se analizaron en el cromatógrafo fueron previamente secadas haciendo pasar el aire húmedo por columnas con sílica gel con indicador de humedad.

4.4.12. METODO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE LOS CLONES PROTOTIPO.

Se prepararon cajas de Petri de 90 mm. con 30 ml de medio POWER (con AFA y agar al 3%) y concentraciones crecientes de CaCl_2 según la presión osmótica que se quería obtener. El cálculo de la cantidad de CaCl_2 que se requiere se realizó en base a la siguiente fórmula:

$$\pi = \frac{n R T}{V}$$

donde π es la presión osmótica del medio, n es el número de moles de todos los componentes que se encuentran disueltos en el medio, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura y V el volumen.

Una vez que el medio estuvo completamente solidificado se hicieron cilindros con un sacabocados de 8 mm de diámetro y cada cilindro se inoculó en el centro con esporas de *P. chrysogenum*, incubando a 25°C durante el tiempo necesario para que crecieran y esporularan. Una vez que se obtuvo el color verde característico de la esporulación se realizó un bioensayo para determinar la actividad antibiótica. Posteriormente se determinó la biomasa de cada cilindro mediante peso seco, lavando con agua caliente para disolver el agar.

5. RESULTADOS.

5.1. FERMENTACION COMPARATIVA EN SOLIDO Y EN LIQUIDO PARA LAS DIFERENTES CEPAS.

En este experimento se desarrollaron las fermentaciones de penicilina, tanto en fermentación sólida como en cultivo sumergido (fermentación líquida) para las cinco cepas: AS-P-78, R-8, V-12, P-2 ATCC 48271 Y Wisconsin ATCC 54-1255. Se utilizaron los medios específicos para cada una de las cepas.

Durante la realización de la fermentación sólida para cada una de las cepas se midieron los siguientes parámetros: pH, humedad, biomasa, consumo de azúcares reductores y producción de penicilina. Se obtuvieron las cinéticas que se presentan en la Figura 6.

Posteriormente se realizaron las pruebas en FL con las mismas cepas para poder hacer una comparación entre FS y FL. En la Figura 7 se presentan las cinéticas obtenidas para los parámetros medidos: producción de penicilina, pH, consumo de azúcares reductores y biomasa.

En FS (Figura 6) se observa que la humedad tiende a elevarse conforme transcurre la fermentación en todos los casos. El comportamiento es muy similar para todas las cepas. Puede observarse también que los niveles de biomasa son distintos para cada una de las cepas, observándose mayor crecimiento en la cepa R-8 y menor en la cepa AS-P-78. Sin

embargo, este comportamiento no se refleja en el consumo de azúcares reductores: la cepa V-12 consume más lentamente los azúcares disponibles y la cepa Wisconsin es la más rápida. En todos los casos se consumen prácticamente todos los azúcares reductores disponibles, pero a distintos tiempos. El comportamiento de pH es muy similar para todas las cepas excepto para V-12. En esta cepa, el pH baja bruscamente a las 90 hrs de 6.2 a 5.

En FL (Figura 7) las cinéticas para las distintas cepas son más heterogéneas que en FS, tanto en pH, biomasa y consumo de azúcares reductores.

Todas estas observaciones se hacen tomando en cuenta que el tamaño del inóculo es el mismo para todas las cepas en cada uno de los sistemas de fermentación (ver Métodos).

En la Tabla 1 se muestran las producciones máximas y los tiempos de producción máxima de las diferentes cepas en ambos sistemas de cultivo, así como las productividades (producción máxima/tiempo) para cada cepa y se calcularon las producciones, productividades y tiempos relativos (sólido/líquido).

Los factores de producción relativa nos proporcionan una medida que nos dá idea de qué tan buena es una cepa en FS en relación a su capacidad para producir en FL. Estos factores se obtuvieron dividiendo la producción (máxima) en FS entre la producción en FL. De manera similar se calcularon las productividades relativas y los tiempos relativos. Todos estos parámetros se presentan en la Tabla 1.

En estos resultados se observa que la cepa de mayor producción en FL es también la mejor en FS (P-2). Los tiempos de producción máxima son diferentes para cada cepa, pero siempre son más cortos en FS (aproximadamente la mitad del

tiempo) como se observa en la tabla. Los tiempos de producción relativa no varían mucho, obteniéndose valores en un rango desde 0.45 hasta 0.7.

Se observa en la tabla 1 que la producción de penicilina en fermentación sólida es mayor que en fermentación líquida, pero la producción y la productividad relativas son diferente para cada cepa, es decir, no todas las cepas tienen la misma capacidad para producir en FS, obteniéndose valores de producción relativa en un rango desde 1.01 hasta 2.51. Los tiempos en los cuales se alcanza la máxima producción son también más cortos en FS y ambos factores (producción y tiempo) provocan que se eleve la productividad.

En términos generales, las cepas que producen mejor en FL presentan producciones y productividades relativas bajas. En ambos sistemas de fermentación, las diferencias entre cepas son grandes.

Además se pueden apreciar diferentes perfiles en las cinéticas de cada cepa estudiada. Esto puede ser una característica intrínseca de cada una de las cepas.

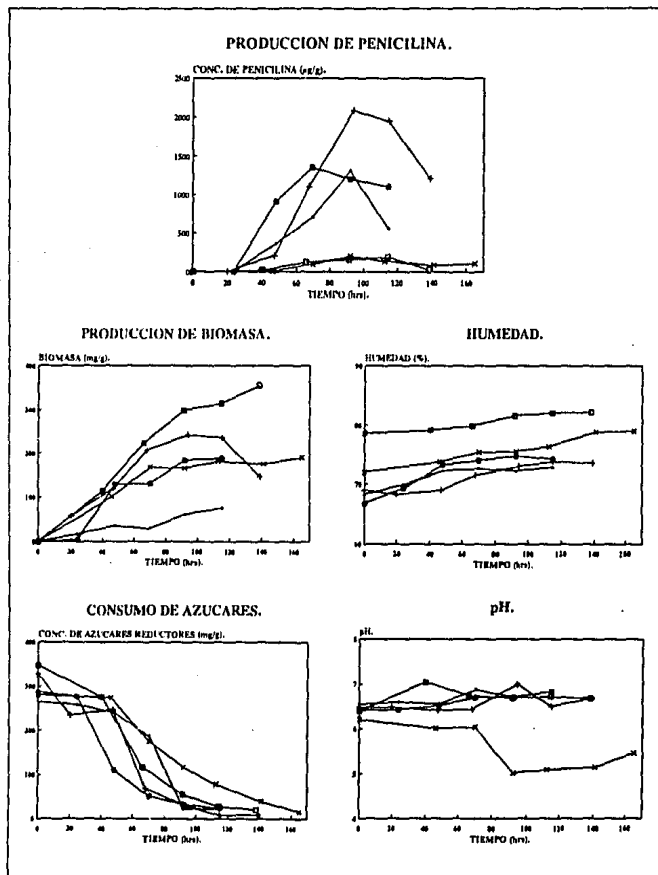


FIG. 6. Comparación entre cepas en fermentación sólida. Cinéticas de producción, pH, humedad, biomasa y utilización de azúcares reductores: (\ast) AS-P-78, (\dashv) P-2, (\bullet) Wisconsin, (\square) R-8 y (\times) V-12.

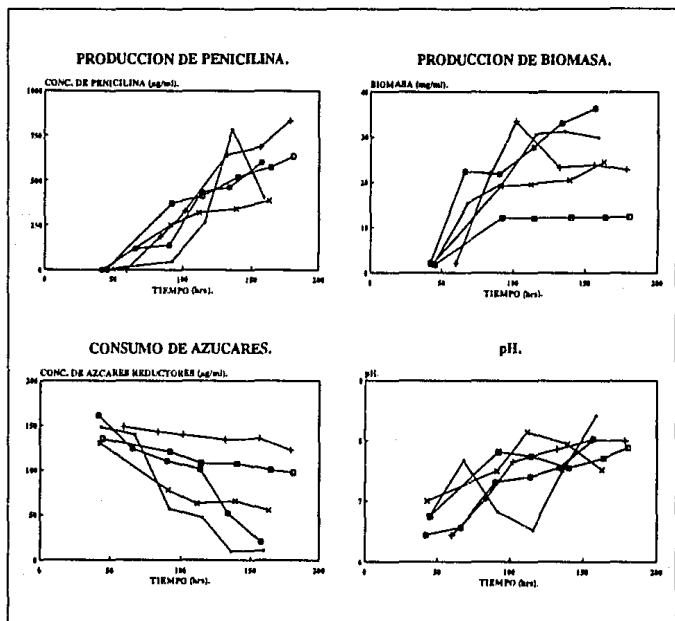


FIG. 7. Comparación entre cepas en fermentación líquida. Cinéticas de producción de penicilina, pH, biomasa y utilización de azúcares reductores: (*) AS-P-78, (+) P-2, (◐) Wisconsin, (◑) R-8 y (×) V-12.

FERMENTACION SOLIDA:			
CEPA	PROD. MAX. ($\mu\text{g/g}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
AS-P-78	1366	92	14.85
R-8	1873	114	16.43
V-12	202	92	2.20
WIS 54-1255	1355	70	19.36
P-2	2085	115	18.13
FERMENTACION LIQUIDA:			
CEPA	PROD. MAX. ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
AS-P-78	783	132	5.93
R-8	633	136	4.65
V-12	200	131	1.53
WIS 54-1255	599	155	3.87
P-2	831	175	4.75
CEPA	PRODUCCION RELATIVA (ps/pl)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA (PS/PL)	TIEMPO RELATIVO (ts/tL)
AS-P-78	1.74	2.50	0.69
R-8	2.96	3.53	0.66
V-12	1.01	1.44	0.70
WIS 54-1255	2.26	5.00	0.45
P-2	2.51	3.82	0.65

TABLA. 1. Comparación entre la FS y la FL de los clones de las cepas AS-P-78, R-8, V-12, Wisconsin y P-2.

5.2. AISLAMIENTO Y EVALUACION DE CLONES DE CADA CEPA.

Después de la fermentación comparativa para las distintas cepas en sólido y líquido se realizó una prueba para determinar la homogeneidad y las características de la población que constituye a cada cepa (revertantes, mutantes espontáneas, etc).

Para ello se aislaron aproximadamente 40 clones de cada cepa mediante un aislamiento en placa de colonias de *Penicillium chrysogenum* (clones) de cada una de las cepas disponibles: AS-P-78, R-8, V-12, P-2 ATCC 48271 y Wisconsin ATCC 54-1255.

El aislamiento se realizó en medio POWER incubando a 25°C durante 6 días para permitir la esporulación de las colonias. Las esporas así obtenidas se evaluaron mediante el método de cilindros de agar para la selección de clones de *Penicillium chrysogenum*. Se inocularon dos cilindros de agar por cada colonia aislada y con los datos de diámetro de halo de inhibición se obtuvieron las curvas de distribución de frecuencia que se presentan en la Figura 8.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico de las cinco distribuciones para probar que las cinco cepas provinieran de una población con distribución normal. Se utilizó la prueba de Bondad de Ajuste de Kolmogorov-Smirnov y se comprobó normalidad en las cinco cepas con un $\alpha = 0.05$. Esta prueba se realizó ya que los experimentos siguientes tienen tamaños de muestra pequeños, y el análisis estadístico con muestras pequeñas es menos poderoso, a menos que se pruebe que la distribución de la población es normal. De esta manera, los resultados que se obtengan en los siguientes experimentos podrán ser analizados mediante métodos estadísticos paramétricos.

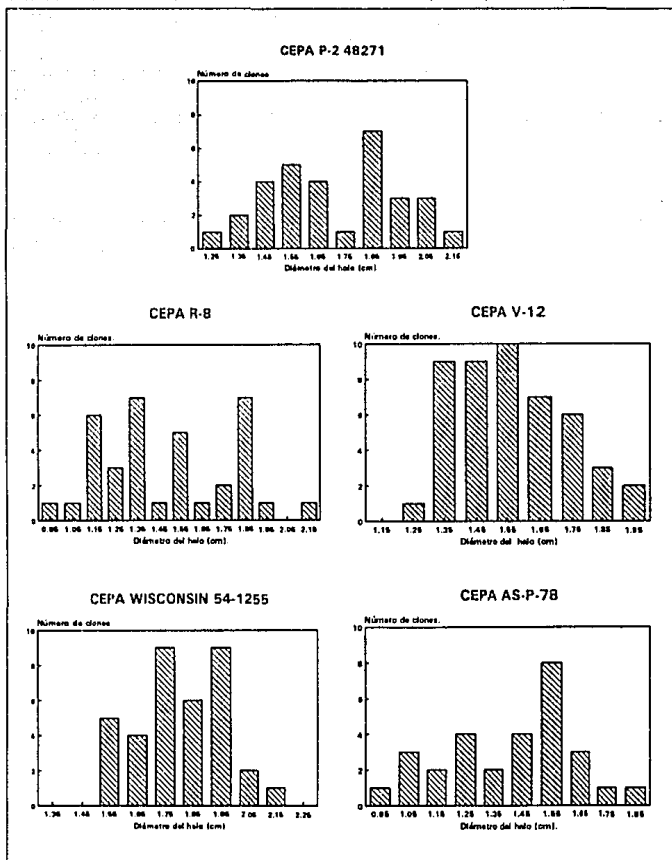


FIG. 8. Clones evaluados por el método de cilindros de agar.

Una vez de obtenidas las curvas de distribución, se seleccionaron 2 clones que formaron los halos de inhibición más grandes, 2 de tamaño medio y 2 más pequeños (comparando clones de la misma cepa) para su posterior estudio. Esto se hizo para cada una de las cepas con el fin de probar los clones seleccionados en FS y en FL.

