

ERROR DE No. _____ DE PAGINA



00381

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

3
ref.

" PRODUCCION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS POR FERMENTACION
SOLIDA "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

JAVIER BARRIOS GONZALEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1994

DIRECTOR DE TESIS : DR. SERGIO REVAH MOISEEV



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

COMITE TUTORIAL

Dr. Sergio Revah Moiseev

Dra. Amelia Farrés González-Sarabia

Dr. Jesús Aguirre Linares

JURADO

Dra. Susana Saval Bohorquez

Dr. Gustavo Viniestra González

Dr. Pierre Christen

Dr. Roberto Coria Ortega

A Sofia por su amor, apoyo y ayuda

*A Julia y Santiago
que, aunque dificultaron la realización de este trabajo,
lo compensaron dándome entusiasmo e inspiración.*

**Agradezco a Sofia, Sergio, Armando y mis alumnos de tesis
su ayuda y apoyo en la realización del trabajo.**

INDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	11
I.- INTRODUCCION	13
II.- ANTECEDENTES	14
1. Metabolismo Secundario	14
2. Penicilina	17
2.1 Biosíntesis	
2.2 Regulación	
2.3 Producción	
3. Fermentación en Medio Sólido	24
3.1 Generalidades	
3.2 Definición	
3.3 Ventajas y Desventajas	
3.4 Tipos de Microorganismos	
3.5 Aplicaciones	
3.6 Aspectos Fisiológicos y Control del Metabolismo y el Crecimiento en FS	
3.7 Metabolismo Secundario	
III.- OBJETIVOS	35
IV.- METODOS	37
V.- RESULTADOS	41
1. Factores Ambientales	42
1.1 Traducción Resultados Artículo A:	
Producción de Penicilina por Fermentación Sólida.	42
1.1.1 Sobretiro del Artículo A:	
Penicillin Production by Solid State Fermentation	45
1.2 Efecto de la Relación de los Constituyentes (soporte/ nutrientes/agua) sobre la Producción de Penicilina en fermentación sólida (FS).	53
1.3. Traducción Resultados Artículo B:	
Efecto del Tamaño de Partícula del Soporte, la Densidad de Empaque y la Agitación sobre la Producción de Penicilina en FS..	61
1.3.1 Sobretiro del Artículo B:	
Effect of Support Particle Size, Packing Density and Agitation on Penicillin Production in Solid State Fermentation.	63

1.4 Efecto del Mezclado sobre la Producción de Penicilina y la Respiración de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en FS.	75
2. Factores Nutricionales	
2.1 Efecto de la Fuente de Carbono y Regulación de la Biosíntesis de Penicilina en Fermentación Sumergida (FSm) y en FS.	76
2.1.1 Sistema de FS para Estudios de Regulación	
2.1.2 Regulación por Carbono en Medio Líquido	
2.1.3 Regulación por Carbono en FS.	
2.1.4 Otros Mecanismos Regulatorios de la Biosíntesis de Penicilina	
3. La Cepa y el Nivel de Producción	86
3.1 Traducción de Resultados Artículo C: Desarrollo de Cepas de Alta Producción de Penicilina para FS.	86
3.1.1 Sobretiro Artículo C: Development of High Penicillin Producing Strains for Solid State Fermentation	89
VI.- DISCUSION	105
1. El Sistema de FS (soporte-sustrato)	105
2. Los Microorganismos y los Productos	107
3. Factores que Controlan el Metabolismo Secundario	107
3.1 Factores Ambientales	107
3.1.1 Humedad y Actividad de Agua	
3.1.2 Tamaño de Partícula y Densidad de Empaque	
3.1.4 Aireación y Agitación	
3.2 Efecto de los Factores Nutricionales	112
3.2.1 Efecto de la Fuente de Carbono y Regulación de la Síntesis de Penicilina en FSr y en FSm	
3.2.3 Nutriente Limitante	
3.2.4 Efecto del Precursor	
3.3 La Cepa y el Nivel de Producción	117
3.3.1 Definición de Parámetros para Evaluar las Cepas	
3.3.2 Evaluación de Cepas de Diferente Nivel de Producción	
3.3.3 Cepas Especiales para Medio Sólido	
VII.- CONCLUSIONES	121
VIII.- RECOMENDACIONES	123
IX.- BIBLIOGRAFIA	125
X.- INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS	137

"En occidente, la fermentación sumergida con cultivos puros, casi se ha convertido en una fijación, la cual creo, es en parte responsable del estancamiento o al menos de la desaceleración del crecimiento de la industria de fermentaciones".
Hesseltine (1972)

RESUMEN

Esta tesis, junto con otros reportes recientes, demuestra que es posible producir metabolitos secundarios útiles por fermentación sólida (FS). En este trabajo se estudió el efecto de factores ambientales, nutricionales y genéticos sobre la producción de penicilina en FS en soporte. Esto con el fin de entender mejor el funcionamiento de la idiofase y de esta manera poder evaluar mejor el potencial del sistema para la producción de metabolitos secundarios.

