



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

"EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA PRODUCCION DE PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA".

T E S I S

Que para obtener el Titulo de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

HILDA GONZALEZ MADRID

Directores de Tesis:
JAVIER BARRIOS GONZALEZ
ARMANDO MEJIA ALVAREZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Pág.
1.-TITULO.	1
2.-INTRODUCCION.	1
2.1. ANTIBIOTICOS.	1
2.2.METABOLISMO	2
2.2.1.CINETICA DE CRECIMIENTO	2
2.2.2. METABOLISMO PRIMARIO	4
2.2.3. METABOLISMO SECUNDARIO	5
2.2.3.1. AGRUPACION SEGUN SU SINTESIS.	6
2.3.-PENICILINA.	
2.3.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.	7
2.3.2. PENICILINA G	8
2.3.3. BIOSINTESIS.	12
2.3.4. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA.....	16
2.4. PRODUCCION DE PENICILINA POR FERMENTACION LIQUIDA....	19
2.5. FERMENTACION SOLIDA.	20
2.6. PRODUCCION DE PENICILINA POR FERMENTACION SOLIDA.....	23
3.- FUNDAMENTO.	27
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
5.- OBJETIVOS.	
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
6.- HIPOTESIS.	30
7.- MATERIAL Y METODOS.	31
8.- RESULTADOS.	46
9.- DISCUSION.	60
10.-CONCLUSIONES.	68
11.-BIBLIOGRAFIA.	70

1.-TITULO

"EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA PRODUCCION DE PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA"

2.-INTRODUCCION:

2.1 -ANTIBIOTICOS.

El termino "antibiótico" fue empleado inicialmente por *Selman A. Waksman* en 1942 (*Rose, A.H., 1979*), definiéndolo como "un componente químico, producido por un microorganismo, que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento y eventualmente, destruir a bacterias y otros microorganismos en soluciones diluidas", pero debe incluirse en está definición a los antibióticos producidos químicamente. Es claro que por sus propiedades, los antibióticos pueden tener funciones terapéuticas y hasta de investigación, como es el caso del uso de penicilinas en forma experimental en la formación de protoplastos. La penicilina fue el primer antibiótico producido industrialmente durante la segunda guerra mundial. Su interés económico deriva de la utilización médica para luchar contra las enfermedades infecciosas.

Se trata de sustancias específicas, que no tienen una distribución generalizada entre los microorganismos y que no se producen sino por un limitado número de especies. El género *Streptomyces* agrupa a una gran parte de los microorganismos productores de antibióticos. Se distinguen varios tipos de antibióticos según sea su estructura química. Sus síntesis son diferentes. Algunos ejemplos de antibióticos son: penicilinas, que son de gran importancia por su función terapéutica y de

investigación, tenemos también antibióticos polipeptídicos, antibióticos aminogluco-sídicos, antibióticos macrolídicos y tetraciclinas.

Hay numerosos antibióticos de estructura variada que no se pueden colocar en los grupos precedentes, de los cuales, los más importantes son: Cloramfenicol, Griseofulvina, Novobiocina, Puromicina, Mitomicina, Actinomicina, y Cicloserina. Se propone que la producción de antibióticos posterior a la etapa de crecimiento es favorable ya que en esta fase el microorganismo productor ya no es sensible a su antibiótico, el cual es activo para otras especies (Martín & Demain, 1980). Dhar y Khan (1971) proponen que esto puede deberse a una destoxificación del antibiótico por una peptidización sobre las estructuras heterocíclicas.

2.2.-METABOLISMO.

2.2.1.-CINETICA DE CRECIMIENTO DE UN HONGO.

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 aumentando progresivamente debido a una autólisis bajo la acción de enzimas de las células mismas (Smith y Berry, 1974; Leveau y Bouix, 1985).

La reproducción de 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).

2.2.2.-METABOLISMO PRIMARIO.

Dentro del metabolismo de los microorganismos se da una gran diversidad de rutas biosintéticas, útiles para su crecimiento, sostenimiento y reproducción; aunque existen metabolitos cuya utilidad directa en el microorganismo productor se desconocen. En general se pueden hablar de dos tipos de procesos de biosíntesis: el primario y el secundario. Esta distinción entre metabolismo se maneja inicialmente por los fisiólogos de plantas y su punto de vista se puede generalizar a los microorganismos (Bu'lock, 1965). El metabolismo primario incluye una serie interrelacionada de reacciones anabólicas, catabólicas y anfibólicas, mediadas por enzimas, que proveen intermediarios biosintéticos y energía, así mismo convierten los precursores biosintéticos en moléculas esenciales como el DNA, RNA, proteínas, lípidos y polisacáridos. Este metabolismo está finamente balanceado y sus intermediarios normalmente no se acumulan (Martín & Demain, 1980);

Los metabolitos primarios incluyen productos finales de bajo peso molecular que son usados como otro bloque de estructuras para macromoléculas esenciales o son convertidas en coenzimas. Los intermediarios en la biosíntesis de estos productos finales son también considerados como metabolitos primarios. Los más importantes son los aminoácidos, los nucleótidos de purinas y pirimidinas y las vitaminas. Otros metabolitos primarios incluyen los intermediarios de la ruta mayor del metabolismo intermediario, tal como la ruta de

Embden-Meyerhof, la ruta de la pentosa fosfatasa, y el ciclo del ácido tricarbóxico. Con esta interpretación, los ácidos orgánicos, tal como el ácido cítrico y fumárico son considerados a ser metabolitos primarios. La sobreproducción de metabolitos primarios es evitada por microorganismos, si es un proceso destructivo que disminuye la supervivencia en la naturaleza. Sin embargo, el mismo organismo maneja con error su supervivencia en sus mecanismos regulatorios, y está sobreproducción, se da en cultivos seleccionados diseñados para aislar el potencial de cultivo de fermentación. Estos cultivos son sometidos a desarrollos intensivos, en los cuales, el ambiente y las modificaciones genéticas son usadas para disminuir la regulación e incrementar la sobreproducción. (Wang, D., et al, 1979).

2.2.3.-METABOLISMO SECUNDARIO.

Se les llama metabolitos secundarios a ciertos compuestos producidos por algunas cepas de ciertas especies. Estos no parecen ser esenciales para su crecimiento y su producción no está asociada con la fase de crecimiento. El papel de estos compuestos en el metabolismo celular no se conoce. Aún cuando un microbio posea la información genética para producir uno o más metabolitos secundarios, la expresión de esa información es regulada por una variedad de factores ambientales, algunos o todos destinados a retardar la velocidad de crecimiento. En cuanto a la función de estos compuestos en el metabolismo, la hipótesis más aceptada es que los microbios que entran en la

fase estacionaria de crecimiento y son incapaces de cerrar la producción de intermediarios de bajo peso molecular requeridos durante la fase de crecimiento para la síntesis de los constituyentes celulares, convierten esos precursores en compuestos inocuos (metabolitos secundarios) que no reprimen la síntesis de compuestos de bajo peso molecular. La ventaja para el microorganismo es que evita el problema metabólico que sería la acumulación de grandes cantidades de compuesto de bajo peso molecular, y al mismo tiempo permitir que el proceso biosintético permanezca operativo en un período de estrés metabólico (Rose, A. H., 1979).

2.2.3.1.- AGRUPACION SEGUN SU SINTESIS.

A pesar de la enorme amplitud de estructuras químicas encontradas en los metabolitos secundarios, la mayor parte de estos compuestos pueden ser agrupados en cuatro clases basados en su origen biosintético. Esto refleja el pequeño número de grupos en los que uno puede clasificar los compuestos de bajo peso molecular que son precursores de los constituyentes celulares, es decir nucleótidos, aminoácidos, azúcares, acetyl-CoA (y compuestos relacionados incluyendo los intermediarios del ciclo de Krebs) y terpenos. También indican que los metabolitos secundarios individuales, generalmente, provienen de intermediarios de bajo peso molecular y se caracterizan por tener una estructura química relativamente complicada y por tener, muchos de ellos, actividad biológica, por lo que tienen una gran importancia económica. Como ejemplo se pueden mencionar los antibióticos, estimulantes del

crecimiento vegetal, antitumorales, inmunodepresores, coccidiostáticos, colorantes, tóxicas, y antihelminéticos (Rose, A.H. 1979).

2.2.3.2.-TROFOFASE E IDIOFASE.

Los metabolitos secundarios son producidos durante la fase estacionaria de crecimiento. En 1961, Bu'Lock, utiliza los terminos trofofase e idiofase para describir la fase de crecimiento rápido (no limitado) y la fase de producción, respectivamente, el crecimiento en la fase no limitada es muy rápida (M_{max}) y la producción es practicamente cero.

En la idiofase, el crecimiento se hace desbalanceado (o se limita) por la falta de uno o mas nutrientes, por lo que la velocidad de crecimiento se vuelve muy baja y la producción muy alta (Bu'Lock 1961).

Se tiene en los ultimos años un gran avance en el estudio de los mecanismos que regulan la síntesis de estos compuestos y se han encontrado mecanismos parecidos a los que regulan el metabolismo primario. Por ejemplo la síntesis de penicilina es regulada por represión catabólica, es decir la producción se detiene cuando hay una concentración de glucosa relativamente alta en el medio (Wang, D, et al, 1979).

2.3.-PENICILINA.

2.3.1.ANTECEDENTES HISTORICOS.

Desde el siglo pasado es conocida la existencia de compuestos de origen microbiano, capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. No fue hasta el año de

1929 en que Alexander Fleming descubrió la actividad terapéutica de la penicilina producida por el hongo *Penicillium notatum*, cuando se marcó el inicio de una nueva era en la medicina clínica para el control de enfermedades infecciosas y para la industria de las fermentaciones por su producción a gran escala (Fleming., 1929). Al igual que otros metabolitos secundarios, la penicilina no presenta ninguna función aparente en los microorganismos que la producen. Posee propiedades bactericidas sobre gérmenes Gram positivos y en cierto grado sobre Gram negativos.

Sin embargo, desde 1881, Tyndall descubrió que los hongos del género *Penicillium* limpiaban las soluciones turbias por el desarrollo bacteriano y a partir de 1890 se usaron extractos bacterianos y de hongos para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas; los resultados no fueron reproducibles ni la naturaleza de los productos terapéuticos fue controlada.

2.3.2.-PENICILINA G

La penicilina es producida por los hongos *Penicillium notatum* y *P.chrysogenum*, cuyos rendimientos han aumentado desde 4 unidades internacionales (1 Unidad = 0.6 µg/ml) de medio de cultivo en 1940 hasta 50,000 U/ml.

Su naturaleza química puede variar según la disponibilidad de precursores en el medio de cultivo o en las condiciones naturales de su crecimiento. Se conocen varias penicilinas naturales que se describen con letras: F, G, K, O, V y X (Kumate, 1989). De estas, las que cuentan con actividad

terapéutica son la penicilina G (bencílica) y la V (fenoximetílica). Su actividad bactericida, es debida a que bloquea la unión entre los aminoácidos D-alanina y L-alanina del péptido glucano de la pared celular, lo que provoca una estructura sensible a los cambios osmóticos.

Diversos microorganismos presentan una resistencia natural a la acción de la penicilina, dicha resistencia resulta de la síntesis de β -lactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico.

Hasta 1945 se determinó la estructura química de la penicilina y se demostró por estudios cristalográficos que está compuesta de 2 anillo uno tiazolidínico y otro β -lactámico, que constituyen un nucleo central denominado ácido 6-amino-penicilánico (6-APA). Fig.1

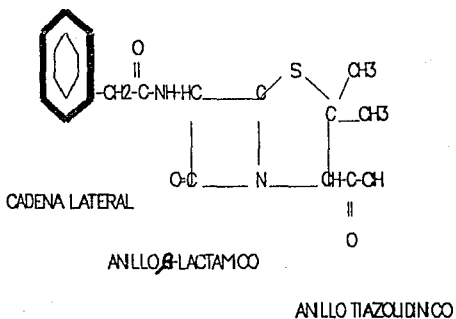
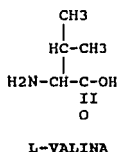
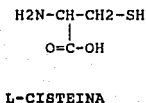


Fig.1. Estructura básica de la penicilina (penicilina G)

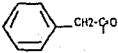
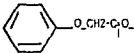
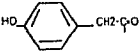
Posteriormente Abraham en Inglaterra y Adriaens en Bélgica esclarecieron la secuencia de síntesis de la penicilina en *P.chrysogenum* y demostraron la condensación de L-cisteína y D-valina que da lugar a los anillo mencionados.