Los clones seleccionados por el método de cilindros y sus respectivos halos de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* fueron los que se muestran en la tabla 5.2.

Este experimento nos permite observar en primer lugar que las cepas no son homogéneas y que existen clones dentro de cada cepa con diferencias importantes en cuanto a medias, a desviaciones y a rangos de variabilidad, por lo tanto se hace aún más importante esta selección, ya que los resultados de las fermentaciones anteriores serían el "promedio" de todos los clones existentes en las cepas, pero, como se ha visto, son cepas heterogéneas.

También se ha demostrado que todas las poblaciones analizadas tienen una distribución normal, lo que nos permitió en experimentos posteriores, realizar análisis estadísticos con métodos paramétricos, los cuales son más poderosos que los análisis no paramétricos para muestras con distribuciones distintas a la normal.

CEPA	CLON	DIAMETRO DE HALO DE INHIBICION
AS-P-78	9	0.960
	6	1.020
	19	1.545
	22	1.635
	20	1.665
	21	1.820
R-8	7	1.035
	12	1.145
	22	1.770
	14	1.835
V-12	14	1.330
	2	1.345
	12	1.755
	23	1.850
	24	1.940
P-2	17	1.360
	7	1.445
	9	1.890
	4	2.005
	2	2.015
WISCONSIN	12	2.060
	15	2.070
	1	2.165
	17	2.165
	4	2.310
	6	2.365

TABLA. 2. Clones seleccionados por el método de cilindro de agar y sus respectivos halos de inhibición.

5.3. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES SELECCIONADOS DE LA CEPA AS-P-78.

El siguiente experimento consistió en el desarrollo de la Fermentación Sólida y Líquida los clones seleccionados para determinar la capacidad de cada uno de ellos para producir en FS y en FL. Los clones seleccionados de la cepa AS-P-79 fueron: 6, 9, 19, 20, 21 y 22.

Se utilizaron los medios específicos para esta cepa (mencionados en los métodos), tanto para la FS como para la FL. Se midieron los parámetros de biomasa, pH, consumo de azúcares reductores, producción de penicilina y humedad (en FS). En la Figura 9 se presentan únicamente las cinéticas de producción de penicilina, tanto en FS como en FL.

Para facilitar el análisis de los resultados, en la Tabla 3 se presentan los valores máximos de producción y tiempos de producción máxima, así como los valores relativos de producción, productividad y tiempo para los clones de la cepa AS-P-78.

Con estos resultados se puede observar que la cepa AS-P-78 es muy heterogénea, ya que se aislaron clones con producciones muy diferentes en FS (Rango: 225-8750 $\mu\text{g/g}$). En FL las producciones son mucho más bajas y las diferencias entre clones no son tan grandes (Rango: 239-567 $\mu\text{g/ml}$).

Se observa también que el clon # 20 es el mayor productor tanto en FS como en FL. Sin embargo, el clon que presenta la menor producción en FS (clon 6) tiene una producción media en FL.

En cuanto al crecimiento en FS se puede comentar (cinéticas de biomasa no presentadas) que el clon # 20 tiene

un crecimiento medio en comparación con los demás clones. Alcanza a producir 1.5 mg de biomasa/g, mientras que el clon 19 es el que presenta mayor crecimiento (206 mg/g) y el clon 22 menor crecimiento (78 mg/g). Se observa una fase de crecimiento exponencial entre las 40 y las 60 hrs aproximadamente. Las cinéticas de pH en FS son prácticamente las mismas para todos los clones, igual que la utilización de azúcares reductores. La tendencia de la humedad es hacia el aumento. Los clones 19 y 21 llegan hasta casi el 85% de humedad al final de la fermentación.

En FL se observan cinéticas de pH un poco más dispersas. El crecimiento exponencial se observa entre las 40 y las 65 hrs aproximadamente. No todos los clones consumen todos los azúcares reductores disponibles. En FL la producción de los distintos clones es muy baja con respecto a lo que se esperaba, ya que se habían reportado mayores producciones para esta cepa.

Se puede ver que el clon 20 puede ser un buen prototipo para la caracterización por ser el clon de mayor producción, así como los clones 6 y 9 que tienen producciones relativas menores que 1.

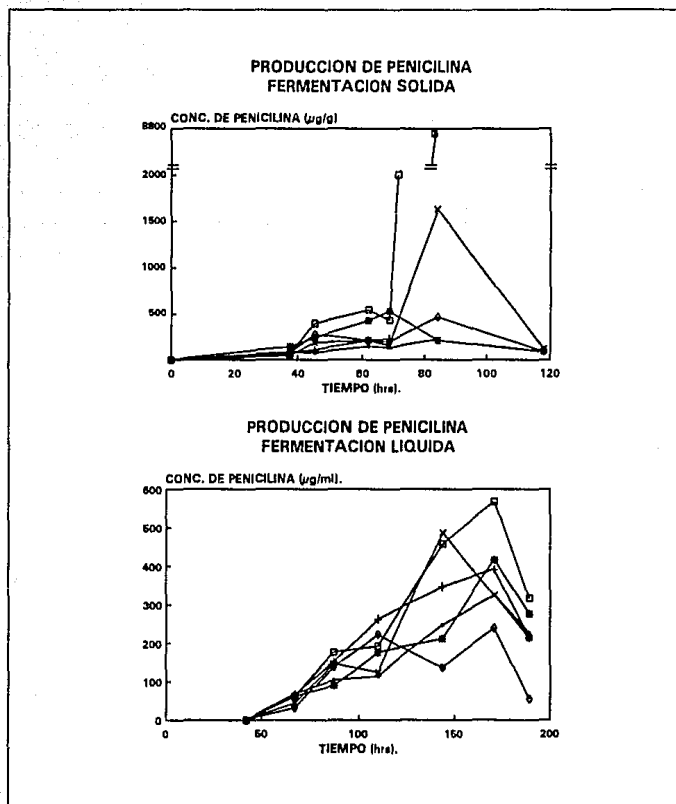


FIG. 9. Cinéticas de producción de penicilina en FS y FL de los clones de la cepa AS-P-78: (●) clon 6, (■) clon 9, (✱) clon 19, (□) clon 20, (×) clon 21 y (⊕) clon 22.

FERMENTACION SOLIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/g}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
6	225	84	2.7
9	230	69	3.3
19	530	69	7.7
20	8750	84	104.2
21	1627	84	19.4
22	464	84	5.5

FERMENTACION LIQUIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
6	326	161	2.0
9	392	161	2.5
19	417	161	2.6
20	567	161	3.6
21	486	143	3.4
22	239	161	1.5

CLON	PRODUCCION RELATIVA (ps/pl)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA (PS/PL)
6	0.69	1.35
9	0.59	1.32
19	1.27	2.96
20	15.42	28.94
21	3.35	5.71
22	1.94	3.67

TABLA 3. Comparación entre FS y FL de los clones de la cepa AS-P-78.

5.4. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES SELECCIONADOS DE LA CEPA R-8.

Para esta cepa se probaron los clones 7, 12, 14 y 22, midiendo los siguientes parámetros: biomasa, pH, consumo de azúcares reductores, producción de penicilina y humedad (en FS). Las cinéticas de producción para FS y FL son las que se observan en la Figura 10.

En FS para todos los clones se observa que la producción comienza a las 75 hrs (Fig. 10), totalmente desfasada con el crecimiento, en donde hay una fase de adaptación de aproximadamente 45 hrs, al término de las cuales comienza la fase exponencial, que se detiene alrededor de las 95 hrs. En cambio . Las cinéticas de pH y azúcares reductores son similares para todos los clones; los azúcares se consumen prácticamente en su totalidad. La humedad final alcanza niveles de 78%.

En FL todas las cinéticas son prácticamente iguales. Solamente la producción y el consumo de azúcares reductores son distintos, pero siguiendo el mismo perfil. Se observa que el clon 12 tiene comportamientos distintos a los demás clones probados: aumenta la humedad durante la fermentación en mayor grado, tiene un mayor crecimiento y por lo tanto utiliza más rápido los azúcares reductores.

En la Tabla 4 se presentan los resultados demuestran que la cepa R-8 tiene productividades elevadas, tanto en FS como en FL y la producción es muy homogénea, no existen grandes diferencias, sobre todo en FL. Esto probablemente se debe a que es una cepa de aislamiento reciente. Las producciones y productividades relativas también son más homogéneas que las de la cepa AS-P-78. Todas son mayores a uno, lo cual significa que los clones de la cepa R-8 tienen mayor capacidad para

producir en el sistema de FS que en el sistema tradicional en líquido.

En esta cepa los tiempos de producción máxima en FL son prácticamente los mismos que para la cepa AS-P-78, pero en FS los clones de la cepa R-8 son más lentos y tienen una mayor dispersión.

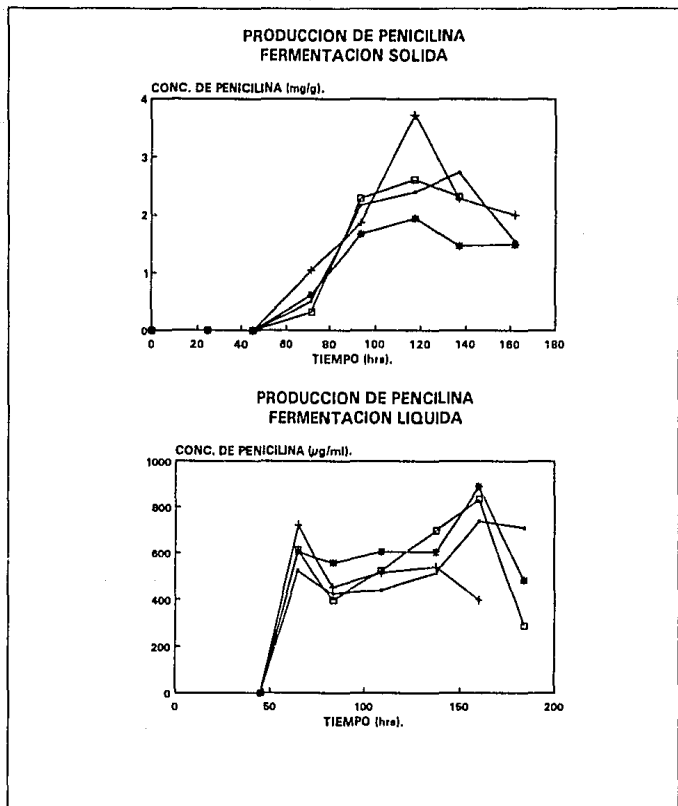


FIG. 10. Cinéticas de producción de penicilina en FS y FL de los clones de la cepa R-8: (●) clon 7, (+) clon 12, (*) clon 14 y (□) clon 22.

FERMENTACION SOLIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/g}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
7	2733	137	19.9
12	3716	117.5	31.6
14	1935	117.5	16.5
22	2604	122.4	22.2
FERMENTACION LIQUIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
7	739	115	4.8
12	721	115	4.7
14	890	115	5.4
22	834	115	5.2
CLON	PRODUCCION RELATIVA (ps/pl)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA (PS/PL).	
7	3.70	4.15	
12	5.15	6.72	
14	2.18	2.89	
22	3.12	4.11	

TABLA 4. Comparación entre FS y FL de los clones de la cepa R-8

5.5. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES SELECCIONADOS DE LA CEPA V-12.

Los clones de la cepa V-12 seleccionados (2, 12, 14, 23 y 24) fueron probados en FS y FL como se describe en los métodos, midiendo la biomasa en cada punto, pH, consumo de azúcares reductores, producción de penicilina y humedad (para FS) obteniéndose las cinéticas respectivas (Figura 11).

Para los clones de esta cepa se observó, tanto en FS como en FL un comportamiento de pH distinto al que se presenta en otras cepas. La cinética de pH observada es probablemente una característica asociada a la cepa.

Además se observaron diferencias en FS muy marcadas en los tiempos de crecimiento y esporulación, con el siguiente orden: 14>>12>24>2>23, lo cual se refleja en un menor tiempo de máxima producción para el clon 14, aunque se obtiene una menor producción (Fig. 11). En ningún caso se utilizaron todos los azúcares disponibles; permanecen sin consumirse entre 50 y 70 mg/g.

En FL el mayor productor es el clon # 14 (344 $\mu\text{g/ml}$) y es el que más crece. El clon que presenta la menor producción es el #2 (136 $\mu\text{g/ml}$), no crece mucho y es el menor consumidor de azúcares reductores.

Una comparación entre la producción obtenida por FS y por FL para los clones de la cepa V-12 se presentan en la Tabla 5.

La producción de los clones de la cepa V-12 (Fig. 11) muestra una variación en la producción muy elevada, ya que el rango es muy grande (310-1287). Esto se observa también para los tiempos de producción máxima, en donde el rango va de 92 a 161 hrs. En general se observa que para los clones de esta

cepa, los tiempos de producción máxima en FS son más largos que en FL.

En FL las producciones tienen menor variabilidad, pero los tiempos de producción máxima son distintos, en un rango de 69.5 a 119 hrs). A pesar de esta heterogenidad no se observan diferencias muy importantes en cuanto a productividad relativa. Únicamente el clon 23 tiene una productividad relativa elevada. Los demás clones presentan casi el mismo valor. El clon 6 no creció en FL pero en FS sí se desarrolló aunque presenta la producción más baja. Para el resto de los clones, todas las producciones y productividades relativas son mayores que uno lo que significa que todos los clones tienen la capacidad para producir más en FS que en FL, aunque no todos en la misma medida.

La producción en líquido es muy baja, prácticamente la menor de todas las cepas probadas. Este resultado no se esperaba, ya que es una cepa de mutación y aislamiento reciente especial para FL (resistente a AFA). A pesar de ser muy bajo el nivel de producción, todas las cepas se comportan prácticamente igual, no hay mucha diferencia.