Se desarrolló un sistema de FS en soporte (medio líquido absorbido en bagacillo de caña), el cual no sólo resulta conveniente para realizar estudios básicos, sino que permite obtener una alta producción.

Otros autores han demostrado que la humedad inicial no afecta de manera importante el crecimiento en FS, y que es la actividad de agua (A_w) la que lo controla (al menos la germinación y la velocidad de crecimiento). En contraste con la fase de crecimiento, el presente trabajo demuestra que la humedad inicial tiene un importante efecto sobre la producción de penicilina (idiofase). Humedades de 70% permitieron una alta velocidad de síntesis al final del cultivo que dio por resultado una producción tres o cuatro veces superior a la obtenida en condiciones diferentes.

Se demostró también que, a diferencia de la fermentación sumergida (FSm), es necesario usar medios concentrados para obtener altos niveles de producción del antibiótico. Al utilizar medios 2X (el doble de lo recomendado para FSm) se incrementó la producción cerca de cinco veces. Resultados posteriores ampliaron el panorama demostrando que ni la A_w ni la humedad inicial controlan directamente la idiofase. Esta fase es regida por la relación entre el soporte y los otros dos componentes del medio sólido: el agua y los componentes del medio de cultivo o nutrientes. Se encontró que para obtener una alta producción es necesario mantener una relación agua/soporte alta (7 g/g) junto con una relación nutrientes/soporte relativamente baja (1.1 a 1.6 g/g) ó, alternativamente, utilizar una relación agua/soporte menor (5 g/g) y compensarlo con una mayor proporción nutrientes/soporte (2 g/g).

Aparentemente, esas condiciones iniciales ocasionan diferentes características en la fase de crecimiento pero permiten un adecuado aporte de nutrientes en la idiofase.

Se investigó el efecto de dos parámetros relacionados con el soporte: el tamaño de partícula y la densidad de empaque. El primero no tuvo efecto, quizás debido a que la velocidad de consumo es menor que la de difusión. La mayor densidad de empaque (0.34) tuvo un moderado efecto positivo, aunque no está claro por qué.

Por otro lado, se encontró que es posible mezclar el cultivo sólido sin tener un efecto negativo sobre la producción de penicilina por *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255. De hecho, se observó un efecto positivo del mezclado sobre la producción cuando el cultivo se inculó con una cepa de mayor producción (P-2). Resultó interesante que el mezclado produjo un incremento en la actividad respiratoria del cultivo, probablemente debido a una mayor homogeneidad fisiológica de éste, junto con un mayor número de puntas de crecimiento (y secreción). El hecho de que se pueda mezclar la FS de penicilina,

promete dar una mucho mayor versatilidad a la investigación así como al proceso de producción.

En otra parte del trabajo se realizó un estudio comparativo sobre la regulación por carbono sobre la síntesis de penicilina en FS y FSm. Se estimaron los umbrales regulatorios correlacionando el inicio de la síntesis con la cinética de consumo de glucosa. Los resultados (FSm: 28 - 20 g/l; FS: 36 a 14 g/l) demuestran que la síntesis de penicilina en FS también está regulada por represión catabólica y a umbrales similares al medio líquido. Resultados preliminares sobre retroregulación por penicilina indican que éste y probablemente todos los mecanismos que regulan la síntesis de penicilina en medio líquido están activos en FS.

En general, se puede decir que gran parte de los principios que rigen el metabolismo secundario en medio líquido también lo hacen en FS. Sin embargo, debe haber algunas diferencias que, aunque más sutiles, deben tener una importancia clave en la comprensión de esta fase de desarrollo.