La penicilina posee además una cadena lateral acíclica, unida al núcleo de 6-APA y de cuyas características depende la penicilina resultante. Diversos ácidos pueden servir como precursores de la cadena lateral, de la cual va a depender la actividad biológica del antibiótico y su sensibilidad a la acción de β -lactamasas.

Tal es el caso de la alfa-carboxibencil penicilina (carbenicilina) compuesto que además de ser insensible a la acción de esta enzima ofrece una mejor absorción oral.

DIVERSOS EJEMPLOS DE PENICILINAS NATURALES.

PENICILINA	RADICAL (R)
Bencil (G)	
2-Pentenil (F)	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-C(=O)-}$
n-Heptil (k)	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-C(=O)-}$
Fenoxiacetil (V)	
p-Hidroxibencil (X)	

La manufactura general de las penicilinas naturales terapéuticamente significativas se pueden observar en la figura 2.

Penicilinas biosintéticas:

Cepa de hongo
+
Nutrientes

fermentación y recuperación
recuperación
y purificación

Penicilina
G o V

Fig.2. Esquema de la manufactura de penicilinas naturales terapéuticamente activas. (Rose, 1979)

Penicillium chrysogenum puede proveer muchos otros tipos de penicilinas distintas a la G o V dependiendo del ácido tricarbóxico adicionado al medio de cultivo, así como de las condiciones de fermentación o, en su caso de un tratamiento genético adecuado.

2.3.3.-BIOSINTESIS.

La biosíntesis de penicilina G ha sido ampliamente estudiada, y se señala como origen de la ruta a la reacción entre la Acetil CoA y el alfa-cetoglutarato, generando la formación, después de varios pasos intermediarios, del alfa-aminoadipato. En este paso se presentan dos rutas opcionales al proceso, una enfocada a la producción de penicilina y otra que genera el aminoácido lisina.

El primer paso en la biosíntesis de la penicilina es el catalizado por la enzima ϵ (L-alfa-aminoadipil) L-cisteína sintetasa, que lleva a cabo la unión de alfa-aminoadípico con aminoácido L-cisteína, para formar el primer intermediario de la vía (Lara, et al., 1982). Este intermediario se condensa con el aminoácido L-valina, para dar origen al tripéptido alfa-aminoadipil-cistenil-valina (fig.3).

La formación intracelular de este compuesto fue reportada por Arnstein hacia 1960. Más tarde fué obtenido de un extracto libre de células de *P. chrysogenum* a partir de sus aminoácidos precursores (Baner, 1970). Así mismo Adriaens et al., encontraron que el tripéptido se encuentra estructurado como L-alfa-amino adipil-L-cisteinil-D-valina, arreglo molecular

que coincide con el descrito para el mismo intermediario en la síntesis del antibiótico cefalosporina en *Cephalosporium acremonium* (Loder and Abraham 1974). A la fecha no está definido si el aminoácido valina se incorpora en su forma *D*, o bien lo hace como *L*-valina que después es isomerizada.

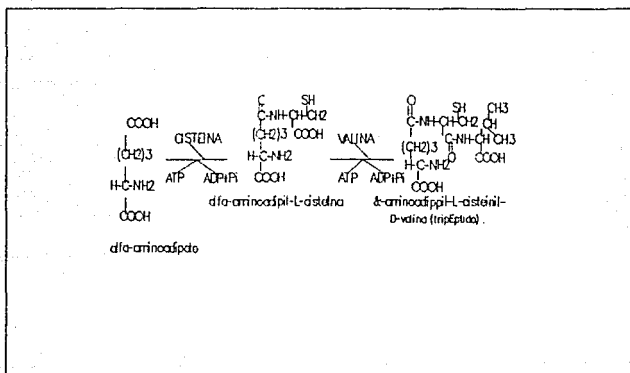


Fig.3 Estructura química de los precursores e intermediarios en la formación del tripéptido *alfa*-aminoácil-L-cisteinil-D-valina.

Los eventos finales en la biosíntesis del antibiótico implican la formación de los anillos β -lactámico y tiazolidínico. Sin embargo la permeabilidad del hongo a los diversos precursores de la vía, así como la inestabilidad de los mismos a las condiciones de estudio, retardaron por algún tiempo la definición de los pasos que componen la ruta biosintética del antibiótico. El uso de lisados de

protoplastos capaces de formar el antibiótico *in vitro* (Abraham, 1974) ha permitido establecer recientemente, que el tripéptido es convertido en isopenicilina N a través de un intermediario β -lactámico monocíclico (Meesschaert, et al., 1980). La isopenicilina N ^{*} es un compuesto inestable con actividad antibiótica que posee alfa-aminoadípico en su cadena lateral. Dicho intermediario debido a la acción de una acil-transferasa (Loder and Abraham, 1974), intercambia el alfa-aminoadipato en su cadena lateral por ácido fenilacético y da origen a la penicilina G o bencil-penicilina, producto final de la vía. (Fig.4).

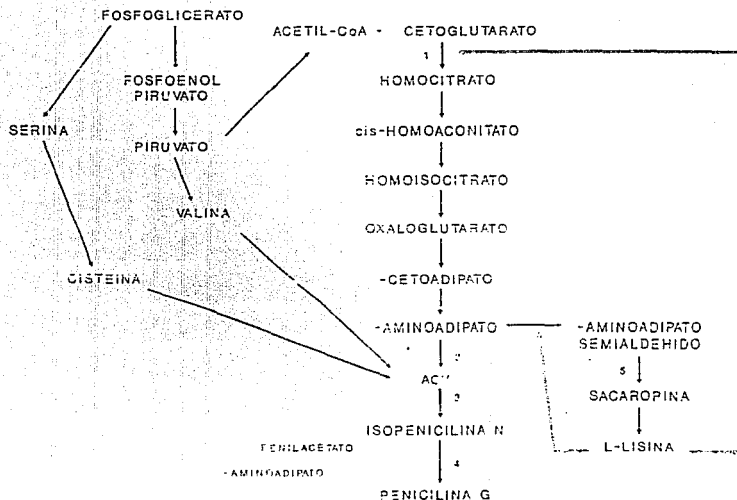


Fig 04. Ruta biosintética de la penicilina y su relación con el metabolismo primario
 1) Homocitrato sintetasa. 2) ACV sintetasa. 3) Isopenicilina N sintetasa. 4) Penicilina aciltransferasa. 5) Sacaropina deshidrogenasa.

2.3.4.-REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA.

Una de las características de la producción de este antibiótico es su aparición en la fase tardía del crecimiento microbiano (idiofase). Es evidente la relación que existe entre la formación del antibiótico y el consumo y concentración de las fuentes de nitrógeno y de carbono del medio de cultivo.

a).-REGULACION POR LA FUENTE DE CARBONO.

La formación de penicilina por el hongo *P.chrysogenum* es reprimida por glucosa. El porcentaje de represión depende de la concentración de este carbohidrato en el medio de cultivo. Análogos no metabolizables de glucosa carecen de este efecto, sugiriendo que un producto del catabolismo de este azúcar, más que la glucosa misma, pudiera ser el responsable de esta acción. Las bases moleculares de dicho efecto aún no han sido establecidas, sin embargo, ha sido reportado que la represión no es revertida por AMP cíclico (Revilla, et al., 1980).

Otras fuentes de carbono como sacarosa, fructosa, y galactosa, afectan negativamente la formación del antibiótico en un grado similar al ejercido por glucosa. Polímeros de glucosa tales como el almidón, inhiben sólo parcialmente la síntesis del metabolito secundario, mientras que los carbohidratos lactosa y rhamnosa, carecen de efecto (Revilla, et al., 1980).

b).-REGULACION POR LA FUENTE DE NITROGENO.

La penicilina puede ser concebida como un antibiótico peptídico, en función de que en su síntesis intervienen los

aminoácidos L-alfa-aminoadipato, L-cisteína y L-valina. Bajo estas consideraciones, es predecible que tanto su formación como regulación, estén sujetas a cualquier evento de control que influya en la formación de sus aminoácidos precursores. (Sánchez et al, 1980).

Hunter y Segel (1971), reportaron que micelio de *P. chrysogenum*, acumulaban elevadas concentraciones de L-glutamato, y además se ha encontrado que la poza se incrementa al final de la trotofase.

Recientemente se ha reportado que el glutamato estimula la síntesis del antibiótico en el micelio del hongo que ha sido cosechado durante la idiofase y resuspendido en un medio mínimo. (Sánchez et al., 1980).

Las bases bioquímicas de esta acción han sido establecidas al demostrar que el glutamato induce la α -(L-alfa-aminoadipil) L-cisteína sintetasa, primera enzima de la vía que sintetiza penicilina (Lara, et al., 1982).

Otras fuentes de nitrógeno tales como el amonio, también influyen en la formación de penicilina. Dicho ión afecta negativamente la formación del metabolito secundario y su acción es proporcional a la concentración que guarda en el medio de cultivo.

En resumen, se puede considerar que el incremento en la concentración intracelular de glutamato, al final del crecimiento logarítmico de *P. chrysogenum*, induce la síntesis de penicilina e incrementa la poza de glutamina; la que a su vez podría donar los grupos alfa-amino de los aminoácidos

precursores de la molécula de penicilina y de esta forma iniciar su síntesis. Bajo estas consideraciones, es posible predecir que cualquier mecanismo que afecte directa o indirectamente la formación de glutamina, aún cuando la poza de glutamato se encuentre elevada, repercutirá negativamente en la síntesis del antibiótico.

c).-RETROREGULACION DE LA BIOSINTESIS

La biosíntesis de penicilina puede ser controlada por 2 mecanismos retroregulatorios. Por un lado existen reportes de que la adición del antibiótico en cualquier fase de la fermentación, previene la acumulación posterior de penicilina sin afectar el crecimiento microbiano (*Cooper and Meister, 1977*). Mutantes de alta producción, requieren proporcionalmente mayor concentración de penicilina para retroinhibir su propias biosíntesis (*Gordee and Day, 1972*).

El efecto regulatorio que ejerce penicilina puede ser también observado con el uso de análogos de la misma (*Martín, et al., 1979*). Por otra parte la síntesis del antibiótico también puede ser regulada por la adición del aminoácido *L*-lisina. En 1957, *Demain* reportó la capacidad de *L*-lisina para inhibir la síntesis de penicilina. Mas tarde se descubrió que dicho efecto podía ser revertido mediante la adición de alfa-aminoadipato, compuesto que además estimulaba la formación del antibiótico (*Somerson, et al., 1961*). La lisina inhibe la formación del alfa-aminoadipato a través de retroinhibir la homocitrato sintetasa, primera enzima involucrada en la formación de lisina (*Demain and Masurekar, 1974*).

Adicionalmente, se ha observado que mutantes resistentes a la inhibición ejercida por los análogos de lisina presentan una mayor capacidad para sintetizar el antibiótico (Masurekar and Demain, 1974). Tal característica representa una base para el diseño de estrategias tendientes al mejoramiento genético de la producción de penicilina (Sánchez, et al., 1980).

2.4.- PRODUCCION DE PENICILINA POR FERMENTACION LIQUIDA.

La producción convencional de penicilina se lleva a cabo por fermentación en cultivo líquido. Se utilizan fermentadores con capacidad de 40,000 a 200,000 litros. El proceso es aeróbico, pasando aire por el cultivo, utilizando agitadores para aumentar la superficie de contacto entre el aire y el medio de cultivo además de homogeneizar el medio. La temperatura se maneja en un rango de $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y un pH de 6.8 a 7.4. 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 inócula 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. (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.

Para recuperar la penicilina del medio inicialmente se filtra el cultivo para eliminar el micelio y otros sólidos. 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 pasa a una extracción con un solvente orgánico, como acetato de amilo, acetato de butilo o metil isobutil cetona.

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 éstas se producen las penicilinas semisintéticas. Primero se produce el 6-APA y posteriormente se añaden los diferentes grupos funcionales (Queener y Swartz, 1979).

2.5.-FERMENTACION SOLIDA.