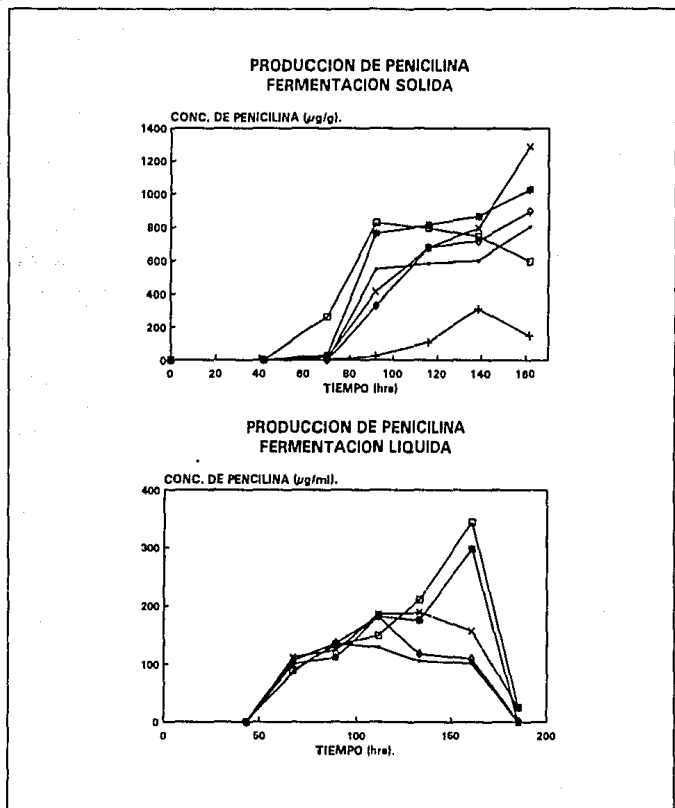


FIG. 11. Cinéticas de producción de penicilina en FS y FL para los clones de la cepa V-12: (—◄) clon 2, (—+) clon 6, (—*) clon 12, (—◻) clon 14, (—X) clon 23 y (—◊) clon 24.

FERMENTACION SOLIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/g}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
2	805	161.5	5.0
6	310	138.5	2.2
12	1028	161.5	6.4
14	825	92.0	9.0
23	1287	161.5	8.0
24	897	161.5	5.6
FERMENTACION LIQUIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
2	136	85	1.6
6	-	-	-
12	298	119	1.9
14	344	119	2.2
23	189	90	1.5
24	182	69.5	1.7
CLON	PRODUCCION RELATIVA (pb/pl)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA (PS/PL)	
2	5.90	3.13	
6	-	-	
12	3.45	3.37	
14	2.39	4.09	
23	6.81	5.33	
24	4.92	3.29	

TABLA 5. Comparación entre FS y FL de los clones de la cepa V-12.

5.6. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES SELECCIONADOS DE LA CEPA P-2.

Los clones seleccionados de la cepa P-2 (2, 4, 7, 9 y 17), fueron probados en FS y FL. Se midió durante la fermentación la biomasa, el pH, los azúcares reductores consumidos, la humedad en FS y la producción de penicilina. En la Figura 12 se presentan las cinéticas de producción para los clones de la cepa P-2 en FS y FL. A partir de estos resultados se estableció una comparación entre los diferentes clones (Tabla 6).

Los resultados en FS de los clones de la cepa P-2 muestran una mayor producción para el clon #4 (10555 $\mu\text{g/g}$) alcanzando el máximo a las 138 hrs. La humedad en ese punto es de 75.5%. Se observa un aumento de biomasa hasta las 90 hrs y a partir de esta hora comienza a descender. La cinética de humedad para este clon presenta una pendiente muy regular y muy suave.

El clon #9 produce 9696 $\mu\text{g/g}$ y también alcanza su máximo a las 138 hrs. La cinética de biomasa es paralela a la del clon #4, pero ligeramente por encima. Las cinéticas de pH de ambos clones son prácticamente idénticas. La humedad en el punto de máxima producción es de 74%. La producción en ambos casos comienza a las 40 hrs y presenta dos pendientes.

El clon #2 presenta la producción más baja (2797 $\mu\text{g/g}$) a las 113 hrs. Es el clon que presenta la mayor humedad en el punto de máxima producción. Este clon esporuló mucho más rápido y con un color más fuerte que los demás.

El clon #7 presenta un retraso en el inicio de la producción, ya que comienza casi a las 100 hrs, pero tiene una velocidad de producción inicial muy elevada.

En cuanto a la FL el clon que presenta una mayor producción es el # 17 (2090 $\mu\text{g/ml}$) a las 165 hrs. Sin embargo no presenta gran crecimiento en comparación con los demás clones de esta cepa.

Las productividades tanto en FS como en FL son muy elevadas con respecto a las que se obtuvieron con los clones de las cepas AS-P-78, P-2 y V-12. Los clones 4 y 9 presentan los valores más elevados de producción relativa (10.82 y 9.63 respectivamente. En general, los clones de esta cepa producen mejor que los demás.

Comparativamente se observa que el clon que presenta mejor producción en sólido también es el que menos produce en líquido (#2). El clon que más produce en líquido tiene un comportamiento medio en FS (#17). El clon que presenta mayor producción en FS presenta una producción media en FL.

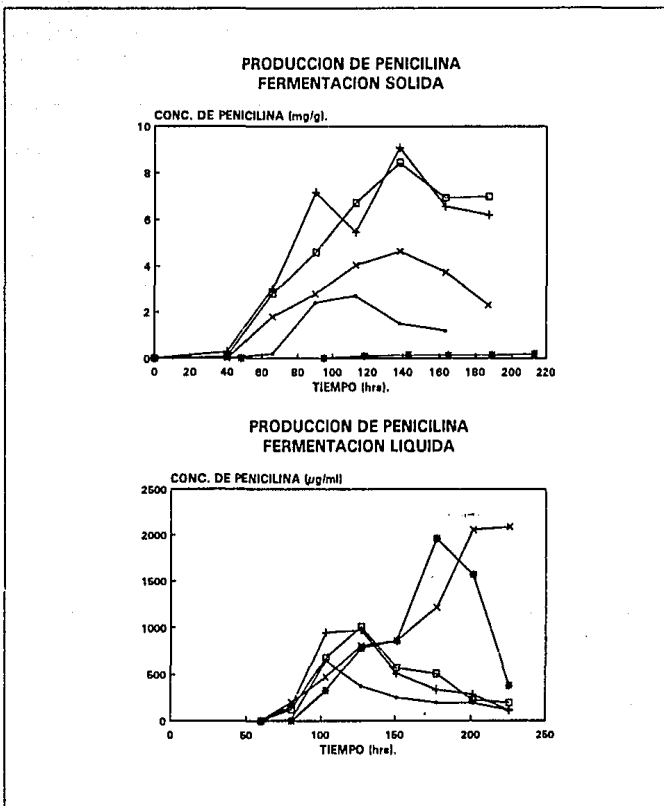


FIG. 12. Cinéticas de producción de penicilina en FS y FL para los clones de la cepa P-2: (—●—) clon 2, (—+—) clon 4, (—*—) clon 7, (—□—) clon 9 y (—×—) clon 17.

FERMENTACION SOLIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/g}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
2	2797	163	24.8
4	10555	138	76.5
7	6852	213	32.2
9	9696	138	70.3
17	5662	113	50.1
FERMENTACION LIQUIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
2	645	43	7.8
4	975	67	9.1
7	1961	117	12.5
9	1006	43	12.1
17	2090	165	10.2
CLON	PRODUCCION RELATIVA (ps/pl)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA (PS/PL)	
2	4.34	3.18	
4	10.82	8.41	
7	3.49	2.57	
9	9.63	5.81	
17	2.71	4.91	

TABLA. 6. Comparación entre FS y FL de los clones de la cepa P-2.

5.7. FERMENTACION LIQUIDA Y SOLIDA DE LOS CLONES SELECCIONADOS DE LA CEPA WISCONSIN ATCC 54-1255.

Para esta fermentación se probaron los clones 1, 4, 6, 12, 15 y 17. Las cinéticas de producción obtenidas en FS y FL fueron las que se presentan en la Figura 13. A partir de los resultados obtenidos se estableció una comparación entre clones de la cepa Wisconsin 54-1255 (Tabla 7).

El clon #6 de la cepa Wisconsin presenta la mayor producción en FS, mientras que el clon # 15 produce la menor concentración. También se observa que la cinética de humedad del clon # 4 es la que presenta menores valores mientras que la cinética de humedad del clon # 15 es la que tiene mayores valores. El clon # 4 presenta también un mayor crecimiento que todos los demás clones.

En cuanto a la FL para los clones de la cepa Wisconsin se observa que el # 15 presenta la mayor producción, mientras que el clon # 6 tuvo la producción más baja (siendo el de mayor producción en FS). Prácticamente no hay diferencias en cuanto a crecimiento en FL entre todos los clones.

En esta prueba se observa que el mejor clon en FS tiene la producción mas baja en FL y el clon que mejor produce en FL es el peor productor en FS.

En FS se observa un crecimiento muy elevado en el clon 4. La fase de adaptación para los demás clones se prolonga hasta las 22 hrs aproximadamente. La fase exponencial va de las 22 a las 72 hrs. Las cinéticas de pH son prácticamente iguales. Los azúcares reductores se consumen lentamente y no totalmente. La producción de penicilina comienza a las 38 hrs aproximadamente, deteniéndose alas 65 hrs en promedio. Se alcanzan humedades hasta de 75%.

En FL se observa homogeneidad en todas las cinéticas. El clon 6 presenta un menor crecimiento (ligero) y los tiempos de producción varían para cada uno de los clones.

En estas dos fermentaciones se observan predominantemente los valores elevados tanto en producción relativa como en productividad relativa. Los valores son más elevados que los que se observan en promedio para las demás cepas, lo que significa que los clones provenientes de la cepa Wisconsin tienen un potencial elevado para producir en FS. En general es una buena cepa porque produce muy rápido.

Es importante mencionar que, de las cepas probadas, esta es la más silvestre, es decir, la que se ha manipulado genéticamente en menor grado.

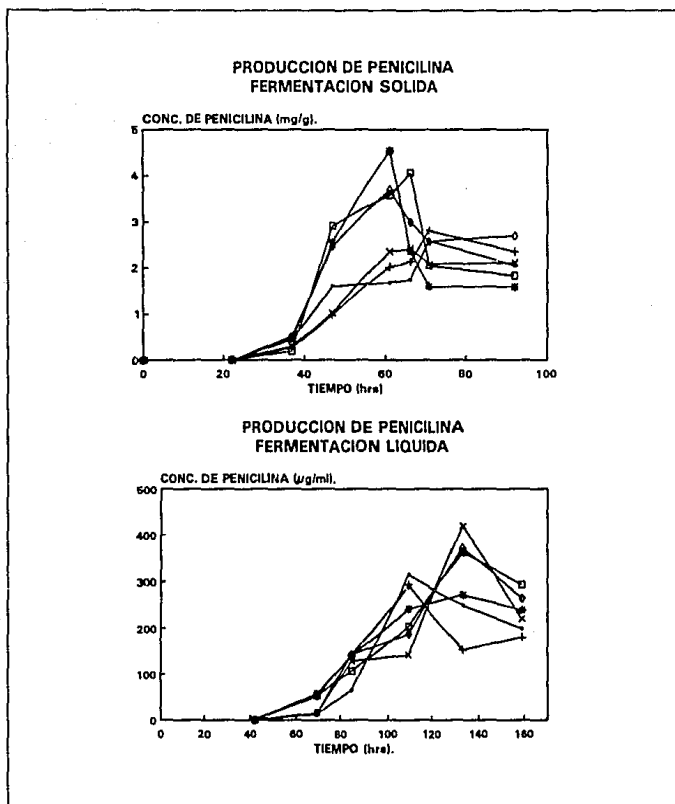


FIG. 13. Cinéticas de producción de penicilina en FS y FL para los clones de la cepa Wisconsin 54-1255: (●) clon 1, (⊕) clon 4, (✱) clon 6, (⊞) clon 12, (✕) clon 15 y (⊖) clon 17.

FERMENTACION SOLIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/g}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
1	2589	71	36.5
4	2803	71	39.5
6	4531	61	74.3
12	4057	66	61.5
15	2412	66	36.5
17	3684	61	60.4
FERMENTACION LIQUIDA:			
CLON	PROD. MAX. ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (hrs)	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)
1	314	67	4.7
4	292	67	4.4
6	271	91	3.0
12	362	91	4.0
15	419	91	4.6
17	371	91	4.1
CLON	PRODUCCION RELATIVA (p _s /p _l)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA (PS/PL)	
1	8.25	7.77	
4	9.60	8.98	
6	16.72	24.77	
12	11.21	15.38	
15	5.76	7.93	
17	9.93	14.73	

TABLA 7. Comparación entre FS y FL de los clones de la cepa Wisconsin 54-1255.

5.8. COMPARACION DEL DESARROLLO DE LAS CEPAS Y LOS CLONES SELECCIONADOS.

En esta sección se pretende hacer una recopilación de las observaciones y resultados más importantes de las fermentaciones descritas anteriormente.

En primer lugar se observa (Tabla 8) que las mejores cepas en FL son también las mejores en FS, aunque se observa también que las productividades relativas de las mejores cepas productoras en sólido son bajas.

CEPA	PRODUCCION EN FS	PRODUCCION EN FL	PRODUCTIVIDAD RELATIVA.
P-2	2085	831	3.82
R-8	1873	633	3.53
AS-P-78	1366	783	2.50
WISCONSIN	1355	599	5.00
V-12	202	200	1.44

TABLA 8. Producciones en FS y FL y productividades relativas obtenidas con todas las cepas.