Como en el caso de la FSm, la cepa resultó ser un elemento fundamental en el nivel de producción que se obtiene por FS. Se encontró que las cepas con mayor capacidad de producción en FSm también son las que más producen en FS. Esto confirma los resultados sobre regulación ya que implica que las mutaciones que les permiten sobreproducir en FSm también son útiles para sobreproducir en FS. En esta parte se definieron parámetros que permiten evaluar cuantitativamente la eficiencia de las cepas para producir en FS (producción relativa = PS/PL). Con esta herramienta se determinó que las cepas más productoras (en FSm) y sus mutantes espontáneas tienden a ser las menos eficientes para producir en FS, en el sentido de que producen menos veces más en FS que en FSm. Esto indica que hay una(s) característica(s) que les permite producir eficientemente en FS, la cual es más frecuente en cepas genéticamente más cercanas a la silvestre. Se encontró que algunas mutantes espontáneas de las cepas de alta producción conservan o re adquieren esta característica, de manera que manifiestan su producción con alta eficiencia en FS. De esta manera se generaron mutantes especiales para FS que produjeron 10,500 µg/g.

Si se logra identificar esta característica, no sólo se ganará una mejor comprensión sobre las particularidades de la idiofase en FS, sino se podrán hacer sistemas más directos de selección racional de mutantes o incluso de clonación y transferencia de genes.

Este trabajo ha permitido un conocimiento más profundo de los principios que rigen el metabolismo secundario en FS y se concluye que sí es posible obtener altas concentraciones de penicilina por este sistema. También, que se encontraron factores clave con los que se podrá continuar elevando la producción. Esto permite ver con más claridad el potencial de la FS como método alternativo para producción de metabolitos secundarios.

SUMMARY

This thesis, together with other recent reports, show that it is possible to produce great amounts of useful secondary metabolites by solid state fermentation (SSF). The effect of environmental, nutritional and genetic factors on penicillin production by SSF in support was studied in the present work. This, with the aim of having a better understanding of how idiophase functions in the solid medium and, in this way, be in a better position to evaluate the system's potential for secondary metabolite production.

A system of SSF on support (liquid medium absorbed in sugarcane bagasse) was developed, which is not only convenient to perform basic studies, but also produces high concentrations of metabolites.

It has been shown that initial moisture content does not affect growth in SSF, and that water activity (A_w) is the factor that controls the growth phase. However, the present work shows that initial moisture has an important effect on penicillin production (idiophase). Moisture contents of 70% allowed a high rate of synthesis at the end of the culture, which resulted in a three or four-fold increase in production, in relation with different initial moisture values.

It was shown that, contrasting with submerged fermentations (SmF), it is important to use concentrated media to obtain high productions of the antibiotic. The use of 2X medium (twice the concentration reported for SmF) caused a five fold increase in production. Later results broadened the understanding by showing that it is not A_w nor moisture that controls idiophase in a direct way. This phase is controlled by the proportion of the support with the other two components of the solid medium. It was found that high production is obtained with a high water/support ratio (7 g/g) together with a relatively low nutrients/support value (1.1 to 1.6 g/g), or alternatively use a lower water /support (5 g/g) with a higher nutrients/support value (2 g/g). It appears that these initial conditions produce growth phases with different characteristics, but allow an adequate income of nutrients to the fungus during the production phase.

The effect of two parameters related to the support was investigated: particle size and packing density. The former did not show a significant effect, while the highest density tested (0.34) produced a positive effect on penicillin production in SSF, although the causes are not clear.

On the other hand, it was found this solid culture can be agitated (or mixed) without any deleterious effect on penicillin production by *P.chrysogenum* Wisconsin 54-1255. In fact a positive effect on production was observed when a higher producing strain (P-2) was used. It is interesting to note that mixing produced an increase in the respiratory activity of the culture, probably due to a higher physiological homogeneity, and a higher number hyphal tips, which are more active in growth and secretion. The fact that penicillin SSF can be mixed offers a higher level of versatility to basic research and process development.

In another section of the work, carbon regulation of penicillin biosynthesis was comparatively studied (solid vs liquid medium). Regulatory thresholds were estimated correlating the initiation of the synthesis with glucose consumption kinetics. Results (SmF: 28-20 g/l; SSF: 36-14 g/l) show that penicillin biosynthesis in SSF, as in SmF, is

regulated by catabolic repression, and at similar thresholds. Preliminary results indicate that penicillin feed-back regulation, and probably the rest of the regulatory mechanisms, are also active in SSF.

In general terms, it can be said that the principles that rule secondary metabolism in liquid medium also do so in SSF. However, there must be some differences, more difficult to detect but key in the knowledge of this part of metabolism. It is possible that these include differences in sugar (and other nutrients) consumption and secretion.