La fermentación sólida es un método de cultivo microbiano que se ha empleado en la antigüedad y ha sido revalorizado y modernizado en los últimos años para producir proteínas y

enzimas (Aidoo et al., 1982). El sistema de fermentación en estado sólido puede definirse como aquellos en que el crecimiento microbiano y la formación de productos ocurren en la superficie de sustratos sólidos. Entre estas fermentaciones se incluyen procesos microbianos tales como: composteo, crecimiento en suelo, cultivo superficial, cultivo de hongos comestibles, etc., originándose productos de interés farmacéutico, alimenticio, y químico. En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, varias micotoxinas han sido producidas en altas concentraciones por fermentación sólida (FS) en granos y otros productos agrícolas (Hesseltine, 1972). Recientemente, se reportó un proceso de fermentación sólida para producir ácido giberélico (Kumar & Lonsane, 1987a), y los mismos investigadores desarrollaron mejoras al cultivo llevándolo a lote alimentado (Kumar & Lonsane, 1987b) para alargar la fase de producción.

En 1980 Raimbault y Alazard desarrollaron un método para estudiar el crecimiento de hongos filamentosos en FS, que permitió un control relativamente alto sobre las condiciones de cultivo. El investigador francés que desarrollo está técnica (M.Raimbault) realizó una larga estancia en el departamento de Biotecnología de la UAM-I colaborando en el desarrollo de la tecnología para el enriquecimiento proteico de la yuca por fermentación sólida (Raimbault et al., 1985). Los estudios básicos han permitido desarrollar procesos de fermentación sólida para producir: celulosas (Roussos, 1985), pectinasas (Trejo, 1985) y aflatoxinas (Barrios-González et

al., 1988), (Barrios-González et al., 1990). Algunos de estos procesos han sido escalados hasta 30 kg en reactores con diferentes configuración (Huerta et al., 1986).

Las fermentaciones en estado sólido se distinguen del cultivo sumergido por el hecho de que el crecimiento microbiano, y formación de productos, ocurren en la superficie del material sólido con bajo contenido de humedad. Los sustratos tradicionalmente empleados en el estado sólido incluyen una gran variedad de productos agrícolas, siendo muchas veces residuos de esta actividad productiva. Entre tales sustratos podemos mencionar el bagazo y bagacillo de caña, la harina de soya, la yuca, la cáscara de arroz, salvado de trigo, etc.

El sustrato sólido otorga un medio favorable a gran número de hongos filamentosos y algunas bacterias, que crecen en forma miceliar. Los sustratos sólidos naturales pueden otorgar al microorganismo fuente de carbono u otros nutrientes. Un desarrollo de micelio en sustratos sólidos puede fomentar que el metabolismo primario y secundario ocurran simultáneamente en diferentes partes del micelio. Puede utilizarse un inóculo de esporas, pues la baja humedad disminuye los riesgos de contaminación. La aereación está facilitada por espacios interpartícula, mientras que es posible la extracción inmediata del producto.

Nuevos sistemas de fermentación sólida, particularmente el uso de soportes inertes impregnados con medios de cultivo

líquidos ha sido patentado (Barrios-González et al; 1988a) y caracterizado por Oriol et al; (1988a) adaptándose exitosamente para la producción de penicilina (Barrios-González, et al; 1990). Muchas aplicaciones de la fermentación sólida presentan ventajas sobre la tecnología convencional.

2.6.-PRODUCCION DE PENICILINA POR FERMENTACION SOLIDA.

Aun y cuando la penicilina puede ser sintetizada por diversas especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, desde el punto de vista comercial, ha sido el hongo *Penicillium chrysogenum* el microorganismo que mas ha destacado en la producción fermentativa de este antibiótico.

La fermentación sólida se ha aplicado recientemente para la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos del tipo B-lactamas, como lo es el estudio de fermentación en estado sólido para producción de cefalosporina por *Streptomyces clavuligerus* y *Cephalosporium acremonium* (Jermini & Demain, 1989) donde mantuvieron el proceso de fermentación por 10 días en salvado de trigo, obteniendo aproximadamente una producción de 900 µg de cefalosporina/g de sustrato. Antes se realizaron investigaciones para la producción de penicilina en fermentación sólida, usando soportes inertes impregnados con medios de cultivo líquido. Este sistema ha sido patentado (Barrios-González et al., 1988a) y caracterizado por (Oriol et al., 1988a). El sistema fue adaptado exitosamente para la producción de penicilina por

Barrios-González y colaboradores (1988b).

Este estudio demostró que era posible producir un antibiótico por (FS) y que, debido a las ventajas ecológicas que la (FS) otorga a los hongos, no era necesario mantener condiciones de esterilidad. Además el sistema permite utilizar medios de cultivo desarrollados para fermentaciones líquidas y el producto y otros componentes del medio pueden ser recuperados por expresión, de manera que se hace posible establecer comparaciones muy precisas entre la fermentación líquida (FL) y la fermentación sólida (FS).

La técnica se consideró prometedora, desde el punto de vista aplicado, por obtenerse una producción varias veces mayor que al utilizar el método convencional en medio líquido, encontrándose que (en las condiciones empleadas) la producción de penicilina de (FS) era 17 veces más alta y obtenida en la tercera parte del tiempo. También se observó un rendimiento siete veces mayor y una productividad volumétrica 8.5 veces superior. En este trabajo, *Penicillium chrysogenum* presentó un comportamiento diferente en (FS) en relación a lo observado en (FL), pues el uso de medios concentrados mejoró el crecimiento y la producción en (FS), mientras que en (FL) el efecto fué opuesto.

Estas ventajas, junto con los bajos costos de energía del proceso (esterilización, aireación, y agitación) indican que este sistema tiene un importante potencial industrial. Lo anterior concuerda con las conclusiones de otros investigadores de que la fisiología en medio sólido puede ser

muy diferente a la que presenta un microorganismo en medio líquido. Incluso, se ha demostrado que enzimas producidas en (FS) tienen características cinéticas (K_m , V_{max}) y fisicoquímicas (T, pH) diferentes a las producidas por el mismo organismo en (FL) (Alazard & Raimbault, 1981; Acuña-Arguelles, 1991). También se ha encontrado que la síntesis de algunas enzimas como amilasas y pectinasas está subreguladas en (FS) (Oriol, et al; 1988a). Por lo que es necesario hacer más estudios básicos para desarrollar procesos más eficientes. Por otro lado, tanto el medio de cultivo como la cepa usados en ese estudio son los utilizados en estudios básicos, por lo que la producción alcanzada no es la necesaria para un proceso industrial.

En fermentación sólida no se conoce exactamente el efecto de los mecanismos de regulación ya conocidos en cultivo líquido (inhibición, represión, etc.), siendo factible el que otros factores controlen de manera más importante la síntesis de penicilina en medio sólido.

En el cultivo sólido se desconocen los sucesos que ocasionen el cese del crecimiento y, por ende, de la producción del metabolito. Un factor importante puede ser que el agua consumida, determine una limitante en la producción de penicilina, pudiendo deberse a que la poca agua libre restante no sea suficiente para los procesos de difusión o incluso convertirse en el sustrato limitante si se produce un incremento significativo de biomasa.

En fermentación sólida la transferencia o el transporte de nutrientes presenta dificultades especiales, de modo que limitaciones parciales o totales pueden ser causadas por otros mecanismos como: falta de un gradiente de concentración adecuada, falta de agua libre, tamaño de partícula del soporte, e incluso la longitud del micelio (se rompe al mover el cultivo) afectando al metabolismo secundario.

3.-FUNDAMENTO

En la actualidad la fermentación sólida, ha tenido muy buenos resultados para la producción de penicilina con el hongo *P. chrysogenum*, y presenta grandes expectativas para el futuro. (Barrios, et al., 1988a). El sistema de fermentación sólida requiere del uso de soportes inertes impregnados con medios de cultivo líquidos. Este sistema ha sido patentado (Barrios-González et al; 1988a) y caracterizado por Oriol et al (1988a).

Una de las principales ventajas en la fermentación sólida, con respecto al medio líquido es la producción, en el cual se incrementa hasta 17 veces, sólo se requieren condiciones asépticas y no estériles, así mismo se requiere menos tiempo de fermentación.

Estas ventajas, junto con los bajos costos de energía del proceso (esterilización, aireación y agitación) indican que este sistema tiene un importante potencial industrial.

La investigación sobre la fisiología y diseño de reactores, hará posible tener en un futuro un proceso comercial de producción de penicilina por fermentación sólida.

4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los factores ambientales tienen un efecto sobre la producción, el cual sería ventajoso conocer. La fisiología puede ser diferente y se conoce muy poco en medio sólido. El conocer más aparte de tener importancia en ciencia básica, puede ser aplicado a explotar el potencial del sistema.

El sistema de fermentación sólida empleado hace uso de bagacillo de caña como soporte, el cual es impregnado con medio de cultivo. Resulta lógico suponer que las características del soporte, influyen en el desarrollo del microorganismo en este sistema.

El diferente tamaño de partícula ofrece distinta área superficial por unidad de volúmen, por lo que si el hongo crece encima del sustrato, rodeará la partícula en donde los nutrientes difundirán del centro a la superficie de las partículas, generando gradientes distintos.

La mayor densidad de empaque hace uso más eficiente del espacio vacío entre las partículas, pero con la concomitante reducción del área de intercambio gaseoso con la atmósfera circundante. Por otro lado si se escala el proceso habrá configuraciones de reactores, que por el tamaño generen un empaque mayor.

Mezclado y adiciones. Desde el punto de vista básico, si se mezcla el cultivo se romperá el micelio, y generará fragmentos cortos en estados fisiológicos parecidos. Se podrían entonces hacer adiciones para experimentos más sofisticados en fisiología y desarrollo de procesos, en donde se pueda adicionar agua, nutrientes o agentes para control de pH.

5.- OBJETIVOS

5.1.-OBJETIVO GENERAL.

Determinar los efectos de algunos factores ambientales, sobre la producción de penicilina en fermentación sólida.

5.2.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.1.-Montar métodos de análisis necesarios para seguir el perfil de la fermentación, como son: pH, % de humedad, contenido de azúcares, cuenta de esporas, biomasa y cuantificación de penicilina.

5.2.2.-Determinar el efecto del tamaño de partícula del soporte sobre la producción de penicilina y otros parámetros de la fermentación.

5.2.3.-Establecer el efecto de la densidad de empaque sobre la producción de penicilina y otros parámetros de la fermentación.

5.2.4.-Determinar si el mezclado provoca algún efecto sobre la producción de penicilina y otros parámetros de la fermentación.

6.- HIPOTESIS

6.1.-El metabolismo secundario se lleva a cabo después de la fase de crecimiento y es iniciado por una limitación del crecimiento por la falta de uno o más nutrientes. En medio líquido se diseña el medio de cultivo para que haya una limitación del nutriente clave.

En fermentación sólida la transferencia o el transporte de nutrientes presenta dificultades especiales, de modo que limitaciones parciales o totales pueden ser causadas por otros mecanismos como: falta de un gradiente de concentración adecuado, falta de agua libre, tamaño de partícula del soporte, densidad de empaque, e incluso longitud del micelio (se rompe al mover el cultivo), afectando el metabolismo secundario.

7.-MATERIAL Y METODOS.

7.1.-MICROORGANISMOS:

Se utilizó *Penicillium chrysogenum*: Wisconsin ATCC 54-1255. Esta cepa fue conservada en congelación a -20°C y -80°C en glicerol al 20 %, y liofilizada.

Para la realización de los bioensayos de penicilina se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

7.2.-MEDIOS DE CULTIVO.

MEDIO COMPLEJO DE PRODUCCION SOMERSON PARA FERMENTACION SOLIDA. (Somerson et al; 1961)

Lactosa	110	g/l
Glucosa	14	g/l
CaCO_3	20	g/l
KH_2PO_4	6	g/l
MgSO_4	14	g/l
Sólidos de maceración de maíz	70	g/l
Fenilacético al 7.4 mM	6.5	g/l
Agua	1000.0	ml
pH	6.5	

MEDIO DE ESPORULACION PARA B. subtilis.CALDO NUTRITIVO.

Pectona	80.0 g/l
Extracto de carne	3.0 g/l
MnCl ₂	10 ⁻⁵ M
pH	7.2
Agua destilada	1000.0 ml.