De los resultados obtenidos para las fermentaciones correspondientes a todos los clones seleccionados se puede

observar un mayor rango de producciones relativas y productividades que las que se encontraron en las cepas originales (Tabla 9). Hay un clon (clon 6 de la cepa Wisconsin) que produce más de 16 veces mejor en FS que en FL y otro (clon 20 de la cepa AS-P-78) que presenta más de 29 veces mayor productividad. Al mismo tiempo fueron aislados dos clones que crecen más en FL que en FS (clones 6 y 9 de la cepa AS-P-78). El clon # 7 de la cepa P-2 (la que presenta mayor producción) se desarrolla y produce muy bien en FL, pero prácticamente no crece ni produce en FS. De manera inversa, el clon 6 de la cepa V-12 crece y produce (poco) en FS, pero no crece en FL.

CEPA ORIGINAL	CLONES		
	RANGO PRODUCCION RELATIVA	RANGO PRODUCTIVIDAD RELATIVA	RANGO TIEMPO RELATIVO
P-2	0.10-10.80	0.08- 8.40	0.50-1.34
R-8	2.18- 5.15	2.90- 6.70	0.67-0.78
V-12	2.39- 6.81	3.13- 5.33	0.77-2.32
AS-P-78	0.60-15.40	1.30-29.00	0.43-0.59
WIS	5.76-16.7	7.80-25.00	0.46-0.66

TABLA 9. Rangos de desarrollo relativo (FS/FL) de los clones derivados de cada cepa de *Penicillium chrysogenum*.

Se puede observar también (Tabla 10), que el mejor clon de cada cepa en FS es el de menor producción en FL, y que el mejor clon productor en FL es el de menor producción en FS. Estas observaciones se dan en todas las cepas excepto AS-P-78, ya que en este caso la relación es directa. Además la cepa AS-P-78 muestra relación directa entre el diámetro de inhibición y las fermentaciones sólida y líquida (Fig. 14).

CEPA	MEJOR CLON EN FS	DESARROLLO EN FL	MEJOR CLON EN FL	DESARROLLO EN FS
Wis	6	Bajo	15	Malo
R-8	12	Malo	14	Malo
P-2	4	Medio	17	Medio
V-12	6	Malo	14	Medio
AS-P-78	20	Alto	20	Alto

TABLA 10. Desarrollo en FL del mejor clon de cada cepa en FS y desarrollo en FS del mejor clon de cada cepa en FL.

Los comentarios anteriores se refieren al análisis de los clones de cada cepa por separado. Si se consideran a todos los clones en conjunto se observa que 4 de los 5 clones con mejores productividades relativas provienen de la cepa de más baja producción (Wisconsin 54-1255) (Tabla 11).

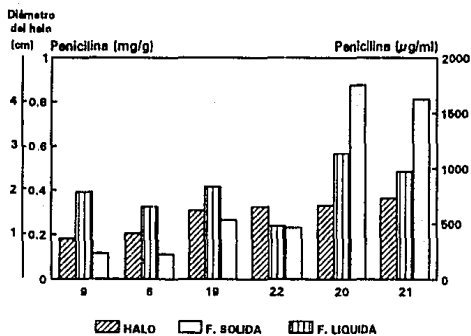


FIG. 14. Comparación de la producción en FS, en FL y el diámetro del halo de inhibición de cada uno de los clones de la cepa AS-P-78.

ORDEN	ORIGEN	CLON	PRODUCTIVIDAD ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)	PRODUCTIVIDAD RELATIVA
1	AS-P-78	20	104.2	28.9
2	WISCONSIN	6	74.3	24.8
3	WISCONSIN	12	61.5	15.4
4	WISCONSIN	17	60.4	14.7
5	WISCONSIN	4	39.5	9.0
6	P-2	4	76.5	8.4
7	WISCONSIN	15	36.5	7.9
8	WISCONSIN	1	36.5	7.8

TABLA 11. Clones que presentaron las productividades relativas más altas en el tiempo de máxima producción.

5.9. EVALUACION DEL METODO DE CILINDROS DE AGAR PARA LA OBTENCION DE CEPAS SOBREPDUCTORAS DE PENICILINA.

Como se mencionó anteriormente, se tomaron los clones de mayor producción, así como ejemplos de mediana y baja producción en cada una de las distintas cepas. Las Tablas 12 y 13 se utilizaron para evaluar la eficiencia del método de cilindros de agar para la obtención de cepas sobreproductoras de penicilina.

CEPA	CLONES SELECCIONADOS POR SU ELEVADA PRODUCCION EN CILINDRO DE AGAR.	CLASIFICACION EN FERMENTACION SOLIDA
AS-P-78	20 21	ALTA ALTA
R-8	14 22	MEDIA ALTA
V-12	23 24	ALTA MEDIA
P-2	2 4	BAJA ALTA
WISCONSIN	4 6	MEDIA ALTA

TABLA 12. Nivel de producción en sólido de las cepas que resultaron altas productoras en cilindro de agar.

CEPA	CLONES SELECCIONADOS POR SU BAJA PRODUCCION EN CILINDRO DE AGAR.	CLASIFICACION EN FERMENTACION SOLIDA
AS-P-78	6 9	BAJA BAJA
R-8	7 12	MEDIA ALTA
V-12	2 14	MEDIA MEDIA
P-2	7 12	BAJA MEDIA
WISCONSIN	12 15	ALTA BAJA

TABLA 13. Nivel de producción en sólido de las cepas que resultaron bajas productoras en cilindro de agar.

Los resultados de estas tablas indican que de los clones seleccionados en cilindro de agar por su elevada producción, el 60% resultaron de alta producción en fermentación sólida y sólo el 10% de estos clones presenta una baja producción.

Al observar la tabla 12 se puede apreciar que el 40% de las cepas seleccionadas como bajas productoras en cilindro de agar resultaron bajas productoras en FS. El mismo porcentaje se encuentra con las medianas productoras en FS y solamente un 20% resultaron buenas en FS.

Se encontró que existe relación entre la producción en cilindro de agar y la producción en FS en la cepa AS-P-78, ya que los clones que producen halo grande son buenos productores en FS y los que producen halo pequeño son malos; pero para

esta cepa, el cilindro de agar no es capaz de detectar al clon excepcionalmente bueno. Para la cepa R-8 no se encontró una relación directa de la producción en sólido con respecto al halo de inhibición. Por el contrario, se observa una relación inversa. Pero sí se encontró una relación directa entre el halo de inhibición y la producción en líquido. En la cepa V-12 se observa que hay una cierta relación directa entre el halo y la producción en FS, pero es mala, y no hay relación entre el halo de inhibición y la producción en FL. Para la cepa P-2 hay una relación inversa entre el halo y la producción en FL y una relación directa entre halo de inhibición y producción en FS, excepto para el clon 2. Por último, para la cepa Wisconsin se observa una relación más o menos directa entre el halo y la producción en FS y una relación inversa entre halo y FL.

Es importante hacer notar que estas observaciones se hicieron únicamente tomando en cuenta el orden de las magnitudes de las variables medidas (producción y diámetro de halo de inhibición). En ningún momento se tomó en cuenta la correlación estadística.

Todas estas observaciones se muestran en la Tabla 14, en la cual se presentan en orden creciente la producción en cada uno de los sistemas y el halo de inhibición.

Al evaluar los clones aislados de mayor producción con respecto a la cepa original de la que se aisló, se encontró que algunos clones permitieron elevar la producción en un elevado porcentaje (Tabla 15); el clon 20 de la cepa AS-P-78 produce un 640% más que la cepa AS-P-78 y el clon 4 de la cepa P-2 produce 506% más que la cepa P-2.

CEPA	NIVEL	HALO	PROD. EN FS.	PROD. EN FL.
AS-P-78	BAJO	9	9	6
		6	9	6
	MEDIO	19	22	9
		22	19	19
	ALTO	20	21	21
		21	20	20
R-8	BAJO	7	14	12
		12	22	7
	ALTO	22	17	22
		14	14	14
V-12	BAJO	14	6	6
		2	2	2
	MEDIO	6	14	24
		12	24	23
	ALTO	23	12	12
		24	23	14
P-2	BAJO	12	15	6
		7	17	4
	MEDIO	9	7	9
		4	9	7
	ALTO	2	4	17
WISCONSIN	BAJO	12	15	6
		15	1	4
	MEDIO	1	4	1
		17	17	12
	ALTO	4	12	17
		6	6	15

TABLA 14. Comparación del desarrollo de los distintos clones en los dos sistemas de fermentación (FS y FL) con respecto al halo de inhibición.

CEPA	CLON	PRODUCCION EN FS	PRODUCCION RELATIVA	TIEMPO	INCREMENTO EN LA PRODUCCION (%)
P-2	Pa	2,084	2.5	115	
P-2	4	10,555	10.8	138	506
P-2	9	9,695	9.6	138	465
P-2	17	5,661	9.9	113	271
AS-P-78	Pa	1,366	1.7	92	
AS-P-78	20	8,750	15.4	84	640
WIS	Pa	1,354	2.3	70	
WIS	6	4,531	16.7	61	344
WIS	12	4,057	11.2	66	300

Pa: cepa parental.

TABLA 15. Mejoramiento de cepas obtenido con los mejores clones aislados.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

5.10. CARACTERIZACION DE LOS PROTOTIPOS SELECCIONADOS:

5.10.1. SELECCION DE PROTOTIPOS:

Con base en los resultados obtenidos anteriormente en las pruebas en FS y FL para todos los clones, se seleccionaron prototipos para su caracterización. Los clones seleccionados fueron:

- Cepa AS-P-78, clon 19: presenta producción baja (530 $\mu\text{g/g}$) y su producción relativa también es baja (1.27).
- Cepa AS-P-78, clon 20: tiene una elevada producción (8,750 $\mu\text{g/g}$) y su productividad es elevada (104.2 $\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$), ya que el tiempo de producción máxima es muy corto (84 hrs). También presenta una productividad relativa (PS/PL) muy elevada (28.94).
- Cepa P-2, clon 2: presenta una baja productividad relativa en comparación a los clones de esta cepa (4.34 $\mu\text{g/g}$) y esporula rápida y abundantemente.
- Cepa P-2, clon 4: presenta la más elevada producción (10,555 $\mu\text{g/g}$), aunque requiere de mucho tiempo para alcanzarla (138 hrs). Su producción relativa es elevada (10.82).
- Cepa Wisconsin, clon 6: presenta una elevada productividad relativa (24.77). Produce en muy poco tiempo (61 hrs) y esporula abundantemente.
- Cepa Wisconsin, clon 15: tiene una baja productividad relativa en comparación con los clones de esta cepa (7.93). Produce también en poco tiempo (66 hrs) y esporula rápido y abundante.

5.10.2. CARACTERIZACION.

Para la caracterización de estas cepas se realizó una nueva fermentación sólida para determinar las cinéticas de

respiración, de pH, de consumo de azúcares, de biomasa, de producción, de esporulación y de humedad. Esta última fermentación se realizó por triplicado.

pH:

En cuanto a las cinéticas de pH, se observa en la Figura 15. que las tres cepas presentan perfiles distintos en el comportamiento de su pH. Sin embargo, los prototipos que provienen de la misma cepa tienen comportamientos similares. Los prototipos de la cepa P-2 presentan un aumento en el pH a partir de las 50 hrs.

Es importante hacer notar que este experimento inició con un pH muy bajo y que a pesar de ello tuvo un buen desarrollo. Los prototipos 6 y 15 de la cepa Wisconsin inician la fermentación en un pH adecuado. Se observa un incremento importante al inicio de la fermentación, pero posteriormente vuelve a descender hasta el nivel de pH inicial y después aumenta ligeramente durante el resto de la fermentación. Por último, para los prototipos 19 y 20 de la cepa AS-P-78, se observa una ligera tendencia al aumento, pero el pH nunca se eleva arriba de un pH de 7.

HUMEDAD.

En las cinéticas de humedad se puede observar que en general, la tendencia es a elevar la cantidad de agua total conforme avanza la fermentación, y cada uno de los prototipos alcanza humedades finales muy semejantes, como se observa en la Fig. 16.

Todos los prototipos inician la fermentación con valores ligeramente inferiores a 70% y terminan con 75% aproximadamente. Se puede observar que la humedad aumenta más

Handwritten cursive letters 'P', 'M', and 'A'.

Handwritten cursive letters 'H', 'M', and 'A'.

Handwritten cursive letters 'O' and 'N'.

Handwritten cursive letters 'O', 'O', and 'N'.

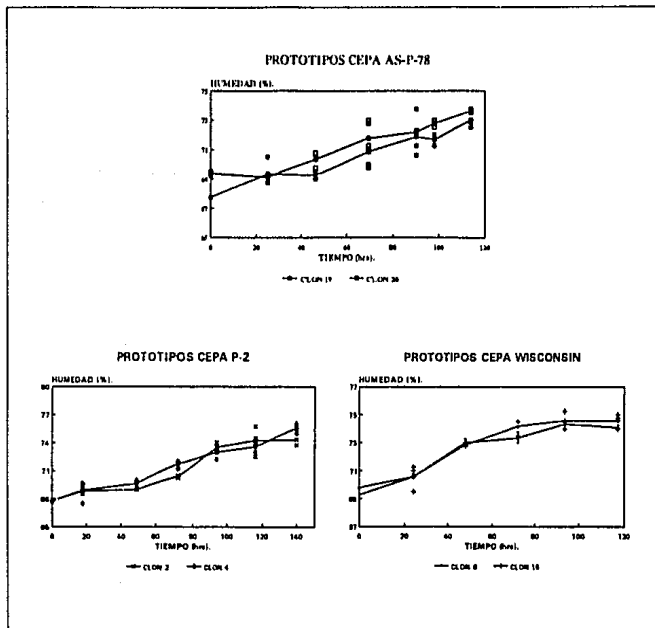


FIG. 16. Cinéticas de humedad durante la fermentación sólida de los prototipos seleccionados.