Like in the case of SmF, the strain turned out to be a fundamental element in the production level that can be obtained in SSF. It was found that higher yielding strains in SmF are also the highest producing strains in SSF. This confirms our results on regulation in SSF, since it implicates that mutations that allow high production in liquid medium are also useful to produce in solid medium. In this part, parameters were defined which allow quantitative evaluation of the efficiency of different strains to produce in SSF (relative production PS/PL). With this tool, it was possible to determine that higher yielding strains (for SmF) and their spontaneous mutants tend to be less efficient in SSF, that is, the strains produce less times more in SSF in relation with SmF. This implicates that there is one or several characteristics that allow high production in SSF, which are more frequently found in low producing strain, genetically closer to the wild type. It was observed that some spontaneous mutants of the high producing strains have kept or re-acquired this characteristic, so these strains show their production level with high efficiency in the solid medium. In this way, special mutant strains for SSF were generated, which reached production levels above 10,000 $\mu\text{g/g}$

If these characteristics are identified, a better understanding of the particularities of idiophase in SSF will be obtained. Also, more direct and efficient rational selection methods will be designed.

This work has contributed to a deeper knowledge of the principles underlying secondary metabolism in SSF. It is concluded that high production levels can indeed be obtained by this culture system, and that a wide vision was obtained of the way in which production levels can be improved further. This gives a more clear vision of the production potential of SSF as an alternative method to produce useful secondary metabolites be attained

I- INTRODUCCIÓN

La fermentación sólida es un método tradicional de cultivo que ha sido revalorizado y modernizado en los últimos 10 ó 15 años, surgiendo sistemas de FS no tradicionales y novedosos. La diversidad de aplicaciones actuales y potenciales hacen que vayan apareciendo un gran número de campos de aplicación.

Aunque los efectos del ambiente acuoso sobre la fisiología microbiana han sido ampliamente estudiados en cultivo sumergido, hay poca información sobre el efecto del ambiente sólido sobre el crecimiento microbiano y menos aún sobre la idiofase. Se puede pensar que estos efectos son similares a los de cultivo sumergido, modificados por estructura física del medio sólido y variaciones locales de concentración de nutrientes y quizás efectos relacionados con la interfase sólido-líquido-aire. En otras palabras, se podrían esperar algunos efectos similares a los conocidos para medio líquido, algunos efectos similares a los conocidos para la fase de crecimiento en medio sólido y efectos particulares para la idiofase en fermentación sólida (FS).

Dada esta situación, una aproximación prometedora a la FS en general, y a la producción de metabolitos secundarios en particular, parece ser el ampliar y profundizar los estudios básicos sobre el comportamiento microbiano en medio sólido y aplicarlos al desarrollo de proceso. Como ha ocurrido en ciertas fermentaciones industriales en FSm, cuyas productividades se han incrementado de manera logarítmica en un período de varias décadas. Tales incrementos se han debido, en parte a la investigación en fisiología, bioquímica y genética microbiana y en parte a la investigación en ingeniería (Demain, 1977). En relación a la producción de metabolitos secundarios por FS, resulta sorprendente que, a pesar de lo alentador de los resultados y de lo productiva que parece la FS para la producción de metabolitos secundarios, los trabajos sobre micotoxinas terminaron al final de los años 70 y no hubo más reportes sobre este tema hasta un tiempo, después del inicio de esta tesis en 1987.

Se conoce una gran diversidad de metabolitos secundarios microbianos con una enorme gama de actividades biológicas y de usos actuales o potenciales. Se pueden ver claramente sus usos en la industria farmacéutica, agropecuaria y de alimentos. La FS parece un método con gran potencial para producir ventajosamente (en relación a la fermentación en medio líquido o sumergida) diversos metabolitos secundarios. Sin embargo, al iniciarse esta tesis no existía información sobre este sistema aplicado a la producción de metabolitos secundarios útiles.

Por otro lado, la penicilina es un modelo muy conveniente de metabolito secundario fúngico dado a su importancia económica y a lo bien estudiado que esta su fisiología, bioquímica y genética, por lo que se pensó en estudiar la síntesis de penicilina en FS. Sin embargo, se consideró que la falta de conocimientos básicos sobre los factores que controlan la producción de este tipo de compuestos en medio sólido evita realizar una evaluación acertada del sistema.

De esta manera, se planeó realizar estudios básicos, sobre el efecto de factores ambientales (humedad inicial, concentración del medio y contenido de soporte), nutricionales (efecto de la concentración de glucosa) y genéticos, encaminados a

establecer los factores que la controlan y de comprender las particularidades de su funcionamiento (principios básicos). Así, obtener mayores producciones y una mejor idea del camino para continuar mejorando los procesos. Así mismo poder establecer una comparación más precisa con la FSM.