MEDIO COMPLEJO DE PRODUCCION SOMERSON PARA FERMENTACION
LIQUIDA. (Somerson et al;1961)

Lactosa	55 g/l
CaCO ₃	10 g/l
Sólidos de maceración de maíz	35 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g/l
KH ₂ PO ₄	7 g/l
Aceite de maíz	2.5 g/l
Fenilacético al 20%	12.5 g/l
Agua	1000.0 ml
pH	6.8

MEDIO POWER (PARA ESPORULACION DE *Penicillium chrysogenum*)

Sacarosa	15	g/l
Lactosa	15	g/l
NaNO ₃	1	g/l
K ₂ HPO ₃	0.25	g/l
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.0005	g/l
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.0015	g/l
KH ₂ PO ₄	0.03	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.275	g/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005	g/l
Bactopeptona	2.5	g/l
Líquidos de maceración de maíz	0.25	g/l
NaCl	2.0	g/l
Agar	30.0	g/l
Agua destilada	1000.0	ml.

7.3.-MANEJO DE LA CEPA WISCONSIN ATCC(54-1255).

7.3.1.-REHIDRATACION DE LA CEPA LIOFILIZADA.

Se abrió la ampoyeta, que contiene la cepa liofilizada, mediante calentamiento (choque térmico), y con ayuda de una lima estéril.

Se le adicionó 1.0 ml de agua destilada estéril, agitando la suspensión tratando de resuspender el tapón. Se dejó reposar durante 30 minutos.

Se inocularón en medio POWER, para propagar su crecimiento, y por separado se siembran en agar nutritivo y caldo nutritivo para realizar la prueba de contaminación.

Una vez crecida la cepa en el medio POWER, se procedió a cosechar las esporas resuspendiendo en agua estéril con Tween 80 al 0.2%, con ayuda de una barra magnética.

Se colocaron de 1.0 a 1.2 ml de suspensión de esporas en los eppendorf, con una concentración de 1×10^6 . Esta suspensión contiene el 50 % de glicerol, que previamente es preparado al 40% .

Una vez realizado éste paso se guardaron en congelación a -20°C y -80°C .

7.3.2.-ESPORULACION.

Se procedió a descongelar un eppendorf, y se inoculó el matraz. Generalmente se utilizaron 0.4 ml de suspensión para cada 40 ml de agar (medio Power). Se esparció la solución por toda la superficie del agar y se incubó a 25°C hasta que se desarrolló la esporulación (aproximadamente de 4-5 días) para el caso de la cepa Wisconsin.

7.3.3.-OBTENCION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS.

Las esporas se obtuvieron de matraces con medio POWER incubados el tiempo necesario para obtener la esporas del microorganismo. Estas esporas se suspendieron en agua estéril con Tween 80 al 0.2% con ayuda de una barra magnética. Para los experimentos de fermentación sólida, se utilizó un tamaño de inóculo de 2×10^6 esporas/ml de medio.

7.4.-CALCULOS PARA MONTAR UNA FERMENTACION SOLIDA.

Se cálculo la cantidad de nutrientes, sólidos y líquidos presentes en el medio de fermentación para obtener una humedad final de 70 %.

Se sometió el bagazo a un pretratamiento, el cual consiste en mantenerlo a flujo de vapor en autoclave durante 30 minutos y posteriormente esterilizarlo a 121°C/15 minutos. El bagazo contiene el 50 % de toda el agua del sistema.

El medio de cultivo se esterilizó a 121°C/15 minutos. Se le ajustó el pH a 6.5 antes de esterilizarlo.

Se mezcló el medio de cultivo con la suspensión de esporas y se le adicionó al bagazo.

Una vez mezclado perfectamente, se procedió a llenar las columnas de fermentación con la mezcla.

Se mantuvo una aircación de 0.2 l/h/g de bagazo húmedo y una temperatura de 25 °C.

El sistema de incubación se muestra en la Fig.1.

Posteriormente los muestreos se realizarón a las 24, 30, 48, 54, 72 y 96 horas; y a cada muestra se le determinó: pH, % de humedad, concentración de esporas, azúcares reductores por el método de DNS, biomasa por el método de Ninhidrina, y extracción de penicilina para realizar su cuantificación mediante bioensayo.

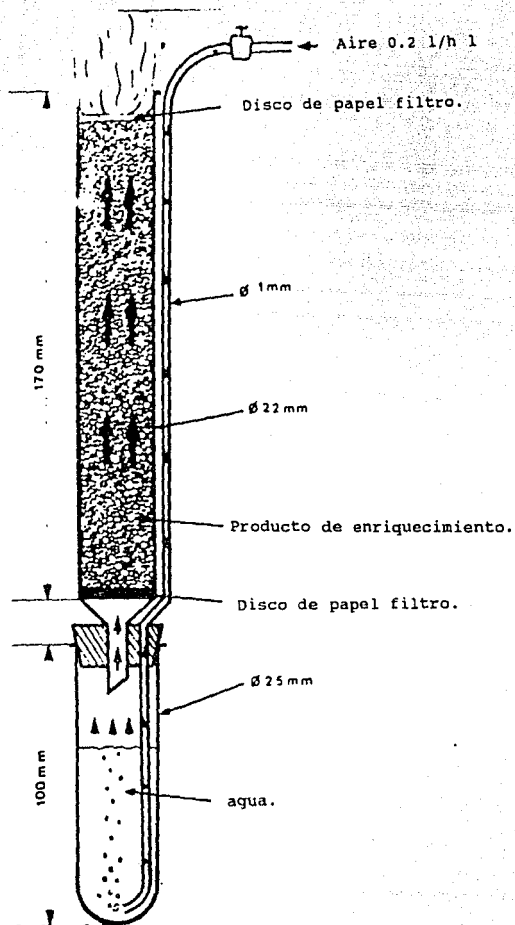


Fig. 1 Microfermentador en columna

7.5.-ANALISIS DE MUESTRAS FERMENTADAS.

7.5.1.-DETERMINACION DE pH

Se midió el pH, pesando 1.0g de bagazo fermentado + 9ml de agua destilada.

Se agitó la mezcla durante 10 minutos.

Se midió el pH con un potenciómetro.

7.5.2.-DETERMINACION % DE HUMEDAD.

Se determinó por gravimetría en 5 g de bagazo húmedo.

7.5.3.-DETERMINACION DE CONCENTRACION DE ESPORAS.

De las muestras obtenidas para la determinación de pH se tomó una pequeña alícuota, y se determinó la concentración de esporas con una cámara de Newbauer.

7.5.4.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DE DNS.

(Acido Dinitrosalicílico) o método de Miller (1959)

FUNDAMENTO.- En presencia de calor, el ác. 3-5 dinitrosalicílico es reducido a ác.3-amino-5nitrosalicílico por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un color amarillo-café que se lee a 575nm.

METODO:

A) Preparación del reactivo de "DNS" para azúcares reductores.

<u>Reactivos:</u>	<u>gramos/l.</u>
Ac.3-5 dinitrosalicílico (DNS)	7.5 g/l
NaOH	14.0 g/l
Tartrato de sodio y potasio	216.0 g/l
Fenol	5.6 g/l
Metabisulfito de sodio	5.9 g/l

SOLUCION ESTANDAR: 1g de glucosa en 1000 ml de agua destilada.

B) PREPARACION DE LA CURVA PATRON:

TUBO	SOL.ESTANDAR(ml)	AGUA DESTILADA(ml)	(mg azúcar/l)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	200.0
2	0.4	0.6	400.0
3	0.6	0.4	600.0
4	0.8	0.2	800.0
5	1.0	0.0	1000.0

C) REACCION

De las muestras obtenidas se determinó el contenido de azúcares reductores por el método de DNS.

Se adicionó 1ml de reactivo de DNS a los tubos de las muestras y de la curva estándar.

Se calentó a baño de ebullición durante 5 minutos.

Se enfrió en baño de hielo.

Se adicionaron 8 ml de agua destilada a cada tubo.

Se agitó en Vortex.

Se leyó a 575 nm, en el espectrofotómetro.

Se interpolaron las lecturas en la curva patrón para encontrar las concentraciones de micelio seco/g de bagazo fermentado.

7.5.5.

DETERMINACION DE BIOMASA (AMINOACIDOS) POR EL METODO DE NINHIDRINA.

FUNDAMENTO: Está basado en la reacción de un grupo alfa-amino con dos moléculas de ninhidrina, un agente oxidante fuerte que efectúa la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos. El amononiaco y la hidrantina así formados, reaccionan con una segunda molécula de ninhidrina, dando la formación de un compuesto coloreado, que puede ser cuantificado.

METODO:

a) REACTIVOS.

A) Preparación de Buffer de Citratos: 0.2 M a pH=5.

a) 2.101g de ácido cítrico en 50 ml de agua destilada.

b) 2.941g de citrato de sodio en 50 ml de agua destilada.

Medir 20.5 ml de (a) y 29.5 ml de (b). Aforar a 100 mls.

Se ajustó el pH a 5 con NaOH al 10 %

B) Se pesó 0.8g de SnCl_2 y se adicionaron 500 ml de buffer de citratos. (solución A).

C) Se disolvieron en 500 ml de metilselolve (etilenglicol monometil eter) en 10g de ninhidrina (manteniendo en la oscuridad).

D) Se mezcló B y C en una relación 1:1 al momento de utilizarse.

E) Se preparó n-propanol al 50 % .

b) CURVA PATRON.

	bagazo seco (pretratado y con micelio) (g)	micelio seco (de cultivo líquido) (g)
1)	0.0	0.2
2)	0.4	0.16
3)	0.8	0.12
4)	0.12	0.8
5)	0.16	0.4
6)	0.2	0.1

c) HIDROLISIS.

1) Se colocaron 0.2 g de muestra seca y molida dentro de una ampolleta.

2.) Se agregaron 6 ml de HCl 7N y se selló la ampolleta con soplete (flama azul y naranjado en la punta, poner poco gas y regular el aire).

3) Se calentó a 121 °C (auto clave) durante 15 minutos.

4) Se procedió a abrir la ampolleta, pasando el contenido a un vaso de precipitado y poniendo una barra magnética.

5) Se neutralizó con NaOH al 40% usando el potenciómetro (de 2 a 4 ml, según el tiempo de fermentación).

6) Dejar reposar toda la noche (aproximadamente 20 h).

d) REACCION.

- 7) Se tomó 0.1 ml de muestra agregando 1.9 ml de agua destilada (dilución 1:20).
- 8) Se tomó 0.5 ml de la dilución (0.002 moles de a.a.) y se agregó 2 ml del reactivo D
- 9) Se tomaron 0.5 ml de agua destilada, y se agregaron 2 ml de reactivo D (blanco de reactivos)
- 10) Se agitó y calentó en baño de agua en ebullición durante 20 minutos.
- 11) Se adicionaron 5 ml de la solución E (rápidamente).
- 12) Se mezcló y se dejó reposar 15 minutos.
- 13) Leer a 570 nm contra blanco de reactivos.
- 14) Interpolar la lectura en la curva patrón para encontrar las concentraciones de micelio seco/g de bagazo fermentado.
- 15) Multiplicar la concentración por 20 (dilución del hidrolizado) y por el factor de dilución por reactivos (13 ml. de reactivos más el volumen gastado en la neutralización).

7.5.6.-EXTRACCION DE PENICILINA.

BUFFER DE FOSFATOS

KH_2PO_4 6.4056 g/l

K_2HPO_4 0.2523 g/l

Ajustar a pH 6.0

1.- A 0.5g de bagazo húmedo se le agregaron 3ml de buffer de fosfatos 0.01 M, pH=6 (frío).

2.- Se ajustó el pH entre 5 y 5.5 con HCl diluido y medir la cantidad de ácido agregado para los cálculos de producción.

- 3.- Agitar en Vortex durante 1 minuto.
- 4.- Centrifugar 20 minutos a 1700 rpm (570g).
- 5.- Decantar en jeringas de 5ml con microfiltro Upchurch. Sc. Inc. 0.45 micras. Filtrar.

CUANTIFICACION DE PENICILINA.

PREPARACION DEL *Bacillus subtilis*.

Se sembró *B. subtilis* en agar bacteriológico durante 24 horas a 270 rpm a una temperatura de 30 °C.

Se para su reproducción, y a 5 ml de ese medio se centrifuga a 5000 rpm, el cual se utiliza como blanco.

A otros 5 ml se le utiliza como muestra.

Leer a una absorbancia de 340 nm en el espectrofotómetro.