BIOMASA.

Las gráficas de biomasa (Fig. 17) nos indican que los prototipos de las cepas Wisconsin y AS-P-78 alcanzan una concentración de biomasa entre 150 y 200 mg/g. En cambio, los prototipos 4 y 2 de la cepa P-2 alcanzan 900 y 600 mg/g respectivamente. Se puede observar que el prototipo que

presenta una mayor velocidad de crecimiento (pendiente de la cinética en la fase exponencial) es el clon 6 de la cepa Wisconsin, seguido por el clon 15 del mismo origen. Ambos presentan una fase de adaptación de aproximadamente 20 hrs y la fase estacionaria se presenta alrededor de las 50 hrs.

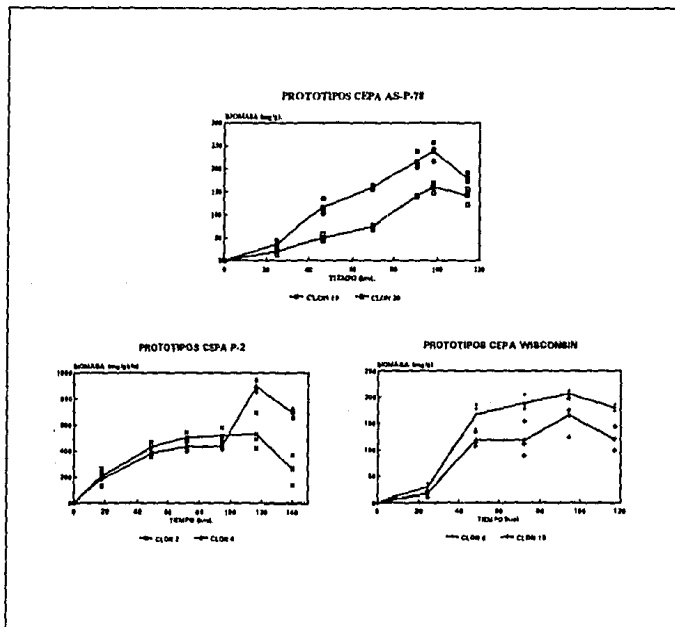


FIG. 17. Cinéticas de biomasa durante la fermentación sólida de los prototipos.

Los prototipos 19 y 20 de la cepa AS-P-78 son más lentos; crece más abundantemente el clon 19 y no se presenta una fase estacionaria bien definida.

El caso de los prototipos de la cepa P-2 es especial, ya que no se observa la fase de adaptación; probablemente se hubiera podido determinar si se hubiera realizado un muestreo entre los dos primeros puntos. La fase estacionaria se presenta alrededor de las 65 hrs. Sin embargo, el prototipo 4 tiene un aumento a las 120 que es extraño, ya que en ese tiempo se encuentra en fase estacionaria. Este dato puede ser un error experimental, pero si se compara con la gráfica de producción se observa que este incremento coincide con el tiempo de producción máxima.

CONSUMO DE AZUCARES.

Al observar las gráficas de consumo de azúcares reductores (Fig. 18) se puede apreciar que en ningún caso se consumen estos totalmente. Si se comparan con las cinéticas de biomasa se observa lo siguiente:

El prototipo 19 de la cepa AS-P-78, que consume azúcares más rápidamente que el prototipo 20 del mismo origen, también produce mayor cantidad de biomasa. Los dos prototipos de la cepa Wisconsin consumen prácticamente la misma cantidad de azúcares y tampoco se observa diferencia en la producción de biomasa. Para los prototipos de la cepa P-2 se observa que el número 2 consume una cantidad ligeramente mayor que el 4, lo cual se refleja en la gráfica de biomasa (excepto por el aumento en la fase estacionaria, lo cual puede estar apoyando la hipótesis de que sea un error experimental). Son los prototipos que consumen más azúcares, probablemente por el tiempo que requieren para la fermentación.

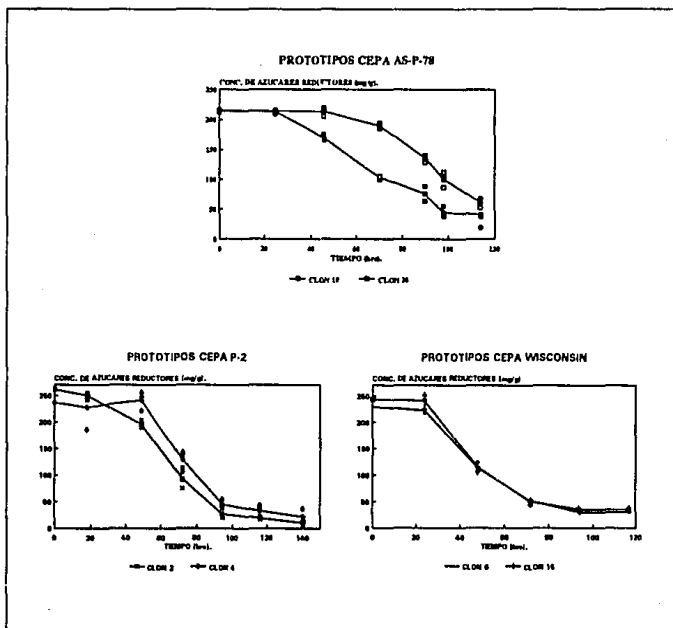


FIG. 18. Cinéticas de consumo de azúcares reductores durante la fermentación sólida de los prototipos.

PRODUCCION DE PENICILINA.

En cuanto a las cinéticas de producción se observa lo que ya se había determinado en los experimentos anteriores. Las producciones máximas coinciden con las obtenidas anteriormente, al igual que los tiempos de producción máxima y la forma de las cinéticas. Por lo tanto, se puede decir que la selección de los prototipos fué correcta.

En esta determinación son muy claras las diferencias, a pesar de que en los parámetros mencionados en las gráficas anteriores, las diferencias no son tan drásticas. Se puede ver que la dispersión en las primeras horas de muestreo no son muy grandes, y que esta dispersión se va incrementando conforme transcurre el experimento, de manera que al llegar al tiempo de máxima producción se encuentra la mayor dispersión en los puntos. Esta dispersión también parece depender de la cepa.

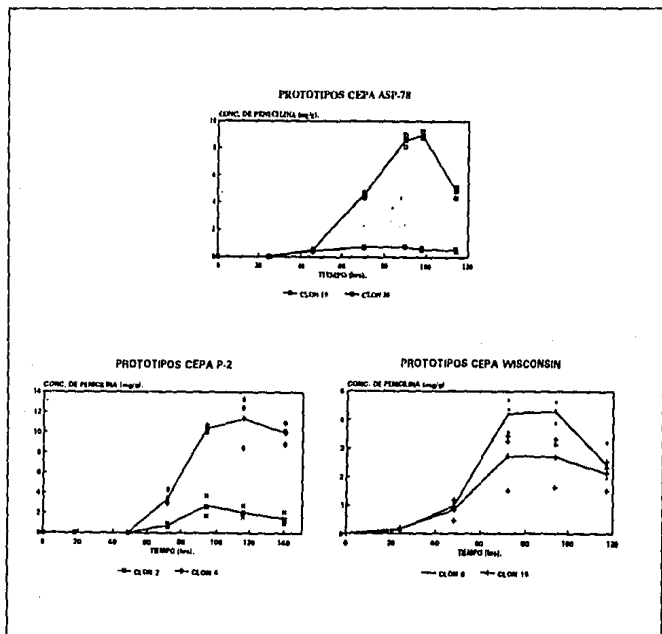


FIG. 19. Cinéticas de producción durante la fermentación sólida de los prototipos.

RESPIRACION.

En las Figuras 20 y 21 se presentan las gráficas de consumo de O_2 y de producción de CO_2 . Se pueden observar diferencias entre las cepas, y en algunos casos se presentan diferencias entre los clones prototipo de una misma cepa. Estas diferencias se observan principalmente en la producción de CO_2 . El inicio y el fin de la producción coincide en todos los casos con cambios de pendiente o puntos de inflexión en las gráficas de consumo de O_2 o de producción de CO_2 . En general coincide el inicio de la producción con el fin del descenso en la concentración de O_2 o con el fin del ascenso en a concentración de CO_2 . Además se observa una correspondencia del final de la producción con una estabilización a niveles altos de O_2 o bajos de CO_2 .

Los clones de la cepa AS-P-78 y P-2 tienen en común que los de elevada producción terminan una fase de rápido aumento en el consumo de CO_2 antes que los clones de baja producción. En los clones de la cepa Wisconsin parece que este comportamiento es inverso.

ESPORULACION.

También se midió la cantidad de esporas que produce cada clon seleccionado obteniéndose las gráficas que se presentan en la Fig. 22. Se observan diferencias importantes en cuanto a los tiempos del inicio de la esporulación; el prototipo 2 de la cepa P-2 y los prototipos de la cepa Wisconsin comienzan su esporulación aproximadamente a las 50 hrs. Los demás prototipos esporulan un poco más tarde. Entre los clones de la cepa AS-P-78 y de la cepa Wisconsin prácticamente no hay diferencias. En los prototipos de la cepa P-2 hay diferencia en el tiempo de inicio de la esporulación. Sin embargo ambos clones alcanzan el mismo número de esporas al final, a pesar de que a simple vista se apreciaban diferencias notables: el

prototipo 2 presenta una coloración mucho más intensa que el prototipo 4. Esto nos hizo pensar que este clon esporulaba rápida y abundantemente, pero al hacer la cuenta de esporas y obtener tan poca diferencia en el número de esporas pensamos que la diferencia en la coloración se debe únicamente a una mayor cantidad de pigmento en el prototipo 2. Podemos observar también que la esporulación comienza prácticamente al final de la producción en todas las cepas.

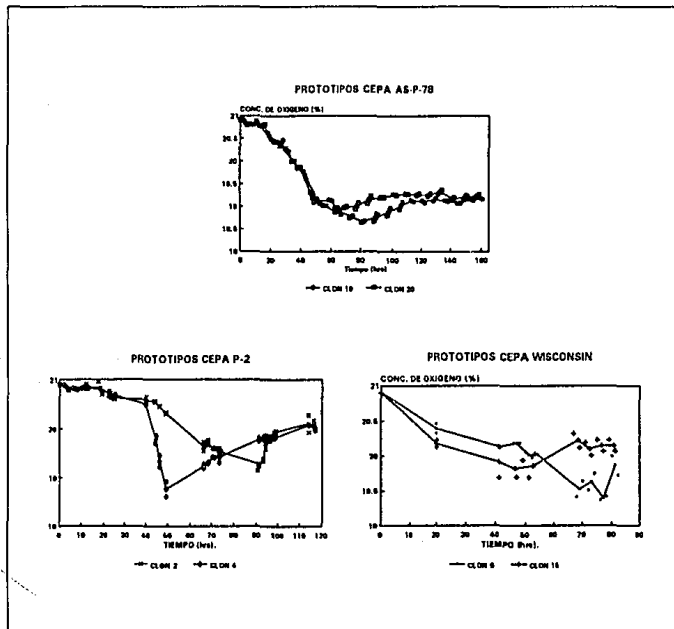


FIG. 20. Cinéticas de consumo de O_2 durante la fermentación sólida para los prototipos.

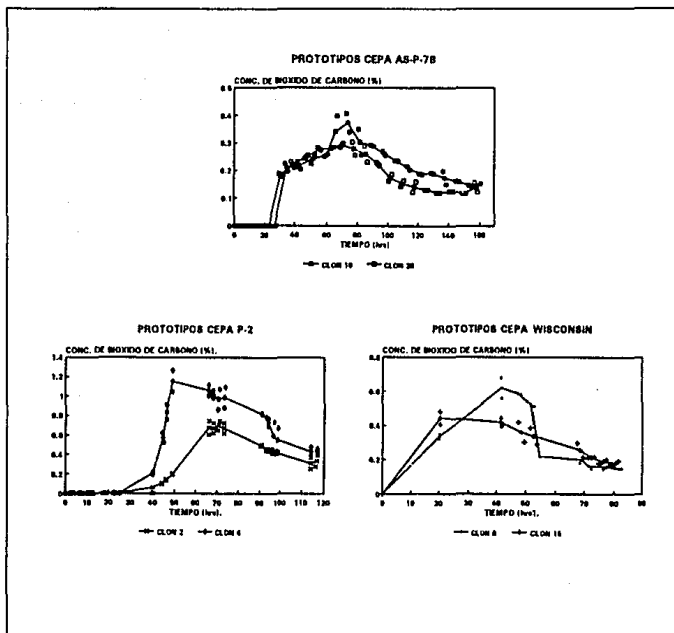


FIG. 21. Cinéticas de producción de CO_2 durante la fermentación sólida para los prototipos.