Los estudios sobre el efecto de factores ambientales, comprenden el artículo A (Penicillin Production by Solid State Fermentation), resultados que no han sido publicados aún (Efecto de los Constituyentes: Nutrientes/Agua/Soporte) y el artículo B (Effect of Particle Size, Packing Density and Agitation on Penicillin Production in Solid State Fermentation). Posteriormente, se exponen los estudios sobre el efecto de los factores nutricionales (fuente de carbono y regulación de la síntesis). Finalmente se presenta el estudio sobre los factores genéticos (efecto de la cepa), en forma del artículo C.

II.- ANTECEDENTES

1. Metabolismo Secundario

Los fisiólogos microbianos de los primeros tiempos observaron que en la fase logarítmica de crecimiento hay un metabolismo intenso, con los microbios replicando rápidamente sus componentes celulares, como prerequisite para el crecimiento y la división celular. Se asumió, inicialmente, que la fase estacionaria representaba una total inactividad metabólica por parte de los microorganismos. Fueron los químicos de productos naturales los que se dieron cuenta de la falsedad de ese concepto. Entre 1920 y 1930, los químicos orgánicos encontraron que, los cultivos de hongos en fase estacionaria eran una fuente casi inagotable de compuestos orgánicos complejos, y que la elucidación de sus estructuras químicas ofrecían un reto formidable. Conforme las estructuras de estos compuestos fueron descritas, se hizo evidente que no eran compuestos que jugaran un papel durante la fase exponencial de crecimiento. Algunos años antes los fisiólogos de plantas habían reconocido dos clases similares de compuestos producidos por plantas superiores. Había compuestos como clorofilas que eran sintetizadas por todas las plantas; estos fueron nombrados productos primarios del metabolismo. En contraste había compuestos como alcanfor y taninos, los cuales sólo se pueden obtener de especies particulares de plantas y a los cuales no se les puede asignar una función metabólica. Estos últimos compuestos fueron llamados productos secundarios del metabolismo.

Hace poco más de dos décadas el término fue usado para describir un amplio rango de compuestos producidos por microorganismos y que, como sus contrapartes vegetales, no están directamente relacionados con compuestos que conforman la célula microbiana. Hoy en día, el término metabolito secundario es asociado más a menudo con productos microbianos que con productos de plantas. Esto se debe a que los metabolitos secundarios microbianos incluyen grupos de compuestos que han sido muy extensa y exitosamente utilizados como agentes quimioterapéuticos y farmacológicos. Entre éstos, un lugar destacado corresponde a los antibióticos ya que han revolucionado la batalla que mantiene el hombre contra los microbios que son patógenos para él mismo, así como para animales y plantas.

Los metabolitos secundarios microbianos son producidos por algunas especies y aún entonces sólo por algunas cepas. Se puede decir que no son esenciales para el crecimiento y que su producción no está asociada con esa fase de desarrollo. Estos compuestos han sido descritos como metabolitos secundarios en oposición a los metabolitos primarios como aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos que son esenciales para el crecimiento. A pesar de la enorme diversidad de estructuras químicas encontradas en los metabolitos secundarios microbianos, la mayoría de estos compuestos pueden ser agrupados en unas cuantas clases según su origen biosintético. Una clasificación conveniente es la propuesta por Rose (1979). Este autor los clasifica en sólo cuatro grupos o familias y hace énfasis en que esto refleja el reducido número de

grupos en los que uno puede clasificar los compuestos de bajo peso molecular que son los precursores de los constituyentes celulares.

De esta manera, se puede decir que los metabolitos secundarios derivan de:

- 1) aminoácidos,
- 2) azúcares,
- 3) acetil-CoA (y compuestos relacionados, incluyendo intermediarios del Ciclo de Krebs) y
- 4) terpenos.

Siendo raros los metabolitos secundarios provenientes de la poza metabólica de nucleótidos.

La función de los metabolitos secundarios en el metabolismo de la célula es desconocida. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la producción de metabolitos secundarios en microorganismos. Que no tienen función y que son el resultado de una descompostura de la regulación del metabolismo celular es improbable. Dos hipótesis muy relacionadas han propuesto que los productos específicos del metabolismo secundario no son importantes, sino que el proceso del metabolismo secundario en sí es una ventaja selectiva para el microorganismo. Se considera que provee un mecanismo por medio del cual el exceso de intermediarios (Bu'Lock, 1961) o aún el exceso de carbohidratos en el medio, pueden ser metabolizados durante condiciones de crecimiento adversas. Tal mecanismo serviría para mantener a la célula en un estado funcional durante condiciones que evitan o dificultan el crecimiento.