Es necesario emplear 0.2 ml de suspensión de esporas del *B.subtilis*., que presenten una absorbancia=1.0 por cada 100 ml de medio TSA (1.0%)

PLACAS PARA EL BIOENSAYO: Hacer medio TSA al 1 % (triptose soy broth + 1 % agar) y esterilizarlo. Cuando la temperatura del medio sea alrededor de 40°C, agregar la cantidad necesaria de una suspensión de esporas del microorganismo sensible (*Bacillus subtilis*.), realizando los cálculos necesarios. Mezclar bien y llenar las cajas estériles, que miden 25 cm X 25 cm, con 350 mls cada uno del medio inoculado.

Cuando el medio solidifica, se le hicieron pozos (unos 36) con un sacabocado de 8 mm de diámetro, bajo condiciones estériles.

SOLUCIONES PARA LA CURVA PATRON.

Se pesaron 10 mg de penicilina G y se disolvieron en 10 ml de agua estéril. (Solución A=10 mg/ml, lo cual es igual a 1 $\mu\text{g/ml}$)

A partir de estas soluciones se hicieron 10 ml de cada uno de los siguiente. (Usar tubos estériles).

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Volúmen(ml) de solución:	H ₂ O(ml).
0.1	0.1	B 9.9
0.2	0.2	B 9.8
0.5	0.5	B 9.5
1.0	1.0	B 9.0
2.0	2.0	B 8.0
5.0	5.0	B 5.0
10.0	10.0	B 0.0

LLENADO DE POZOS:

Identificar los pozos con la concentración que van a llevar y llenar cada uno con 60 μl de solución patrón ó muestra de fermentación filtrada.

Incubar 24 hrs, a 30°C.

CUANTIFICACION:

Medir los halos de inhibición formados.

Hacer una curva patrón: el diámetro de los halos en el eje de las (x) contra el logaritmo de la concentración en el eje de las (y), en papel milimétrico.

7.6.-OTROS METODOS.

7.6.1.-Obtención de diferentes tamaños de partícula.

Para la determinación de tamaño de partícula se muele el bagazo de caña de azúcar y se tamiza, pasándolo a través de las mallas No. 10, 30, y 50.

Tamaño de partícula grande (>10)., es el bagazo que se retiene en la malla 10.

Tamaño de partícula mediana (10-30)., es el bagazo que pasa a través de la malla 10 y que se retiene en la malla 30.

Tamaño de partícula chica (30-50)., es el bagazo que pasa a través de la malla 30 y que se retiene en la malla 50.

Una vez obtenido el bagazo tamizado, se procedió a montar las fermentaciones como se menciona en el punto 7.4.

7.6.1.1.-Bagacillo lavado (eliminación de azúcares).

Se tamizó el bagazo de caña con los tres tamaños de partícula antes mencionados.

Se eliminaron los azúcares del bagazo mediante lavados como sigue:

Se colocó 1 gramo de bagazo por cada 40 ml de agua. El lavado se realizó con agitación utilizando un rotor, manteniendo la temperatura a 80°C durante 15 minutos.

Se filtró el agua contenida, y se le realizaron otros tres lavados (4 lavados en total).

Se colocó el bagazo, extendiéndolo en una charola y se puso a peso seco antes de utilizarse para la fermentación.

Una vez obtenido el bagazo lavado y seco, se procedió a montar las fermentaciones como se mencionaron en el punto 7.4.

7.6.2.-DENSIDAD DE EMPAQUE.

Para la determinación de densidad de empaque se utilizó bagazo de caña (30-50), utilizando el que pasa a través de la malla 30 y se retiene en la malla 50.

Se manejaron tres diferentes densidades de empaque, las cuales fueron las siguientes

- a) Densidad 1 (D1)= 0.27 g/ml.
- b) Densidad 2 (D2)= 0.31 g/ml.
- c) Densidad 3 (D3)= 0.35 g/ml.

Se midió la altura de la columna (15 cms) y el diámetro (2.0456 cms), para calcular el volúmen la columna de fermentación, mediante la siguiente fórmula: $v = (\pi) (r^2) (h)$.

Se realizaron los cálculos para cada densidad de empaque.

Una vez obtenidos los cálculos, se procedió a montar las fermentaciones como se mencionó en el punto 7.4.

7.6.3.-MEZCLADO.

Se realizaron los mezclados como sigue:

Se desempacó cada columna en un vaso de precipitado estéril, se mezcló el contenido, homogenizándolo, con ayuda de una espátula durante 2 minutos y se volvió a empacar la columna bajo condiciones estériles cada 24 horas.

Las columnas se colocaron nuevamente en el sistema de fermentación.

7.6.3.1.-MEZCLADO Y ADICIONES.

Se procedió a realizar el mismo proceso como en el efecto al mezclado, pero para esta determinación, previamente se calculó la pérdida de humedad para cada tiempo de muestreo, basándose en el experimento anterior.

Se pesó el vaso de precipitado (se taró) se desempacó la columna, se realizó el mezclado, desmenuzando el bagazo y revolviendo bien. Se pesó el contenido de la columna y sacando el % de humedad perdida en el experimento con mezclado, se repuso el agua con un roceador de agua previamente esterilizado.

Se procedió a empacar el contenido de la columna colocándolo nuevamente en el sistema de fermentación.

8.-RESULTADOS.

8.1. DETERMINACION DE BIOMASA.

Para determinar el crecimiento del hongo en (FS), se montaron y evaluaron los siguientes métodos.

a) Determinación de DNA por el método de Dische.

La técnica funcionó bien para actinomicetos cultivados en medio líquido. Para micelio de hongo cultivado en líquido, fue necesario aumentar la concentración de ácido sulfúrico en la etapa de hidrólisis, para obtener una buena cuantificación. Al utilizar este método para fermentación sólida (bagazo con micelio), se encontró una fuerte interferencia, mostrando gran incongruencia en los resultados, por lo que se decidió eliminar este método como técnica para la evaluación de crecimiento (biomasa) en medio sólido.

b) Determinación de biomasa por peso seco.

Esta técnica funcionó bien, pero se encontró que al realizar varias determinaciones de una misma muestra, hay gran dispersión entre estas, por lo que también se decidió eliminar este método.

c) Determinación de Aminoácidos por el método de Ninhidrina.

Con este método se obtuvo sólo una pequeña coloración del bagazo, por lo que se consideró adecuado para determinar biomasa en fermentación sólida (FS). Para eliminar la interferencia de la coloración que da el bagazo, se le realizó lavados al bagacillo antes de poner la muestra a peso seco.

Para la realización de la curva estándar se utilizó micelio seco de *P.chrysogenum* obtenido por fermentación líquida, mezclándola a diferentes concentraciones, se siguió la técnica de ninhidrina, variando únicamente el momento de la dilución, es decir, después y antes de la reacción colorida.

Los resultados de la dilución después de la reacción colorida mostraron incongruencias en las lecturas de absorbancia, mientras que los resultados de la dilución antes de la reacción fueron satisfactorios por lo que se decidió que es importante diluir la muestra después de la hidrólisis (antes de la reacción colorida). Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la absorbancia de acuerdo a la concentración micelial, como se muestra en la (Fig.1). Bajo estas condiciones, los resultados obtenidos nos indican que la técnica resulta ser buena para la determinación de aminoácidos (biomasa) en fermentación sólida, por lo que se decidió montar esta técnica para la evaluación de biomasa.

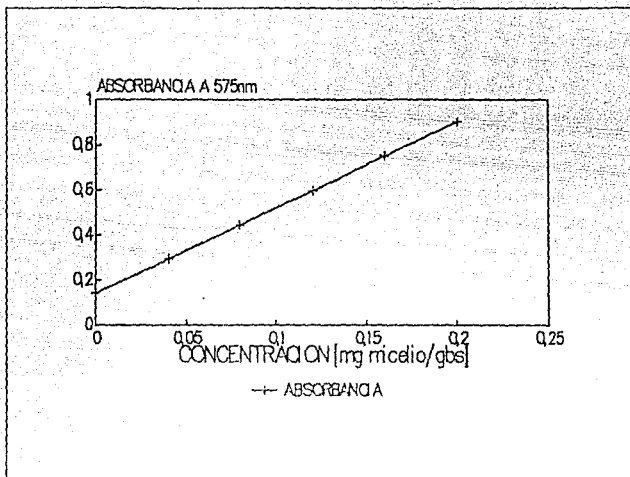


Fig.1. Curva estándar de Ninhidrina con micelio de *P. chrysogenum* y bagazo seco lavado. Dilución 1:20.

8.2. EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE LA FERMENTACION SOLIDA DE PENICILINA.

Para la determinación de tamaño de partícula, se realizaron simultáneamente tres fermentaciones con diferentes tamaños de partícula, las cuales fueron los siguientes:

- a) tamaño de partícula grande (malla >10), en la cual se retienen partículas de bagazo de 14 X 1.7 mm.
- b) tamaño de partícula mediana (malla 10-30), en la cual se retienen partículas de bagazo de 5.9 X 0.85 mm.
- c) tamaño de partícula chica (malla 30-50), en la cual se retienen partículas de bagazo de 3.2 X 0.4 mm.

Se obtuvieron cinéticas de producción de penicilina parecidas excepto, que en el cultivo con tamaño de partícula grande, la producción de penicilina continúa por 6 horas más, alcanzando 1,680 $\mu\text{g/g}$ de medio sólido, es decir aproximadamente 37 % más que en los otros dos cultivos (Fig.2). Se observó un crecimiento más homogéneo en las columnas de malla grande.

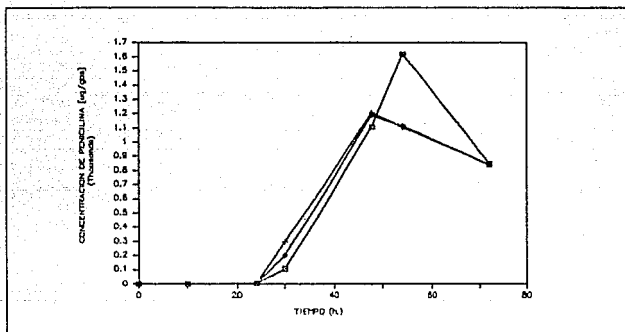


Fig.2. Efecto del tamaño de partícula sobre la producción de penicilina en F.S. por *P.hrysogenum* (Wis. 54-1255), usando diferentes tamaños de partícula: 14 mm (-■-), 5.9 mm (-+-), y 3.2 mm (-◆-).

El pH y las cinéticas de crecimiento fueron similares en todos los casos, así también como la concentración de biomasa final. Una importante diferencia fué observada en la cinética de concentración de azúcares reductores (Fig. 3), la cual mostró mayor concentración inicial en la fermentación con tamaño de partícula grande.

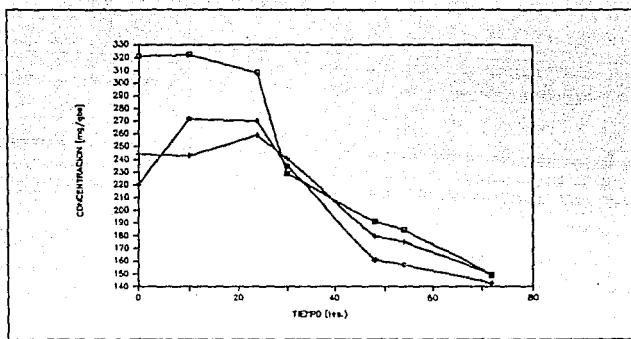


Fig.3. Efecto del tamaño de partícula sobre el consumo de azúcares en la F.S. de penicilina por *P.chrysogenum* (Wis. 54-1255), usando diferentes tamaños de partícula: 14 mm (-■-), 5.9 mm (-+-), y 3.2 mm (-◄-).

El experimento fue repetido, usando bagazo lavado para eliminar los azúcares residuales en el material que pueden interferir. En este caso las cinéticas de concentración de azúcares reductores (Fig.5) y de producción de penicilina obtenidas en los diferentes tamaños de partícula fueron muy parecidas como se puede observar en la (Fig.4) alcanzando 500 $\mu\text{g/g}$ de medio seco.