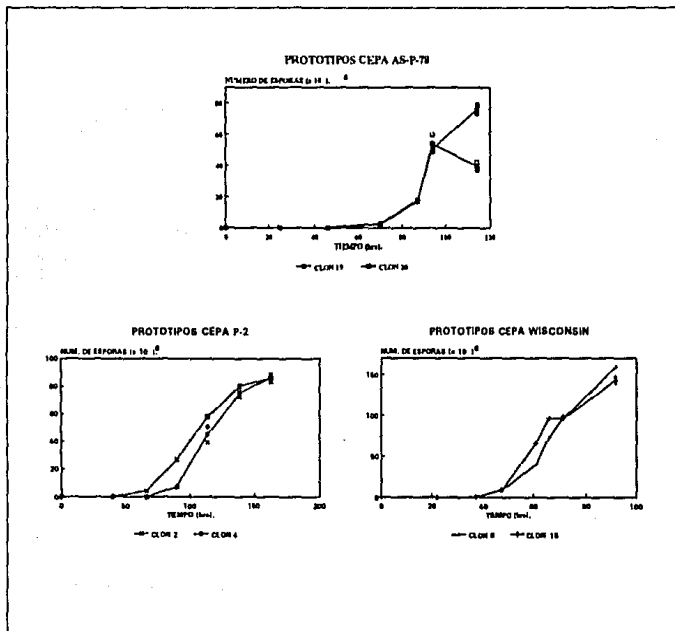


FIG. 22. Cinéticas de esporulación durante la fermentación sólida en los prototipos.

5.10.3. EFECTO DE LA PRESION OSMOTICA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION.

Para finalizar la caracterización de los prototipos seleccionados se determinó la resistencia de cada uno de ellos a la presión osmótica. Para lograr esto se utilizaron concentraciones crecientes de CaCl_2 . Se determinó el efecto de la presión osmótica sobre el crecimiento y sobre la producción utilizando el método de cilindro de agar.

Se utilizaron los siguientes valores de presión osmótica:

	π
A	3.35 (medio POWER)
B	10.00
C	18.00
D	26.00 (medio de FS)
E	28.00
F	32.00

Los resultados de esta prueba se muestran en las Figuras 23 y 24. Se presentan las gráficas obtenidas al medir la biomasa y la producción a diferentes valores de presión osmótica en el medio (π). La determinación de biomasa se realizó por peso seco fundiendo el agar que contenía cada una de las colonias, ya que para esta prueba se utilizó el método del cilindro de agar. Una vez fundido el medio con agar se lavó la biomasa con agua caliente. La determinación de la producción se realizó por bioensayo.

En todos los casos se observa una disminución en el crecimiento conforme aumenta la presión osmótica del medio. Únicamente el clon 20 de la cepa AS-P-78 presenta un ligero aumento en crecimiento conforme aumenta la presión osmótica, pero la caída de la curva es muy rápida. Es decir, que un incremento en la presión osmótica le favorece hasta cierto nivel, en el cual el efecto negativo sobre el crecimiento es

muy drástico. El prototipo #2 de la cepa P-2 crece muy bien con una presión osmótica de 3.5 (alcanzan los niveles más elevados de biomasa), pero su crecimiento es rápidamente afectado por la presión osmótica. En cambio el clon #4 no crece bien a esa misma presión, pero el efecto negativo sobre su crecimiento es menor. Sobresale ante todo la resistencia de los prototipos de la cepa AS-P-78 ante los diferentes niveles de presión, ya que el crecimiento prácticamente no se ve afectado hasta por lo menos una presión de 18 atm, aunque si se sobrepasa este límite, el clon 19 ya no es capaz de resistir y el clon 20 sí tiene todavía esa capacidad. El efecto de la presión osmótica sobre el crecimiento de la cepa Wisconsin es menos drástico, pero se observa desde 10 atm de presión.

En resumen en cuanto al crecimiento se observa que la cepa Wisconsin es la más resistente. En la cepa AS-P-78 el clon # 20 es más resistente que el clon # 19. Los dos clones prototipo de la cepa P-2 presentan prácticamente la misma sensibilidad, aunque el clon # 2 crece más.

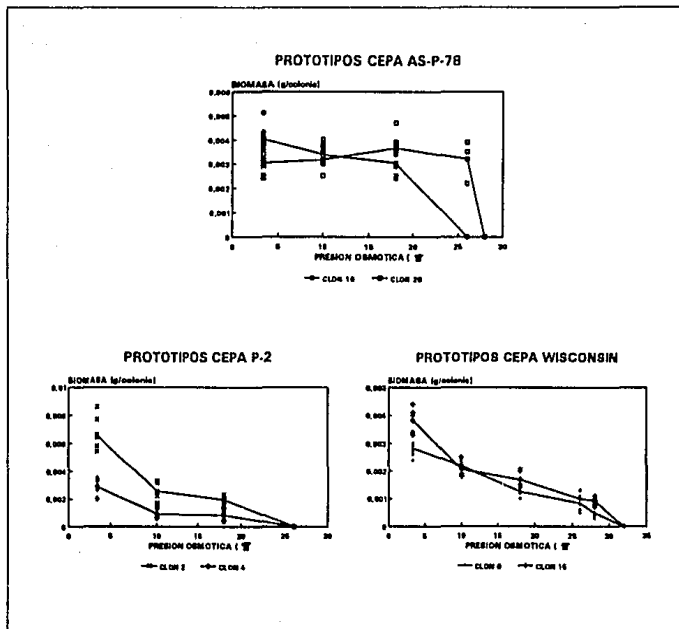


FIG. 23. Efecto de la presión osmótica sobre el crecimiento de los clones prototipo de *P. chrysogenum*.

En cuanto a la producción se observan en general comportamientos muy parecidos entre las parejas de prototipos. En la cepa AS-P-78 se mantiene el nivel de producción hasta una presión osmótica de 10 atm, después de las cuales desciende y vuelve a ascender, pero sin llegar al nivel original. Contrariamente a lo que se esperaba, la producción entre prototipos de una misma cepa es igual, no se observan diferencias. Los prototipos de la cepa Wisconsin son los únicos que crecen a una presión osmótica de 26 atm, pero no

producen. Los prototipos de la cepa P-2 se comportan mejor alrededor de 18 atm.

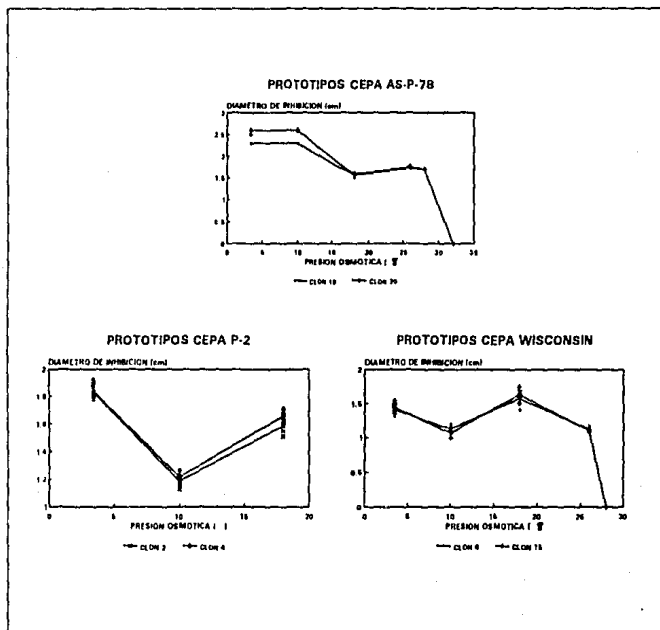


FIG. 24. Efecto de la presión osmótica sobre la producción de penicilina (medida como halo de inhibición en bioensayo).

6. DISCUSION DE RESULTADOS .

En los últimos 10 o 15 años se ha incrementado el interés en la fermentación sólida. De hecho se han aumentado y mejorado las metodologías utilizadas en este sistema y se han intentado nuevas aplicaciones en diversas áreas (Mudgett, 1986). Además se ha visto que estos estudios tienen implicaciones importantes a nivel industrial y económico (Shankaranand, 1992). Sin embargo existe el problema de contar con cepas adecuadas para este sistema de cultivo; esto es un factor que limita la explotación del potencial de este sistema.

Hasta ahora todos los esfuerzos realizados para la obtención de cepas especiales para FS se basan en la idea de que las mejores productoras en FL tendrán un comportamiento similar en FS. La tendencia general consiste en tomar la mejor cepa para FL y estudiar su potencial en el sistema de FS (Shankaranand, 1992). Se supondría que, en este caso, la cepa que produce bien en FL, al probarla en FS, produciría mejor, ya que se mantiene su potencial y además se obtienen las ventajas asociadas a la FS.

Algunos datos reportados indican que tal vez el método mencionado anteriormente no sea el más adecuado, ya que han encontrado que los cultivos de elevada producción de enzimas en FS producen poco en FL y viceversa. Esto aparentemente indica que la capacidad de una cepa para producir elevadas concentraciones de enzima sea determinado por la técnica de fermentación utilizada (Antier, 1991; Shankaranand, 1992). Se comienza a considerar que las cepas de elevada producción,

desarrolladas para su utilización en FL, son especialistas para este sistema de cultivo, por lo tanto su desempeño en FS puede ser muy pobre. En otras palabras, estos microorganismos pudieron haber perdido, durante su mejoramiento genético, ciertas características o capacidades que le permitían desarrollarse óptimamente en FS, que es un medio más parecido a su habitat natural que la FL (Barrios Gonzalez y col, 1991). Los resultados encontrados en este tipo de trabajos indican la necesidad de diseñar una metodología específica para el desarrollo de cepas para FS.

El desarrollo de esta investigación está enfocado a establecer si, en el caso de los metabolitos secundarios (y en particular en el de la penicilina), la eficiencia de producción en FS depende de la cepa. Si este es el caso, identificar las características de las cepas de alto rendimiento en FS. Se pretende también que los resultados de la presente investigación sirvan como base para el desarrollo de métodos de selección de mutantes o recombinantes de alta producción de penicilina (y otros metabolitos secundarios) especiales para fermentación sólida.

6.1. EVALUACION DEL DESARROLLO DE LAS CEPAS.

En este trabajo se cuantificó la capacidad de diferentes cepas para producir penicilina en Fermentación Sólida, en relación a su capacidad para hacerlo en Fermentación Líquida. Los resultados muestran como primer punto que no todas las cepas tienen la misma capacidad para producir penicilina en FS en relación a su capacidad para producir en FL (PS/PL). Es decir, que algunas cepas expresan mejor que otras su potencial en FS ya que tienen diferente eficiencia en relación al medio líquido. También se demuestra como se había mencionado en el trabajo de Barrios González y col (1988b), que los tiempos que necesita el microorganismo para alcanzar su producción máxima en FS en general son más cortos que en FL.

Anteriormente se mencionaron los trabajos que indican que las mejores cepas en FL eran las menos eficientes en FS (Antier, 1991; Shankaranand, 1992). Estos resultados se habían obtenido trabajando con enzimas (pectinasas y α -amilasas). Sin embargo los resultados de esta investigación indican que las mejores cepas en FL son también las mejores en FS, aunque se ha visto también que las productividades relativas de las mejores cepas productoras en sólido son bajas.

Con esto se puede afirmar que tal vez el potencial de producción de la cepa (indicado por su producción en FL) es uno de los factores más importantes en el nivel de producción que podrán desarrollar en FS. También parece que las cepas de elevada producción en FL no pueden expresar todo su potencial en FS (esto se observa analizando los valores de productividad relativa).

6.2. EVALUACION DEL DESARROLLO DE LOS CLONES.

Al observar estos resultados se pensó en comprobar el estado de cada cepa, ya que tienen distinto origen y han sido manejadas en distintas condiciones. En general, una cepa es genéticamente heterogénea, a menos que haya sido aislada o purificada recientemente. El grado de heterogeneidad también depende de su manejo y condiciones de mantenimiento. Este fenómeno es particularmente notable en cepas productoras de metabolitos secundarios (Ball, 1980).

Por este motivo se aislaron aproximadamente 35 clones de cada cepa para estudiar las características de poblaciones estrechamente relacionados.

Se probaron los clones derivados de las cepas P-2, AS-P-78, R-8, V-12 y Wisconsin y se observó un mayor rango de producciones y productividades relativas que las que se habían encontrado en el análisis de las cepas. Se encontraron clones que producen 16 veces más en FS que en FL y que presentan más de 29 veces mayor productividad.

Los resultados obtenidos con los experimentos sobre los clones confirman la conclusión mencionada anteriormente: algunas cepas (y clones) expresan mejor que otras su potencial de producción en FS.

Aunque se observó que las cepas de elevada producción en Fermentación Líquida muestran también una elevada producción en Fermentación Sólida, se encontró una tendencia al comportamiento inverso entre los clones de cada cepa.

Sin embargo el mejor clon de cada cepa en FS es el menor productor en FL, y que el mejor clon de cada cepa en FL fué el de menor producción en FS. Estos comentarios son válidos excepto para la cepa AS-P-78, ya que en este caso la relación

6.2. EVALUACION DEL DESARROLLO DE LOS CLONES.

Al observar estos resultados se pensó en comprobar el estado de cada cepa, ya que tienen distinto origen y han sido manejadas en distintas condiciones. En general, una cepa es genéticamente heterogénea, a menos que haya sido aislada o purificada recientemente. El grado de heterogeneidad también depende de su manejo y condiciones de mantenimiento. Este fenómeno es particularmente notable en cepas productoras de metabolitos secundarios (Ball, 1980).

Por este motivo se aislaron aproximadamente 35 clones de cada cepa para estudiar las características de poblaciones estrechamente relacionados.

Se probaron los clones derivados de las cepas P-2, AS-P-78, R-8, V-12 y Wisconsin y se observó un mayor rango de producciones y productividades relativas que las que se habían encontrado en el análisis de las cepas. Se encontraron clones que producen 16 veces más en FS que en FL y que presentan mas de 29 veces mayor productividad.

Los resultados obtenidos con los experimentos sobre los clones confirman la conclusión mencionada anteriormente: algunas cepas (y clones) expresan mejor que otras su potencial de producción en FS.

Aunque se observó que las cepas de elevada producción en Fermentación Líquida muestran también una elevada producción en Fermentación Sólida, se econtró una tendencia al comportamiento inverso entre los clones de cada cepa.