La relación entre crecimiento y metabolismo secundario ha sido muy estudiada (Bu'Lock, 1967, 1974; Demain, 1968, 1972). Se ha encontrado que la producción de metabolitos secundarios se inicia cuando un (o más) nutriente clave se agota, limitando el crecimiento. Borrow *et al.* (1961), estudiando la producción de ac. giberélico, utilizaron los términos de fase balanceada para describir la primera mitad de la fase de crecimiento exponencial, y fase de almacenamiento para la última mitad de la fase exponencial. Justificaron el uso de este último término, ya que es la fase en la que se agota la fuente de nitrógeno y el peso celular se incrementa debido a la acumulación de lípidos y carbohidratos y que es la fase en la que la producción de metabolitos secundarios se inicia. La fase principal de producción de metabolitos secundarios, la fase estacionaria de crecimiento, fue rebautizada por estos autores como fase de mantenimiento. Algunos años después, Bu'Lock introdujo otros términos para nombrar la fase de metabolismo primario: trofofase (de nutrición) e idiofase para el metabolismo secundario (peculiar o misteriosa). Aunque estos términos tienen un valor descriptivo, no son ni absolutos ni mutuamente excluyentes.

Se considera que el crecimiento en la fase no limitada es balanceado ya que la velocidad de consumo de nutrientes y la de utilización permanecen constantes, siendo controladas por las características genéticas del microorganismo más que por la concentración de nutrientes. En estas condiciones se esperaría que toda la capacidad biosintética de la célula es requerida para mantener una alta velocidad de crecimiento. El crecimiento se hace desbalanceado cuando la velocidad de crecimiento es limitada por una escasez de uno o más nutrientes. Aquellos procesos celulares que requieren el nutriente limitante se restringen, mientras que los que no lo requieren, no. Como el

crecimiento depende de un amplio rango de actividades biosintéticas, la ausencia de uno o varios nutrientes: carbono, nitrógeno, fosfato, o elementos traza, puede restringirlo. Los nutrientes no limitantes pueden ser entonces desviados hacia biosíntesis no relacionadas con el crecimiento. La biosíntesis de metabolitos secundarios o de compuestos específicos requeridos para la diferenciación puede ser estimulada de esta manera.

No es posible definir una velocidad específica de crecimiento por debajo de la cual se pueda decir que el crecimiento es de tipo idiofase. Sin embargo, este valor de μ puede ser definido para un metabolito específico producido en la idiofase (Smith & Berry, 1974).

Estas ideas pueden ser ilustradas mencionando los ejemplos de los alcaloides del ergot, cuya síntesis comienza cuando se acaba la fuente de fósforo del medio; la síntesis de gibberelinas que se inicia al agotarse la fuente de nitrógeno y el caso de la penicilina, cuya síntesis se dispara al agotarse la fuente de carbono de utilización rápida (la glucosa).

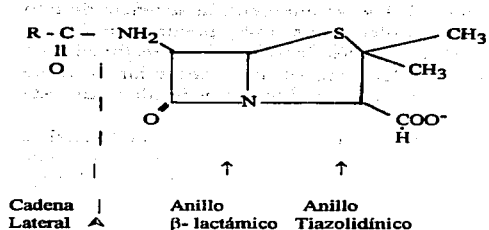
Se han descrito mecanismos que regulan las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios, los cuales parecen ser similares a los que funcionan en vías que llevan a la síntesis de metabolitos primarios (Wang *et al.*, 1979).

2. Penicilina

La penicilina es no sólo el más antiguo sino el progenitor de los agentes quimioterapéuticos más importantes desarrollados en los últimos 50 años. Una gran cantidad de investigación de importancia industrial ha sido realizada con el hongo productor de penicilina *Penicillium chrysogenum*, lo cual hace ahora posible tener una imagen coherente del modo de biosíntesis de este antibiótico. Es más, muchos de los principios derivados de estudios con *P. chrysogenum*, y otros hongos productores de antibióticos relacionados, son igualmente aplicables a microorganismos productores de otros metabolitos secundarios (Ball, 1987). Estos estudios permitieron el incremento de la productividad, de los hongos usados industrialmente, en más de mil veces, en relación con las cepas originales de *Penicillium* (Queener & Swartz, 1979).

2.1 Biosíntesis

Las penicilinas forman parte de un grupo de antibióticos llamados β -lactámicos. Los términos penicilinas y cefalosporinas se refieren a compuestos bicíclicos en los cuales el anillo β -lactámico está fusionado a un anillo de cinco miembros (tiazolidina) o de seis miembros (dihidrotiazina), respectivamente (Esquema 1) (Chain, 1948; Abraham & Newton, 1961). El núcleo de la penicilina: 6-APA (ácido 6-amino penicilánico) puede tener distintos substituyentes (R), dando lugar a las diferentes penicilinas (G, V, K, F, X, etc.)