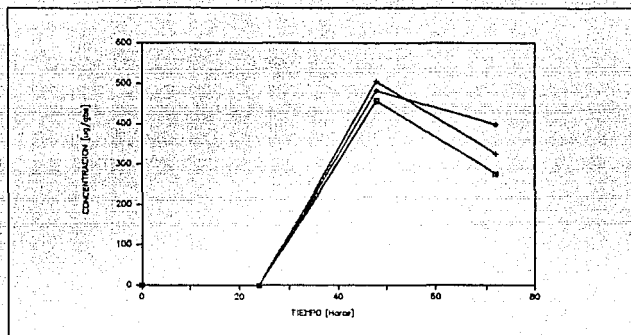


Fig.4. Efecto del tamaño de partícula sobre la producción de penicilina en F.S. por *P. chrysogenum* (Wis.54-1255), con bagacillo lavado, usando diferentes tamaños de partícula: 14 mm (-■-), 5.9 mm (-+-) y 3.2 mm (-→).

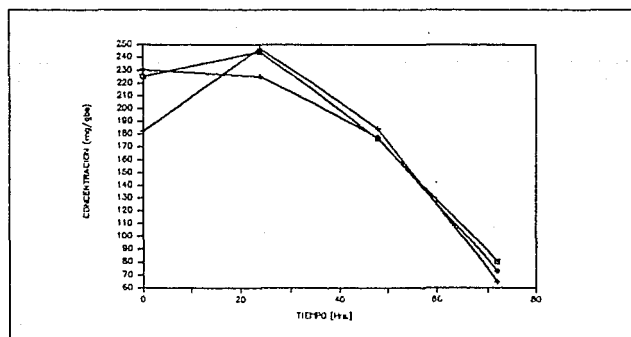


Fig.5. Efecto del tamaño de partícula sobre la cinética de consumo de azúcares durante la P.S. de penicilina por *P. chrysogenum* (Wis. 54-1255), con bagacillo lavado, usando diferentes tamaños de partícula: 14 mm (-■-), 5.9 mm (-+-) y 3.2 mm (-→).

Estos resultados se pueden apreciar mejor en la Tabla 1 donde se observa, que la producción de penicilina cambia, debido a la eliminación de los azúcares, en el segundo experimento. Como se observa la producción de penicilina en los tres tamaños de partícula son similares

La Tabla 1, muestra la mayor producción de penicilina para cada tamaño de partícula en su tiempo máximo de producción, medidos por cuantificación en bioensayo.

TABLA No. 1 Producción de penicilina en medio solido con diferentes tamaños de partícula.

TAMAÑO DE PARTICULA	TIEMPO DE PRODUCCION MAXIMA (h).	PRODUCCION MAXIMA [μ g/gbs]
GRANDE	54	1617.308
MEDIANA	48	1208.258
CHICA	48	1189.256
TAMAÑO DE PARTICULA CON BAGAZO LAVADO		
GRANDE	48	456.465
MEDIANA	48	505.126
CHICA	48	482.432

8.3 EFECTO DE LA DENSIDAD DE EMPAQUE.

Se realizaron tres fermentaciones simultáneas con diferentes densidades de empaque, las cuales fueron las siguientes:

- a) Densidad 1 (D1) = 0.23 g/ml.
- b) Densidad 2 (D2) = 0.31 g/ml.
- c) Densidad 3 (D3) = 0.35 g/ml.

La producción de penicilina fué más alta en un 20% en la fermentación de mayor densidad de empaque (0.35 g/ml) con un período de producción entre las 54 y 72 horas.

La concentración de penicilina en la fermentación con D2 (0.31 g/ml) se incrementó ligeramente en este período, mientras que el cultivo con D1 (0.27 g/ml) la concentración de penicilina decreció (Fig.6). Sin embargo un importante efecto fue observado en la cinéticas de esporulación, se encontró una mayor inhibición a la conidiación en las densidades de empaque más compactados, como se muestra en la Fig.6

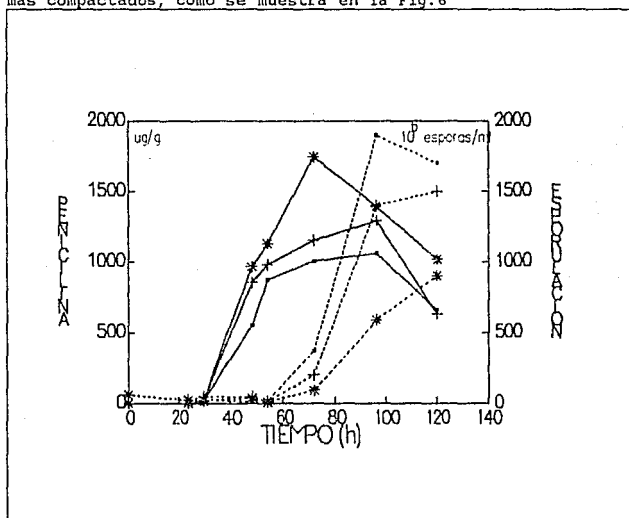


Fig.6 Efecto de densidad de empaque (-) sobre la conidiación (---) y sobre la producción de penicilina en F.S. por *P. chrysogenum*. Las densidades usadas fueron: 0.23 g/ml (---), 0.31 g/ml (+) y 0.35 g/ml (*).

No se observaron diferencias significativas en las cinéticas de contenido de humedad, azúcares reductores o de pH, se mantienen casi por igual en los tres cultivos.

La Tabla 2, muestra los tiempos de producción máxima, en las diferentes densidades de empaque, cuantificadas por bioensayo.

TABLA No. 2 Producción de penicilina en medio sólido a diferentes densidades de empaque.

DENSIDAD DE EMPAQUE	TIEMPO DE PRODUCCION MAXIMA (h)	PRODUCCION MAXIMA [µg/gbs]
DENSIDAD 1 0.23 g/ml	96	1058.794
DENSIDAD 2 0.31 g/ml	96	1290.902
DENSIDAD 3 0.35 g/ml	72	1742.882

8.4 MEZCLADO

Para la determinación del efecto del mezclado, se comparó una fermentación estática contra un cultivo en donde las columnas son desempacadas en un vaso estéril y perfectamente mezcladas cada 24 horas. El resultado (Figura 7) muestra un 30% de producción menor en el cultivo con mezclado.

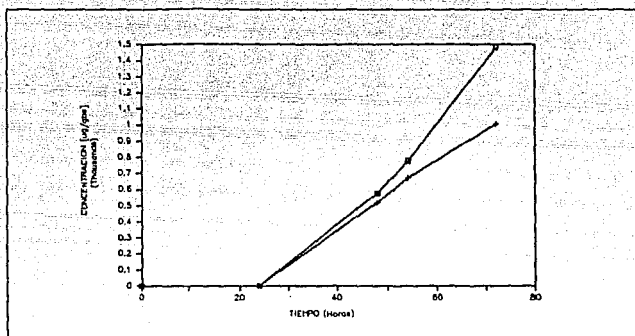


Fig.7. Efecto del mezclado sobre la producción de penicilina por *P.chrysogenum* (Wis 54-1255) en F.S. Cultivo estático (■); cultivo mezclado cada 24 h.(+).

Sin embargo se observó en las cinéticas que, el contenido de humedad fue diferente. Inicialmente iguales, pero a medida que pasa el tiempo, el cultivo con mezclado pierde humedad, haciéndose relativamente más seco.(Fig.8).

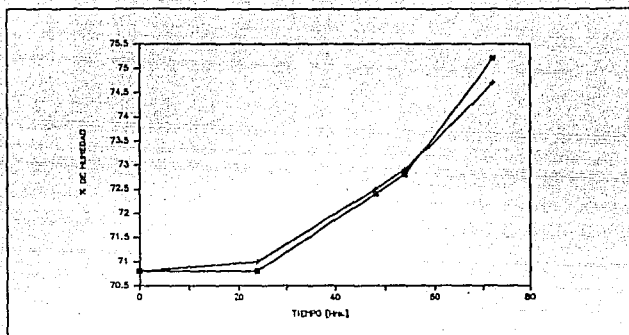


Fig.8. Efecto del mezclado sobre el % de humedad en F.S. con *P.chrysogenum* (Wis 54-1255). Cultivo estático (#); cultivo mezclado cada 24 h (+).

En las cinéticas de pH, el comportamiento es muy parecido hasta 54 horas, pero a las 72 horas el pH del cultivo mezclado tiende a ser más elevado que el cultivo estático (Fig. 9). Este cambio se puede deber a que no hay esporulación desarrollada (Fig.10) como en las columnas estáticas y que al romper el micelio se genera un pH más básico.

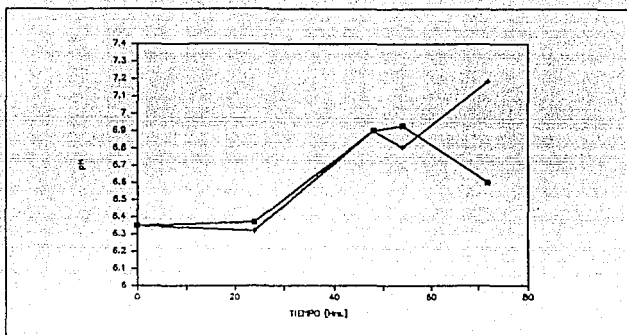


Fig. 9. Efecto del mezclado sobre el pH en F.S. con *P.chrysogenum* (Wis. 54-1255). Cultivo estático (■); cultivo mezclado cada 24 h (+).

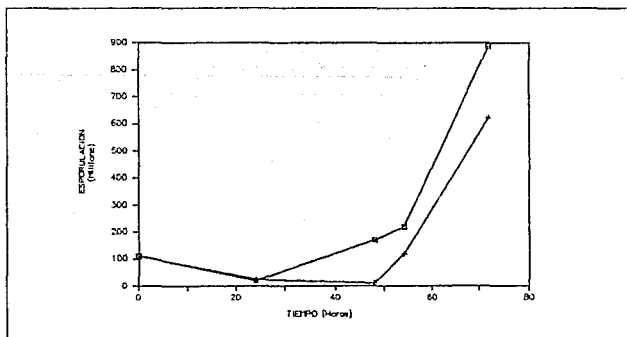


Fig. 10. Efecto del mezclado sobre la esporulación en F.S. con *P.chrysogenum* (Wis. 54-1255). Cultivo estático (■); cultivo mezclado cada 24 h (+).

Se realizó un nuevo experimento donde la pérdida de agua fué restituida para cada punto (basándose en el experimento anterior), agregando el agua en forma de aerosol (agua rociada) en el medio sólido desempacado. En este caso las cinéticas de producción, fueron muy similares (ligeramente más alto en el cultivo con mezclado (Fig.11), la producción se inició a las 48 horas, alcanzando una mayor producción a las 96 horas en los dos cultivos y las diferencias en el contenido de humedad se hicieron pequeñas.

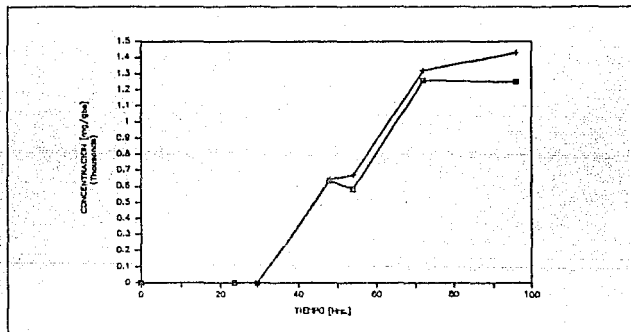


Fig.11. Efecto del mezclado con adiciones sobre la producción de penicilina por *P. chrysogenum* en F.S. Cultivo estático (■); cultivo mezclado cada 24 h (▲).

No se observaron diferencias significativas en las cinéticas de pH, azúcares reductores y de crecimiento, manteniéndose casi por igual en los dos cultivos.

La Tabla 3 resume los resultados de ambos experimentos, observándose que al restituir la humedad perdida, la producción de penicilina, se incrementa levemente.

TABLA No. 3 Producción de penicilina en medio sólido con y sin mezclado

EXPERIMENTO 1	TIEMPO DE PRODUCCION MAXIMA (h)	PRODUCCION MAXIMA [$\mu\text{g/gbs}$]
CON MEZCLADO	72	1005.595
SIN MEZCLADO	72	1482.9
EXPERIMENTO 2 CON ADICIONES DE AGUA		
CON MEZCLADO	96	1430.825
SIN MEZCLADO	96	1249.123

9.- DISCUSION.

Determinación de aminoácidos por el método de ninhidrina.