Sin embargo el mejor clon de cada cepa en FS es el menor productor en FL, y que el mejor clon de cada cepa en FL fué el de menor producción en FS. Estos comentarios son válidos excepto para la cepa AS-P-78, ya que en este caso la relación

fué directa. Es interesante hacer notar que esta es también la cepa más heterogénea ya que presenta el rango más amplio en producción relativa.

Una vez más se confirma que los clones de mayor producción en FL no son tan eficientes en FS y viceversa. Posiblemente los dos comportamientos inversos que se observan (entre clones y entre cepas) se puedan explicar debido a las grandes diferencias que hay en los potenciales de producción entre las distintas cepas, las cuales pueden enmascarar la tendencia inversa que se observa entre clones. Es decir, que las diferencias de producción entre cepas son tan grandes que las mejores en FL resultan ser las mejores en FS. Sin embargo, al realizar la prueba entre clones de una misma cepa se encuentran niveles de producción muy similares, por lo tanto es posible observar esa tendencia inversa.

Como se mencionó, la cepa AS-P-78 es la cepa más heterogénea y muestra una relación directa entre el diámetro del halo de inhibición y las fermentaciones sólida y líquida. Este hecho puede estar apoyando la hipótesis mencionada en el párrafo anterior.

6.3. COMPARACION ENTRE CLONES Y CEPAS.

Los comentarios anteriores se refieren al análisis de los clones de cada cepa por separado. Si se consideran a todos los clones en conjunto se observa que 4 de los 5 clones con mejores productividades relativas provienen de la cepa de más baja producción (Wisconsin 54-1255). Esto puede estar indicándonos que las cepas más cercanas a la cepa silvestre se adaptan mejor al sistema de FS y por lo tanto se desarrollan mejor (tomando en cuenta su potencial de producción). Sin embargo, también se puede ver que los clones más productivos en FS son el clon 20 (AS-P-78), 4 (P-2), 6 (Wisconsin) y 9 (P-2). En otras palabras, la mayoría provienen de cepas de alta producción en FL.

El comentario anterior complementa y confirma lo que ya se había dicho: que las cepas de mayor producción adaptadas para medio líquido no pueden expresar su potencial completamente en el sistema de FS, mientras que las cepas que se encuentran menos especializadas para la producción en FL (las más cercanas a la cepa silvestre) son las que mejor expresan su potencial en FS.

Esto probablemente se deba a que las cepas de baja producción aún mantienen ciertos genes o características que han perdido las cepas desarrolladas para FL y que les permiten ser mejores para crecer y producir en FS, que es el sistema que se parece más a su habitat natural.

A pesar de ello, los clones que mejor produjeron en FS se derivan de las cepas de elevada producción en líquido, lo cual sostiene la hipótesis de que el potencial de producción de la cepa es un factor determinante en el nivel de producción que se pueda obtener en FS.

6.4. OBTENCION DE CEPAS ESPECIALES PARA FERMENTACION SOLIDA.

Es interesante notar que varios de los clones de elevada producción, que ya pueden ser considerados como especialistas para Fermentación Sólida, fueron aislados mediante procedimientos convencionales. Es decir, simplemente se realizó el aislamiento de colonias y se utilizó para su selección el método de cilindros de agar descrito anteriormente (Barrios González y col, 1990b). Estos procedimientos permitieron elevar la producción hasta 500 y 600 %. Esto significa que un procedimiento eficaz para el aislamiento de cepas especializadas para FS es el aislamiento y la selección de clones a partir de cepas de elevada producción en FL.

Seguramente se podrá desarrollar una metodología más eficiente al conocer mejor las características distintivas de las cepas con elevada eficiencia reactiva.

6.5. CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS A LA ELEVADA PRODUCCION.

En cuanto a las características evaluadas en los clones prototipo (de alto y bajo) rendimiento, se puede mencionar que, en cuanto a las cinéticas de pH no hay un perfil establecido, sino que los clones que provienen de la misma cepa presentan el mismo comportamiento, por lo que se puede decir que el perfil de la cinética de pH es una característica intrínseca de cada cepa.

La humedad en todas las fermentaciones sigue un mismo patrón, independientemente del clon. Se hizo una comparación de las curvas de humedad obtenidas para los seis clones prototipo y se encontró que no hay diferencia significativa entre ellas a un $\alpha=0.05$. Esto significa que las seis curvas tienen prácticamente el mismo origen y la misma velocidad de aumento de humedad. Por lo tanto la humedad no es una característica distintiva de cada uno de los clones.

La producción de biomasa es distinta para cada clon prototipo. En general, los clones de elevada productividad producen mayor cantidad de biomasa en relación a los prototipos de baja productividad respectivos. Los clones prototipo de la cepa P-2, a pesar de que el inicio de su producción es tardado, produce gran cantidad de biomasa desde el inicio de la fermentación.

En cuanto a la respiración, los clones prototipo de las cepas AS-P-78 y P-2 coinciden en que los de elevada producción finalizan una fase de rápido aumento en la velocidad de consumo de O_2 antes que los clones de baja eficiencia. Sin embargo, los clones prototipo de la cepa Wisconsin parecen comportarse a la inversa. Lo anterior puede estar indicando que una característica importante en el nivel de producción que se logre es la velocidad de consumo de O_2 .

La evaluación de la resistencia a la presión osmótica revela que los clones prototipo de la cepa Wisconsin son los más resistentes a la presión osmótica elevada, y que el clon 20 (mayor productor) de la cepa AS-P-78 es más resistente que el clon 19 (menor productor) de la misma cepa. Esto puede estar indicando que una característica importante para el buen desempeño de las cepas en FS sea su resistencia a la presión osmótica, lo cual es de esperarse, ya que en este tipo de fermentaciones se manejan valores de A_w de 0.96 aproximadamente, lo cual origina presiones osmóticas elevadas.

Probablemente esta última característica sea la más importante para el diseño de la metodología de selección de cepas especiales para Fermentación Sólida.

7. CONCLUSIONES .

1. Las distintas cepas de *Penicillium chrysogenum* tienen distinta capacidad (o potencial) para producir penicilina en Fermentación Sólida en relación a la que presentan en Fermentación Líquida. Esto es, algunas cepas expresan mejor que otras su potencial de producción (indicado por su producción en líquido).
2. El método de selección de cepas sobreproductoras de penicilina G por medio del método de cilindros de agar, es efectivo para localizar mutantes sobreproductoras especiales para medio sólido. Sin embargo, la diferencia tan grande mostrada por algunos clones para producir en Fermentación Sólida parece no ser detectada por este método. Es decir, el método de cilindros de agar para la selección de cepas sobreproductoras no es capaz de detectar una o varias características que permiten al hongo una elevada producción en Fermentación Sólida.
3. El potencial de producción de una cepa es un factor importante en la cantidad de penicilina que se puede producir en Fermentación Sólida.
4. Las cepas menos desarrolladas para Fermentación Líquida presentan una mayor productividad relativa al medio sólido.
5. Las cepas de mayor producción (desarrolladas para Fermentación Líquida), tienen una tendencia a no expresar todo su potencial de producción en Fermentación Sólida. Sin embargo, ciertos clones

derivados de ellos aún mantienen o han recuperado ciertas características que les permiten desarrollarse bien en Fermentación Sólida.

6. Se aislaron cepas de *Penicillium chrysogenum* específicamente adaptadas a la Fermentación en medio Sólido.
7. Se determinó que la resistencia a presión osmótica es una característica importante que se deberá tomar en cuenta para el diseño de una metodología para la selección de cepas adaptadas al medio Sólido.

8. N O M E N C L A T U R A .

AAA	Acido α -aminoadípico.
ACV	L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina.
AFA	Acido fenilacético.
AFEP	Alimentos fermentados enriquecidos en proteínas.
6-APA	Acido 6-amino penicilánico.
ATCC	American Type Culture Colection.
CFS	Medio complejo de Fermentación Sólida para las cepas P-2, R-8, V-12 y Wisconsin.
CFS-A	Medio complejo de Fermentación Sólida para la cepa AS-P-78.
CI	Medio complejo de inóculo para las cepas P-2, R-8, V-12 y Wisconsin.
CI-A	Medio complejo de inóculo para la cepa AS-P-78.
CoA	Coenzima A
CP	Medio complejo de producción para las cepas P-2, R-8, V-12 y Wisconsin.
CP-A	Medio complejo de producción para la cepa AS-P-78.
CSL	Agua de cocimiento de maíz.
DNS	Acido 2-4 dinitrosalicílico.
DO	Densidad óptica.
FS	Fermentación sólida.
FL	Fermentación líquida.
gbfs	Gramos de bagacillo fermentado seco.
ME	Medio de esporulación para <i>Bacillus subtilis</i> .
mM	Milimolar
NRRL	North Regional Research Laboratories.

ps/pl	Producción relativa.
PS/PL	Productividad relativa.
rpm	Revoluciones por minuto
TSA	Agar de soya y tripticaseína.
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Aidoo, K.E., Hendry, R. y Wood, B.J.B. (1982). SOLID SUBSTRATE FERMENTATIONS. *Adv. Appl. Microbiol.* 28: 201-212.
- Antier, P., Raimbault, M., Viniegra, G. y Minjares, A. (1991). OBTENCION DE MUTANTES HIPERPRODUCTORAS DE HIDROLASAS EN FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO: IMPORTANCIA DE LA A_w . IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 8-12 de septiembre. Mérida, Yucatán, México. GBM17C.
- Arima, K. y Uozumi, T. (1967) A NEW METHOD FOR ESTIMATION OF THE MYCELIAL WEIGHT IN KOJI. *Agr. Biol. Chem.* 31 (1): 119-123.
- Arnstein, H.R.V. y Morris, D. (1960). STRUCTURE OF A PEPTIDE CONTAINING α -AMINOADIPIC ACID, CYSTINE AND VALINE, PRESENT IN THE MYCELIUM OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *Biochem. J.* Londres. 76: 357-361.
- Bajracharya, K. y Mudgett, R.E. (1980). EFFECTS OF CONTROLLED GAS ENVIRONMENTS IN SOLID-SUBSTRATE FERMENTATIONS OF RICE. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 2219-2235.
- Ball, C. (1980). GENETIC MODIFICATION OF FILAMENTOUS FUNGI. En: J.E. Smith, B. Kristiansen y D.E. Berry (Editores) FUNGAL BIOTECHNOLOGY. *Academic Press*. New York. pp 42.
- Barrios González, J., Tomasini, A. y Raimbault, M. (1986). VI CONGRESO NACIONAL DE INGENIERIA BIOQUIMICA. 27-30 de abril. México, D.F.
- Barrios González, J. Viniegra, G., Gutiérrez, M., Roussos, S. y Raimbault, M. (1988a). CERTIFICADO DE INVENCION No. 17184 en trámite, México.

- Barrios González, J., Tomasini, A., Viniegra González, G. y López, L. (1988b). PENICILLIN PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION. *Biotechnology Letters*. 10 (11): 793-798.
- Barrios González, J., Tomasini, A., Viniegra González, G. y López, L. (1989). PENICILLIN PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION. En: M. Raimbault (Editor) SOLID STATE FERMENTATION IN BIOCONVERSION OF AGRO-INDUSTRIAL RAW MATERIALS. ORSTOM, Montpellier, Francia. pp 39-51.
- Barrios González, J., Rodríguez, G.M. y Tomasini, A. (1990a). ENVIRONMENTAL AND NUTRITIONAL FACTORS CONTROLLING AFLATOXIN PRODUCTION IN CASSAVA SOLID STATE FERMENTATION. *J. Ferment. Bioeng.* 70 (5): 329-333.
- Barrios González, J., Montenegro, E. y Martín, J.F. (1990b) PENICILLIN PRODUCTION BY MUTANTS RESISTANT TO PAA. *Abstr. Genetics of Industrial Microorganisms (GIM 90)*. Estrasburgo, Francia. pp 39-51.
- Beuchat, L.R. (1983). INFLUENCE OF WATER ACTIVITY ON GROWTH, METABOLIC ACTIVITIES AND SURVIVAL OF YEASTS AND MOLDS. *J. Food. Prot.*, 46: 135-141.
- Casida, L.E. Jr. (1968). INDUSTRIAL MICROBIOLOGY. *John Wiley and Sons, Inc.* pp. 223-247.
- Demain, A.L. (1983). BIOSYNTHESIS OF β -LACTAM ANTIBIOTICS. En: A.L. Demain y N.A. Solomon (Editores), ANTIBIOTIC CONTAINING THE β -LACTAM STRUCTURE. *Springer-Verlag*, Berlín. pp. 189-228.
- Drew, S.W. y Demain, A.L. (1975). PRODUCTION OF CEPHALOSPORIN BY SINGLE AND DOUBLE SULFUR AUXOTROPHIC MUTANTS OF *CEPHALOSPORIUM ACREMONIUM*. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 8: 5-10.
- Drew, S.W. y Demain, A.L. (1977). EFFECT OF PRIMARY METABOLITES ON SECONDARY METABOLISM. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 343-356.