Esquema 1. Estructura química de las penicilinas.

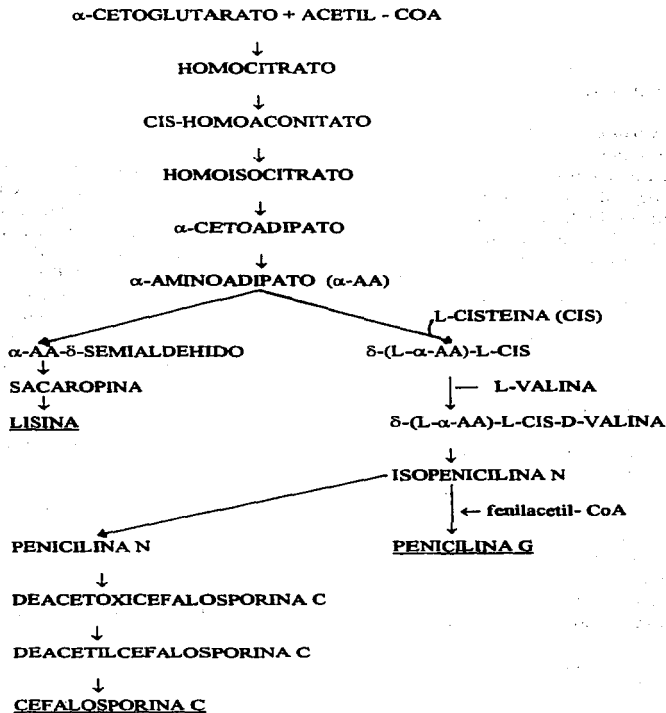
Las penicilinas y las cefalosporinas fueron los primeros antibióticos β-lactámicos en estar disponibles comercialmente para el tratamiento de infecciones bacterianas en humanos y animales (Chain *et al.*, 1940). Muchos nuevos antibióticos β-lactámicos de importancia médica han derivado casi exclusivamente de modificación química de la molécula de penicilina y, en menor grado, de la de cefalosporina; más recientemente, también se han hecho modificaciones a la molécula de cefamicina C, producida por *Streptomyces* (Lund & Tybring, 1972; Smith, 1985). Nuevos antibióticos β-lactámicos que no son ni penicilinas ni cefalosporinas son formados por procaricinas; estos compuestos incluyen nocardicinas, ácido clavulánico, carbapenemas y monobactamas (Demain, 1973).

La penicilina y cefalosporina C son producto de rutas biosintéticas que tienen en común varios pasos enzimáticos idénticos (Esquema 2) (Demain, 1974) y están relacionadas con la biosíntesis de los aminoácidos valina, cisteína y ácido α-aminoadípico.

Inicialmente se forma el dipéptido δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteína (AC), con la adición subsecuente de L-valina, la cual sufre epimerización durante su incorporación. De esta manera se forma el tripéptido δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) (Adriaens, *et al.*, 1976; Banko *et al.*, 1987). Esta reacción parece ser realizada por la enzima ACV sintetasa (Banko *et al.*, 1987). Una primera penicilina de la vía (isopenicilina N) es sintetizada a partir de ACV, a través de la acción de un ion ferroso y una enzima ciclizante (isopenicilina N sintetasa o ciclasa) que requiere ascorbato (Adriaens, *et al.*, 1976). Ramos *et al.* (1985) encontraron que la enzima tiene un peso molecular de 39,000 daltons y que su actividad es estimulada por oxígeno. Sugirieron que la ciclización se realiza por una eliminación, mediada por oxígeno, de los átomos de hidrógeno del ACV durante la formación de los anillos. Se piensa que la formación del anillo β-lactámico se forma antes que el tiazolidínico (Baldwin *et al.*, 1984).

En el último paso de la biosíntesis de penicilina, la cadena lateral (ácido α-aminoadípico) de la isopenicilina N es intercambiada por ácido fenilacético (previamente activado en la forma de fenil acetil CoA), dando origen a la penicilina G. La reacción es catalizada por la enzima aciltransferasa, la cual ya ha sido aislada de

P. chrysogenum y caracterizada (Alvarez *et al.*, 1987). Debido a la relativa inespecificidad del complejo enzimático por la cadena lateral, muchos son los compuestos que pueden actuar como precursores de esta cadena, dando lugar a una gran variedad de penicilinas (Demain, 1983).