Con este método se obtiene sólo una pequeña interferencia del bagazo, por lo que se consideró adecuado para determinar biomasa en la fermentación sólida, ya que nos permitió identificar los aminoácidos totales en las muestras y de esta forma cuantificar la biomasa.

Para poder establecer la metodología fue necesario eliminar la interferencia que produce el bagazo y el medio de cultivo, por lo que se eligió el tipo de lavado, así como el volumen de agua que debería aplicarse a las muestras de fermentación, siendo está de 50 ml/g de bagazo seco fermentado realizando el lavado por filtración, antes de la reacción colorida.

Las desventajas de este método con las variaciones realizadas son que se lleva aproximadamente 3 días en su realización, hay que tener mucho cuidado en cuanto a la manipulación del sellado de las ampollitas y manejo de reactivos como lo es el ácido clorídrico (HCl) (altamente peligroso) y la ninhidrina (se descompone con la luz)., pero comparándolo en cuanto a resultados con las demás técnicas, este método se consideró como el más adecuado para determinar biomasa en la fermentación sólida con bagazo.

EFEECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE LA FERMENTACION SOLIDA DE PENICILINA.

Se considera que, en la fermentación sólida, un tamaño de partícula pequeño suministra mayor área de contacto con el hongo por unidad de volumen empacado, así como con el gas del medio ambiente (Mudget, 1986). Esto es particularmente importante en la (FS) con soporte inerte impregnado, donde los nutrientes se difunden del centro a la superficie de las partículas. En este trabajo se realizó una comparación entre diferentes tamaños de partícula, se probó un tamaño de partícula grande (malla >10), mediano (malla 10-30) y chico (malla 30-50), que es la usada normalmente.

Los resultados en este experimento demostraron un incremento en la producción de penicilina en el tamaño de partícula grande, alcanzando 1,680 $\mu\text{g/g}$ de medio sólido, es decir aproximadamente 37 % más que en los otros dos cultivos, seguido de la obtenida en el tamaño mediano (1,450 $\mu\text{g/g}$) y la menor producción fue obtenida con el tamaño de partícula pequeño (1189.256 $\mu\text{g/g}$).

Estos resultados son interesantes desde el punto de vista básico, pues sugieren que una partícula grande permite que la velocidad de difusión de los nutrientes (dentro de la partícula) dosifique el aporte para mantener una mejor idiofase (Mudget, 1986). Desde un punto de vista aplicado es buena noticia pues indica que se pueden simplificar las operaciones de un proceso de producción de penicilina.

Otros autores (Oriol et al., 1988a), han encontrado algo similar en las cinéticas de crecimiento de *A.niger* en el sistema de (FS). Los autores utilizaron un tamaño de partícula mayor que la malla 10 y menor que malla 150, aproximadamente 2.5 a 0.1 mm y encontraron que un incremento en el tamaño de partícula produce un incremento en la fase de desaceleración y concluyeron que el efecto depresivo podría deberse a las limitaciones causadas por la difusión de nutrientes intraparticular. Observaron microscópicamente que el crecimiento del hongo se desarrollaba solo sobre la superficie del soporte. Este efecto podría favorecer la producción de metabolitos secundarios.

Khumar and Lonsane., (1987) reportan un importante incremento en la producción de ácido giberílico al utilizar el tamaño de partícula grande (3-4 mm) en un sistema de (FS) utilizando salvado de trigo, y concluyeron que la producción así como la degradación del ácido gibéilico es rápido, probablemente debido a la disponibilidad de una gran fracción vacía, ya que se encuentra menos compactado, hay mayor transferencia de oxígeno y eliminación de CO₂ y otros productos volátiles.

En el presente trabajo, la mayor producción de penicilina (1680 µg/g vs 1450 µg/g) fue obtenida en el cultivo con tamaño de partícula grande. Aparentemente el tamaño de partícula influye en la producción de penicilina, pero se encontró que en las cinéticas de azúcares reductores había una mayor concentración inicial en el tamaño de partícula grande, por lo

que se procedió a realizar un nuevo experimento en donde los azúcares residuales del bagazo fueron eliminados, mediante lavados, antes de montar una nueva fermentación. En este caso las cinéticas de azúcares reductores y de producción de penicilina se mostraron muy parecidas en los tres tamaños de partícula, alcanzando una máxima producción de 500 $\mu\text{g/g}$ en medio seco. Los estudios realizados, utilizando bagacillo lavado mostraron que no hay variación en la producción, por lo tanto la mayor producción obtenida fue debido al alto contenido de azúcares en la fracción de bagacillo y no al tamaño de partícula.

EFFECTO DE LA DENSIDAD DE EMPAQUE SOBRE LA FERMENTACION SOLIDA DE PENICILINA.

La densidad de empaque es otro parámetro importante para los estudios en (FS) Poonam Nigam., (1990) reportó que cuando el sustrato y las partículas se encuentran muy compactados, en el medio se reduce el espacio intraparticular para el crecimiento micelial, y de este modo causa un obstáculo estérico dificultando la transferencia de oxígeno en un sistema de fermentación sólida, usando bagazo de caña.

Otros autores (Zadrazil and Brunnert., 1981) también proponen condiciones estéricas desfavorables para el crecimiento del hongo como una utilización inadecuada del espacio vacío entre las partículas, con una densidad de empaque compactada.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se encontró que la producción de penicilina se incrementó (en un 20%) en el cultivo con mayor densidad de empaque (0.35 g/ml) en (FS), seguido por la obtenida en la densidad 2 (0.31 g/ml), mientras que la menor producción fué obtenida con la densidad 1 (0.23 g/ml). Lo cual es contrario a lo reportado en la bibliografía, aunque hay que recordar que en nuestro caso, se trata de un metabolito secundario. Por otro lado, la esporulación en las diferentes densidades de empaque muestran mayor inhibición a la conidiación en la densidad de empaque mayor. La razón de esto no es clara, pero es probable que esté relacionado con la reducción del espacio vacío entre las partículas y la concomitante reducción del área de intercambio con la atmósfera circundante (Mudgett, 1986). La limitación del espacio para la formación de conidioforos, puede ser la razón para la inhibición de la esporulación observada en la densidad de empaque más compactado (D3), y es posible que esto favorezca la producción de penicilina.

EFFECTO DEL MEZCLADO SOBRE LA FERMENTACION SOLIDA DE PENICILINA.

El mezclado evita la heterogeneidad en la composición del medio sólido y en la edad micelial, ya que el mezclado rompe los micelios largos generando micelios cortos en estados fisiológicos parecidos. El mezclado es una condición crítica en el suministro de oxígeno adecuado, para mantener condiciones aeróbicas y tener en ventilación el exceso de

dióxido de carbono producido durante la fermentación. El mezclado puede ser usado en investigación y en el desarrollo de procesos en donde el agua, nutrientes o agentes para control de pH pueden ser adicionados al cultivo, también puede ser usado para mejorar el intercambio de gases con el medio ambiente y para eliminar el calor metabólico; controlando así la temperatura. Por otro lado ha sido reportado que algunos hongos no toleran el mezclado en (FS) (Mudgett, 1986).

Uno de los más importantes usos del mezclado es utilizarlo como una forma de disipar el calor metabólico, para evitar que se eleve la temperatura del medio a niveles que inhiban el crecimiento del micelio, además homogeniza el medio de cultivo durante la fermentación, disminuyendo los gradientes de masa y la temperatura intraparticular (Huerta, et al., 1986).

En el presente trabajo, los resultados demostraron que el mezclado realizado cada 24 horas causó un efecto negativo sobre la producción de penicilina (33.8 % más bajo) por *P.chrysogenum* en (FS). Sin embargo se observó que en las cinéticas de humedad el contenido fué diferente, inicialmente iguales, pero a medida que pasa el tiempo, el cultivo con mezclado fue perdiendo humedad, haciéndose relativamente más seco. Así mismo se observó un cambio de pH en la cinética con mezclado, este cambio pudo ser causado por la ruptura del micelio, generando un pH más básico ya que la esporulación presentada fue menor en el cultivo con mezclado en comparación con el cultivo estático. La evaporación del agua del medio de

cultivo durante el proceso de desempacamiento, parece tener un efecto importante, por lo que para comprobarlo, se procedió a realizar un nuevo experimento, en donde la pérdida de humedad fue restituida para cada punto, basándose sobre el experimento previo. En este caso se obtuvieron cinéticas de producción muy similares (ligeramente alto en el cultivo con mezclado) y la diferencia en el contenido de humedad fueron insignificantes, de igual forma el pH. Es importante observar que aparentemente no existe un efecto inhibitorio del mezclado sobre el crecimiento del hongo.

Huerta, et al., (1986) estudiaron las cinéticas de *A. niger* en (FS), usando como sustrato harina de yuca (*Manihot esculenta*) pretratada térmicamente, y observaron que no existe un efecto inhibitorio de la agitación sobre el crecimiento, encontraron que la evaporación del agua del medio de cultivo parece ser el paso limitante, durante el proceso, compararon la productividad obtenida en el fermentador en agitación, y con columnas estáticas empacadas con el mismo sustrato, y observaron un decremento del 30 %.

Jermini and Demain (1989) estudiaron las cinéticas de producción de cefalosporina por *Streptomyces clavuligerus* en fermentación sólida utilizando salvado de trigo. Mantuvieron la incubación de un cultivo estático, el cual fue comparado con un experimento de 10 días manteniéndolo en agitación, y encontraron que la producción en el cultivo estático fue superior, obteniendo concentraciones de 950 $\mu\text{g/g}$ de sustrato contra 300 $\mu\text{g/g}$ sustrato.

El mezclado ha sido particularmente útil en la producción de aflatoxinas, ochratoxinas y metabolitos secundarios (Hesseltine, C.W. 1977), este autor menciona que el mezclado en (FS) reduce la masa micelial formada por la adherencia del microorganismo y el sustrato.

Oriol, et al., (1988b), estudiaron la actividad del agua en fermentación sólida de *A.niger* sobre almidón de cassava, estimaron el agua total formada, el agua consumida y el agua residual de remoción en pequeñas cantidades después de 23 h. Realizaron un cálculo teórico basado sobre la ecuación de Ross, en la que mostraron que la actividad del agua (a_w) del sustrato, decrece a 0.85 a_w con respecto a la fase final del cultivo asumiendo ser un factor inhibitorio del crecimiento. Ellos concluyen que la limitación del crecimiento se debe a la disponibilidad del agua. Pitt and Hocking (1977) reportaron una reducción drástica (10 veces) en el crecimiento de *A. flavus* cuando decrece el a_w en un medio de agar plata.

En el presente trabajo se demostró, así mismo que el efecto negativo de la producción de penicilina es debido a la pérdida de humedad durante la operación del mezclado (desempacado de la columna, mezclado y empacado), ya que cuando esta agua fué restituida durante el mezclado no se observaron diferencias significativas.

10.- CONCLUSIONES.

EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTICULA.

La mayor producción obtenida en el tamaño de partícula grande (14 X 1.7 mm) fue debido al alto contenido de los azúcares en la fracción de bagacillo y no al tamaño de partícula.

EFECTO DE LA DENSIDAD DE EMPAQUE.

El cultivo con mayor densidad de empaque (0.35 g/ml) produce un 20 % más de penicilina con respecto a la de menor densidad de empaque (0.23 g/ml).

La densidad de empaque mostrará un efecto inhibitorio sobre la conidiación.

EFECTO DEL MEZCLADO.

La humedad disminuye con el mezclado, debido al desempacado, mezclado y empacado de la columna.

El mezclado no tiene un efecto negativo sobre la producción si la humedad perdida durante la operación es restituida.

El mezclado favorece la transferencia de calor, siendo la acumulación de calor metabólico un grave problema para los sistemas estáticos, favorece también la transferencia de oxígeno a la matriz formada por el microorganismo y el

sustrato, ya que al removerse expone una mayor superficie de contacto, disminuyendo los requerimientos de difusión intraparticular.

CONCLUSION GENERAL.

La fracción de bagacillo de caña empleada como soporte, la densidad de empaque y el mezclado son factores que alteran el desarrollo del hongo y la producción de penicilina en fermentación sólida.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

11.- BIBLIOGRAFIA.