- Elander, Richard P. (1979). MUTATIONS AFFECTING ANTIBIOTIC SYNTHESIS IN FUNGI PRODUCING β -LACTAM ANTIBIOTICS. En: Seb. K & Laskins, Al, (Editores) GENETICS OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS, American Soc. of Microb. Washington, D.C. pp. 21-35.
- Favela Torres, E. (1989). PRODUCCION DE ENZIMAS A PARTIR DE LA PULPA DE CAFE Y SU APLICACION EN EL BENEFICIO HUMEDO. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. Jalapa, Veracruz, 12 al 15 de abril. pp.145-151.
- Fleming, A. (1929). ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE AISLATION OF B. INFLUENZAE. Brit. J. Ezp. Pathol. 10: 226-236.
- Gordee, E.Z. y Day, L.E. (1972). EFFECT OF EXOGENOUS PENICILLIN ON PENICILLIN BIOSYNTHESIS. Antimicrob. Ag. Chemoter. 1: 315-321.
- Hernández, E. y Mendoza, Ma. D. (1976) PRODUCCION DE ACIDO GIBERELICO POR GIBBERELLA FUJIKUROI EN SUSTRATOS QUE CONTIENEN PULPA DE ACEITUNA, ACEITE DE OLIVA O SUBPRODUCTOS DE LA EXTRACCION DE ESTE ULTIMO. A.T.A. 16 (3): 357-366.
- Herrick, H.T. y May, O.E. (1928) PRODUCTION OF GLUCONIC ACID BY PENICILLIUM LUTEUM-PURPURENUMGROUP II, SOME OPTIMAL CONDITIONS FOR ACID FORMATION. J. Biol. Chem. 77: 185-195.
- Hesseltine, C.W. (1972) BIOTECHNOLOGY REPORT. SOLID STATE FERMENTATIONS. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. John Wiley & Sons, Inc. 14: 517-532.
- Hesseltine, C.W. (1965). A MILLENIUM OF FUNGI, FOOD AND FERMENTATION. Mycologia. 57: 149-197.

- Hesseltine, C.W. (1977). SOLID STATE FERMENTATION. *Process Biochem.*, 12: 8,9,24-27,29-32.
- Hoe-Kim, J., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H. y Ryu, D.D.Y. (1985) CELLULASE PRODUCTION BY A SOLID STATE CULTURE SYSTEM. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 1445-1450.
- Huerta, S., Gutiérrez, M., López, R., Massucco, A.E. y Viniegra, G. (1986) CARACTERIZACION TECNICA DE UN FERMENTADOR DINAMICO PARA SUSTRATOS SOLIDOS EN PLANTA PILOTO. *Revista de la Academia Nacional de Ingeniería, México.* 5: 46-53.
- Karant, N.G. y Lonsane, B.K. (1988) LABORATORY AND PILOT SCALE PRODUCTION OF ENZYMES AND BIOCHEMICALS BY SOLID STATE FERMENTATION AT C.F.T.R.I., MYSORE. En: M. Raimbault (Editor). SOLID STATE FERMENTATION IN BIOCONVERSION OF AGROINDUSTRIAL RAW MATERIALS. *ORSTOM, Montpellier, Francia.* pp. 113-120.
- Kavanagh, F. (1989). THEORY AND PRACTICE OF MICROBIOLOGICAL ASSAYING FOR ANTIBIOTICS. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1): 6-10.
- Kitpreechavanich, V., Hayashy, M. y Nagal, S. (1984). PRODUCTION OF XYLAN-DEGRADING ENZYMES BY THERMOPHILIC FUNGI, *ASPERGILLUS FUMIGATUS* AND *HUMICOLA LANUGINOSA*. *J. Ferment. Technol.* 62 (1): 63-69.
- Kumard, P.K.R. y Lonsane, B.K. (1987). GIBBERELIC ACID BY SOLID STATE FERMENTATION: CONSISTENT AND IMPROVED YIELDS. *Biotechnol. Letters.* 9: 179-182.
- Lara, F., Mateos, R.C., Vazquez, G. y Sánchez, S. (1982). INDUCTION OF PENICILLIN BIOSYNTHESIS BY L-GLUTAMATE IN *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 105 (1): 172-178.

- Lehninger, Albert L. (1982). PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY. *Worth Publishers, INC.* pp. 444, 615-643.
- Leveau, J.Y. y Bouix, M. (1985). CINETICAS MICROBIANAS. En: R. Scriban (Editor) BIOTECNOLOGIA. *El Manual Moderno.* México, D.F. pp. 669.
- Lindenfelser, L.A. y Ciegler, A. (1975) SOLID SUBSTRATE FERMENTATION FOR OCHRATOXIN A PRODUCTION. *Appl. Microbiol.* 30: 30-35.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1980). INHIBITION AND REPRESSION OF HOMOCITRATE SYNTHASA BY LYSINE IN *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *J. Bacteriol.* 144 (3): 869-876.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López Nieto, M.J., Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1989). REGULATION OF HOMOCITRATE SYNTHETASE BY LYSINE IN RELATION TO PENICILLIN G BIOSYNTHESIS. En: C. Vézina y K. Singh (Editores) ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY. Vol III. *Pergamon Press.* Canadá. pp. 161-165.
- Martín, J.F. y Demain, A.L. (1980). CONTROL OF ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS. *Microbiol. Rev.* 44 (2): 230-251.
- Martín, J.F. (1981). BIOSYNTHESIS OF METABOLIC PRODUCTS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITIES: β -LACTAM ANTIBIOTICS. En: K.P. Schaal y G. Pulverer (Editores) ACTINOMYCETES. *Gustav Fishes Verlag GmbH and Co., K.G. Stuttgart, Rep. Federal Alemana.* pp. 417-434.
- Martín, J.F., Lopez-Nieto, J.M., Castro, J.M., Cortés, J., Romero, J., Ramos, F.R., Cantoral, J.M., Alvarez, E., Domínguez, M.G., Barredo, J.L. y Liras, P. (1986). ENZYMES INVOLVED IN β -LACTAM BIOSYNTHESIS CONTROLLED BY CARBON AND NITROGEN REGULATION. En: H. Kleinkauf, H. Dohren, H. Dornauer y G. Nesezman (Editores) REGULATION

OF SECONDARY METABOLITE FORMATION. *Weinheim: VCH Verlag.*
pp. 41-75.

- Miller, G.L. (1959) USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGARS. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Moo-Young, M., Moreira, A.R., Tengerdy, R.P. (1983). PRINCIPLES OF SOLID-SUBSTRATE FERMENTATION. En: D.E. Smith, P.R. Berry and B. Kristiansen (Editores) THE FILAMENTOUS FUNGI. Vol IV: FUNGAL TECHNOLOGY. M. Arnold, Londres, Inglaterra.
- Mudget, R.E. (1986). SOLID STATE FERMENTATIONS. En: A.L. Demain y N.A. Solomon (Editores) MANUAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. *American Society for Microbiology.* Washington, D.C. pp. 66.
- Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T., Pichangkura, S., Ueda, R., Taguchi, H. (1982). GROWHT AND ENZYME PRODUCTION IN A SOLID STATE CULTURE OF *ASPERGILLUS ORYZAE*. *J. Ferment. Technol.* 69 (4): 311-319.
- Nishio, N., Kurisu, H. y Nagai, S. (1981) THERMOPHILIC CELLULASE PRODUCTION BY *TALAROMYCES* SP. IN SOLID STATE CULTIVATION. *J. Ferment. Technol.* 59 (5): 407-410.
- Oriol, E. (1987). CROISSANCE DE *ASPERGILLUS NIGER* SUR MILIEU SOLIDE. IMPORTANCE DE L'EAU ET DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU. Tesis de doctorado. INSA Toulouse, France. pp. 1-115.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra González, G. y Raimbault, M. (1988a) SOLID-STATE CULTUTE OF *ASPERGILLUS NIGER* ON SUPPORT. *J. Ferment. Technol.* 66 (1): 57-62.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S. y Viniegra González, G. (1988b). WATER AND WATER ACTIVITY IN THE SOLID STATE FERMENTATION CASSAVA STARCH BY *ASPERGILLUS NIGER*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 498-503.

- Pandey, A. (1992) RECENT PROCESS DEVELOPMENTS IN SOLID-STATE FERMENTATION. *Process Biochem.* 27: 109-117.
- Queener, S. y Swartz, R. (1979). PENICILLINS: BIOSYNTHETIC AND SEMISYNTHETIC. En: A.H. Rose. ECONOMIC MICROBIOLOGY. SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. *Academic Press.* 3: 35-122.
- Queener, S.W. y Neuss, N. (1982). THE BIOSYNTHESIS OF β -LACTAM ANTIBIOTICS. En: R.B. Morin y M. Morgan (Editores) THE CHEMISTRY AND BIOLOGY OF β -LACTAM ANTIBIOTICS. *Academic Press, Inc., New York.* pp. 1-81.
- Raimbault, M. y Alazard, D. (1980) CULTURE METHOD TO STUDY FUNGAL GROWTH IN SOLID FERMENTATION. *European J. Appl. Microbiol.* 9: 199-209.
- Raimbault, M. (1981). FERMENTATION EN MILEU SOLIDE CROISSANCE DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX SUR SUBSTRAT AMYLACÉ. Tesis de Doctorado. U.P.S. Toulouse. 291 pp.
- Raimbault, M., Rehva, S., Piña, F. y Villalobos, P. (1985). PROTEIN ENRICHMENT OF CASSAVA BY SOLID SUBSTRATE FERMENTATION USING MOLDS ISLOATED FROM TRADITIONAL FOODS. *J. Ferment. Technol.*, 63 (4): 395-399.
- Rao, M.N.A., Mithal, B.M., Thakkur, R.N. y Sastry, K.S.M. (1983) SOLID STATE FERMENTATION FOR CELLULASE PRODUCTION BY *PESTALIOTOPSIS VERSICOLOR*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 869-872.
- Revilla, G. López Nieto M.J., Luengo, J.M. y Martín, J.F. (1984). CARBON CATABOLITE REPRESSION OF PENICILLIN BIOSYNTHESIS BY *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *J. Antibiot.* 37: 27-35.
- Revilla, G. López Nieto M.J., Ramos, F.R., Alvarez, E. y Martín, J.F. (1986). GLUCOSE REPRESSES FORMATION OF $-(1-\alpha\text{-AMINOADIPYL})\text{-L-CYSTEINYL-D-VALINE}$ AND ISO-

PENICILLIN N SYNTHASE BUT NOT PENICILLIN ACYLTRANSFERASE
IN *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *J. Bacteriol.* 168: 947-952.

Rivera-Muñoz, G., Tinoco-Valencia, J.R., Sánchez, S. y Farres,
A. (1991) PRODUCTION OF MICROBIAL LIPASES IN A SOLID
STATE FERMENTATION SYSTEM. *Biotechnol. Letters.* 13 (4):
277-280.

Roussos, S. (1985) CROISSANCE DE *TRICHODERMA HARZIANUM* PAR
FERMENTATION EN MIEU SOLIDE: PHYSIOLOGIE, SPORULATION
ET PRODUCTION DE CELLULASES. These d'Etat. Université
d'Aix. Marseille I. 161 pp.

Sánchez, S., Paniagua, L., Mateos, R.C., Lara, F. y Mora, J.
(1980). NITROGEN REGULATION OF PENICILLIN G BIOSYNTHESIS
IN *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. En: C. Vézina y K. Singh
(Editores) ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY. Vol III. Pergamon
Press. Canadá. pp. 147-154.

Shankaranand, V.S., Ramesh, M.V. y Lonsane, B.K. (1992).
IDIOSYNCRASIES OF SOLID-STATE FERMENTATION SYSTEMS IN THE
BIOSYNTHESIS OF METABOLITES BY SOME BACTERIAL AND FUNGAL
CULTURES. *Process Biochemistry.* 27: 33-36.

Smith, J.E. y Berry, D.E. (1974). DIFFERENTIATION SECONDARY
METABOLISM AND INDUSTRIAL MYCOLOGY. AN INTRODUCTION TO
BIOCHEMISTRY OF FUNGAL DEVELOPMENTS. *Academic Press.* Gran
Bretaña.

Somerson, N.L., Demain, A.L. y Nunheimer, T.D. (1961).
REVERSAL OF LYSINE INHIBITION OF PENICILLIN PRODUCTION BY
-AMINOADIPIC ACID. *Arch. Biochem.* 93: 238-241.

Streinkraus, K.E. (1983). HANDBOOK OF INDIGENOUS FERMENTED
FOODS. Microbiology Series. Vol. 9. *Marcel Dekker Inc.*
New York.

Takamine, J. (1917). ENZYMES OF *A.ORYZAE* AND THE APPLICATION
OF ITS AMYLOCLASTIC ENZYME TO THE FERMENTATION INDUSTRY.
Ind. Eng. Chem. 6: 824-828.

- Toyama, N. (1976). FEASIBILITY OF SUGAR PRODUCTION FROM AGRICULTURAL AND URBAN CELLULOSIC WASTES WITH *TRICHODERMA VIRIDE* CELLULASE. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6: 207-214.
- Trejo, M.R. (1986) PRODUCCION DE ENZIMAS CECTICAS POR FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO. Tesis Profesional. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vilela, L.C., Torillo, R., De Ocampo, A.T y Del Rosario, E.J. (1977) CELLULASE PRODUCTION IN SEMI-SOLID CULTURES OF *TRICHODERMA VIRIDE*. *Agric. Biol. Chem.* 41 (2): 235-238.
- Viniegra-González, G. (1989). PERSPECTIVES AND LIMITATIONS OF SOLID FERMENTATION IN MEXICO. En: M. Raimbault (Editor). SOLID STATE FERMENTATION IN BIOCONVERSION OF AGROINDUSTRIAL RAW MATERIALS. *ORSTOM*, Montpellier, Francia. pp. 67-72.
- Wang, D., Cooney. Ch.L., Demain, A.L., Dunnill, T. y Humphrey, A.E. (1979). FERMENTATION AND ENZYME TECHNOLOGY. *John Willey & Sons*. New York. pp. 26-36.
- Ziffer, J. y Shelef, G. (1988) WHEAT BRAN CULTURE PROCESS FOR FUNGAL AMYLACE AND PENICILLIN PRODUCTION. En: M. Raimbault (Editor). SOLID STATE FERMENTATION IN BIOCONVERSION OF AGROINDUSTRIAL RAW MATERIALS. *ORSTOM*, Montpellier, Francia. pp. 121-128.