- Abraham, E. P., (1974). Biosynthesis and enzyme hydrolysis of penicillins and cephalosporins. University of Tokyo Press, Tokio.
- Acuña-Argüelles, M., Favela-Torres, Gutierrez-Rojas, M. (1991) Some characteristics of peccinolytic system produced by Aspergillus niger in solid state fermentation. *Enzyme Microbial Technology*.
- Aidoo K.E., Hendry, R. Y Wood, B.J.B. (1982). "Solid Substrate Fermentations" *Adv. Appl Microbiol.* 28, 201-237.
- Alazard, D. , Raimbault, M. (1981) Comparative study of the amilolytic enzyme production by in liquid and solid state cultivation. *Surop. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 113-117.
- Arnstein, H.R.V., Morris, D., and Tanis, E.J. (1959). Isolation of a tripeptide containing α -amino adipic acid from the mycellium of *Penicillium chrysogenum* and its possible significance in penicillin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 35: 561-562.
- Barner, K. (1970). Zur biosynthese der penicilline: Bildung von 5-(2-amino adipyl)-cisteinyl-valin and extrakten von *Penicillium chrysogenum*. *Z. Naturforsch Teil B*, 25: 1125-1129.
- Barrios-González, J., Gutierrez, M., Viniegra, G., Roussos, S., Raimbault, M. (1988a). Modificación al proceso de fermentación sólida para producir metabolitos secundarios microbianos. Certificado de invención depositado en enero de 1988, No. 666. México.
- Barrios-González, J., Rodríguez, G.M. and Tomasini, A. (1990) Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. *J.Ferment.Bioeng.* 70 (5): 329-333.
- Barrios-González, J., Tomasini, A., Viniegra-González, G. y López L.(1989) "Penicillin production by solid state fermentation. En: "Solid State Fermentation in Bioconversion of Agro-industrial Raw Material". Ed. by M. Raimbault. *ORSTOM*, Montpellier, Francia. pp 39-51.
- Barrrios-González, J., Tomasini, A., Viniegra-González, G., López, L. (1988b). Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 10 (11): 793-798.

- Britz, M.L. and Demain, A.L. (1985) Regulation of Metabolite Synthesis En "Comprehensive Biotechnology". Vol 1. section 2 (H. Dalton, ed), Pergamon Press, Oxford. pp. 617-636.
- Bu'Lock, J.D. (1961). Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 3: 293-342.
- Bu'Lock, J.D. (1965). The Biosynthesis of Natural Products. An introduction to secondary Metabolism. Mc. Graw Hill. Publishing Company Limited Englad.
- Casida, L.E. (1968). Microbiology Industrial. Antibiotic. Fermentations. John Wiley and Sons, INC. New Yorck London. 17:221-249.
- Cooper, A.J. and Meister, A. (1977). The glutamine alfa-amidase pathway. CRC Critical Reviews in Biochemistry 4: 281-303.
- Demain, A. L. and Masurekar, P. (1974). Lysine inhibition of in vivo homocitrate synthesis in Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol. 82:143-151.
- Demain, A.L. (1974). Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentation. Lloydia, 57:147-167.
- Dhar, M.M. and Khan, A. W. (1971). Formation of Antibiotics. Nature. 233:182-184.
- Du Four, D. (1990) Tesis de Doctorado, Université de Technologie de Compiègne. FRANCIA.
- Elyan, E.H., McCormick, M.H., Stamper, M.C.; DeValeria, H., and Gadzeski, C.W. (1962). A New natural penicillin from Penicillium chrysogenum. J. Amer. Chem. Soc., 81: 4594.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. Brit. J. Exp Pathol. 10:226.
- Gordee E.Z. and Day, L.E. (1972) Effect of exogenous penicillin in penicillin biosynthesis. Antimicrob. Ag. Chemother. 1: 315-322.
- Hesseltine C.W. (1972). Solid State Fermentations. Biotechnol Bioeng. John Wiley & Sons, Inc. 14, 517-532.
- Hesseltine, C.W. (1977). "Solid State Fermentation". Process Biochem., 12: 8,9,24-27,29-32.

- Huerta S., Gutierrez, M., López, R., Massucco, A.E. y Viniegra, G. (1986). "Caracterización técnica de un fermentador dinámico para sustratos sólidos en planta piloto. Revista de la Academia Nacional de Ingeniería. México 5, 46-53.
- Hunter, D.R. and Segel, I.H. (1971). Acidic and basic amino acid transport systems in *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem Biophys., 144: 168-183.
- Jermimi, M.F.G. and Demain, A.L. (1989). "Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. Fern. Microb. Lab. Dpto. of Biology. 45
- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. (1987a). "Giberellic acid by solid state fermentation": Consistent and improved yields. Biotechnol and Bioeng. 30:267-271.
- Kumard, P.K.R. and Lonsane, B.K. (1987b). Potential of fed batch. Culture in solid State Fermentation for production of Giberellic acid. Biotechnol. Lett. 9: 179-182.
- Kumate, Jesús. (1989). Antibióticos y Quimioterápicos. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. 1989. México 1era. edición. Pp. 83-112.
- Lara, F., Mateos, R.C.; Vázquez, G., and Sánchez, (1982). Induction of penicillin biosynthesis by L-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. Biochem Biophys Res Commun., 105: 172-178.
- Larroche, C. and Gros, J.B. (1989) Strategies for Spore Production by *Penicillium roquefortii* Using Solid State Fermentation Techniques. Process Biochem. 07:97-104.
- Leveau, J.Y. y Bouix, M. (1985). Cinéticas Microbianas. En: R. Scriban (Editor) Biotecnología. El manual moderno. México D.F. pp. 669
- Loder, P.B. and Abraham, E.P. (1974). Isolation and nature of intracellular peptides from a cephalosporin C producing *Cephalosporium sp.* Biochem J., 123:171-175.
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiattman, S. and Ramakrishna, S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 7: 258-265.
- López Nieto, M.J. Ramos, F.R., Luengo, J.M. and Martín, J.F. (1985). Characterization of the biosynthesis in vivo of aminoadypil-cysteinyl-valine in *P.chrysogenum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 343-351.

- Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R. y Martín, J.F. (1980). "Inhibition and Repression of Homocitrate Synthase by Lysine in *Penicillium chrysogenum*". *J. Bacteriol.* 144 (3) 869-876.
- Martín, J.F. and Arnold L. Demain. (1980) "Control of antibiotic Biosynthesis". *Microbiol. Reviews*, p.230-251.
- Martín, J.F., Gil, J.A., Naharro, G., Liras, P., and Villanueva, J.R. (1979). "Industrial microorganisms tailor made by removal of regulatory mechanisms". En: *Genetics of Industrial Microorganisms*. Sebek, O.J. and Laskin, A.I. (Eds.). *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., pp 205-209.
- Masurekar, P.S. and Demain, A.L. (1974). "Impaired penicillin production in lysine regulatory mutants of *Penicillium chrysogenum*". *Antimicrob. Agents and Chemother.* 6-3:366-368.
- Meesschaert, B., Adriens, P., and Eyssen, H. (1980). "Studies on the biosynthesis of isopenicillium N with a cell free preparation of *Penicillium chrysogenum*". *J. Antibiotics*. 33:722-730.
- Miller G.L. (1959). "Utilitation the Acid 3,5 DNS reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chem.* 31, 426-428.
- Moo Young, M., Moreira, A.R. and tengerdy, R.P. (1983). "Principles of Solid Substrate fermentation". *The filamentous fungi, fungal technology*. Smith D.E. Ed.4, 119-128. Edwards Arnold Publishers; London.
- Moore, S. and Stein, W.H. (1954). "A Modified Ninhydrin Reagent for the photometric Determination of amino acids and Related compounds". *J. Biol. Chem.*, 211: 907-913.
- Mora, Y., Espín, G, m Willms, K., and Mora, J. (1978). "Nitrogen accumulation in mycellium of *Neurospora crassa*". *J. Gen Microbio.* 104: 241-250.
- Mordejai Morris Strauch Milstein (1989). "Historia de la biotecnología". *Ciencia y desarrollo*. 14(84):19-32.
- Mudget, R.E. (1986). "Solid State Fermentations". En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, A.L. Demain and N.A. Solomon, eds. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. pp. 66-83.

- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S. and Viniegra-González, G. (1988b) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27. 498-503.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-González, G. Raimbault, M. (1988a) solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. J. Ferment. Technol. 66, 57-62.
- Pitt, J.L. and Hocking A.D. (1977) "Influence of solutes and hydrogen ion concentration on the water relation of some Xerophilic fungi. J.Gen. Microbiol. 101: 35-40.
- Poonam, N. (1990). "Investigation of some factors important for solid state fermentation of sugar cane bagasse for animal feed production". Enzyme Microb. Technol. 12: 808-811.
- Prescott S.C. and Dunn, C.G. Microbiol Industrial. 3a. Edition 1962. Mc. GramHill (N.Y., Toronto, London). Cap.45 pp:812-841.
- 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.
- Raimbault, M, Alazard, D. (1980) Culture method to study fungal a growth in solid fermentation. Eur. J. Appl. Microbiol. 9: 199-209.
- Raimbault, M., Revah, S., Pina, F. and Villalobos P. (1985). Protein Enrichment of Cassava by Solid Substrate Fermentation Using Molds. Isolated from Traditional Foods. J Ferment. Technol. Vol.63. No. 4 395-399.
- Rainbow, C. and Rose, A.H. (1963). Biochemistry of Industrial Micro-organisms. Academic Press. London and New York Cap.7 pp.227-267.
- Ramesh M.V. and B.K. Lonsane. (1991). Regulation of alpha-amylase production in *Bacillus licheniformis* M27. by enzyme end products in submerged fermentation and its overcoming in solid State Fermentation System. Biotechnol, Lett. 13 (5): 355-360.
- Revilla, G., Luengo, J.M., Villanueva, J.R., and Martín, J.F. (1980). Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis, en: advances in Biotechnology. Vol. III. Vézina, C. and Singh, K. (Eds.). Pergamon Press, Toronto, Canada, pp. 155-160.

- Rose Anthony H. (1979) Secondary Products of metabolims. *Chemical Microbiology*. 3a. edición. Inglaterra. pp.318-323.
- Roussos, S. (1985) Tesis de Doctorado, Université de Provence. Francia.
- Roussos, S., Raimbault, M., Viniegra-González, G., Saucedo Castañeda, G., and Lonsane, B.K. (1991). Micología Neotropical Aplicada 4, 83-98.
- Sánchez, S., Paniagua, L.; Mateos, R.C., Lara, F., and Mora J. (1980). Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* NRRL-1951. En: *Advances in Biotechnology*, Vol. III, Vézina, C. and Singh K. (Eds.). Pergamon Press. Toronto, Canada, pp.147-154.
- Saucedo-Castañeda, G., Lonsane, B.K., Krishnaiah, M.M., Navarro, J.M., and Raimbault, M. (1992). *Process. Biochem.* 27, 97-107.
- Scriban, R., Alain Arnaud., Max Bernad., Claudette Berset., Juelle Bocquet., Marielle Bouix, et al. (1985). "Biotechnología". Asociación Francesa de enseñantes de farmacia Galénica. Technique et Documentation Paris, Francia. Editorial el Manual Moderno. México ; D.F. Pp:112-122.
- Sergio Sánchez, Ma. Elena Flores y Rosa del Carmen Mateos. (1986) Aspectos Bioquímicos y Regulatorios de la Biosíntesis de penicilina. Dpto. Biotecnología. México, D.F. pp.129-137.
- Smith, J.E y Berry, D.E. (1974). Diferentiation Secondary metabolism and industrial mycology. An introduction to biochemistry of fungal Developments. Academic press. Gran Bretaña.
- Snell-Snell (1956). Determinación de aminoácidos (Método de ninhidrina). *Colorimetric Weblidds of Analysis*. 13 ed. IV Van Nostrods Co.
- Somerson, N.L; Demain, A.L., and Nunheimer. (1961). "Reversal of lysinne inhibition of penicillin production by Á-amino adipic acid". *Arch. Biochem.* 93, 238-241.
- Trejo, M.R. (1985). Producción de enzimas cécticas por fermentación en medio sólido. Tesis Profesional. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Viniegra-González, G., Perspectives and Limitations of solid fermentation in Mexico. Biotechnol. México D.F. En Solid State Fermentations in Bioconversion of agro-industrial raw material. Ed. By M. Rimbault. (1989) 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.

Weinberg, E.C. 1970. Biosynthesis of secondary metabolites: roles of trace metals. Adv. Microbiol Physiol. 4:1-44

Zadrazil, F. and Brunnert, H. (1981). Eur.J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11, 183.