Esquema 2. Rutas biosintéticas de L-lisina, penicilina G y cefalosporina en hongos.

2.2 Regulación

Varios mecanismos parecen estar involucrados en el control de la iniciación de la biosíntesis de antibióticos. En un modelo, una molécula pequeña actúa como correpresor o inhibidor, reprimiendo la formación o inhibiendo la actividad de las sintetetas. Por lo tanto, el hipotético correpresor o inhibidor debe agotarse para que la síntesis del antibiótico pueda ocurrir. Este modelo concuerda con alguna evidencia experimental.

Un segundo modelo, propone la síntesis de un activador o inductor de las enzimas por el cultivo para poder iniciar la síntesis del antibiótico.

Represión catabólica

La glucosa es la mejor fuente de carbono y energía para el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos productores de antibióticos. En un medio con glucosa y una segunda fuente de carbono de utilización más lenta, la glucosa es utilizada primero, suprimiendo la síntesis del antibiótico. Cuando se agota la glucosa (o su concentración cae por debajo de un umbral represivo) la segunda fuente de carbono es usada y la formación del antibiótico se lleva a cabo (Martín & Demain, 1980).

Este fenómeno, que es similar al inicialmente llamado "efecto de la glucosa", es ahora entendido en términos de regulación catabólica o regulación por catabolito del carbono (Martín & Aharonowitz, 1983). Aunque el mecanismo molecular de la represión catabólica no se conoce, algunos autores consideran que podría estar relacionado con un control de la biosíntesis de antibióticos ejercido por la velocidad de crecimiento (Bu'Lock, 1974; Martín & Demain, 1978).

La regulación catabólica de la biosíntesis de antibióticos es un mecanismo general que controla la síntesis de antibióticos de diferentes grupos biosintéticos. Estos incluyen la producción de actinomicina por *Streptomyces antibioticus* (Gallo & Katz, 1972), puromicina por *Streptomyces alboniger* (Sankaran & Pogell, 1975), cefalosporina por *Acremonium chrysogenum* (Zanca & Martín, 1983) y *Streptomyces clavuligerus* (Aharonowitz & Demain, 1978) y penicilina por *Penicillium chrysogenum* (Revilla et al., 1984).

Estudios iniciales sobre desarrollo de medios para la producción de penicilina indicaron que los di- oligo- y polisacáridos eran mejor fuente de carbono para la producción de penicilina (Soltero & Johnson, 1953). La producción industrial es por lo tanto realizada usando lactosa, la cual es asimilada lentamente. La regulación catabólica de la síntesis de penicilina es evitada cuando la glucosa es lentamente adicionada al cultivo (Soltero & Johnson, 1954). Estos resultados sugirieron que la regulación catabólica es ejercida por un efector formado durante el transporte o el catabolismo de glucosa.

Aunque los primeros trabajos sugirieron que la biosíntesis de penicilina esta sujeta a inhibición catabólica y no a represión (Demain, 1968), estas conclusiones están basadas en inhibición de la síntesis de antibióticos después de adicionar glucosa a un cultivo en producción. Como los experimentos eran largos, la interferencia con la síntesis pudo deberse a otras causas como la represión de sintetetas lábiles. Estudios más profundos y cuidadosos, utilizando experimentos de corta duración (principalmente cultivos de

células en reposo e incorporación de ^{14}C -valina a la penicilina), han descubierto que el fenómeno es a nivel de represión (Revilla *et al.*, 1984). También se ha encontrado que la glucosa reprime la formación de δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV), el primer intermediario de las rutas biosintéticas de penicilina y cefalosporina. La represión de la ACV sintetasa no es revertida por la adición de los aminoácidos que constituyen el tripéptido. La D-glucosa también reprime la isopenicilina-N-sintetasa (ciclasa), la cual convierte el tripéptido ACV en isopenicilina-N, pero no afecta la acil Co A:ácido 6-aminopenicilánico aciltransferasas (aciltransferasa) (Revilla *et al.*, 1986), última enzima de la vía (Alvarez *et al.* 1987).

Se piensa que el mecanismo molecular de la regulación catabólica o por catabolito del carbono puede estar relacionado con la represión catabólica que ejerce la glucosa y otras fuentes de carbono de rápida asimilación sobre las enzimas requeridas para la utilización de fuentes de carbono exógenas como maltosa, lactosa o sacarosa y algunas enzimas glucogénicas. Barredo *et al.* (1988) aislaron una mutante resistente a 2-desoxiglucosa que estaba simultáneamente alterada en la represión catabólica de la β -galactosidasa, la isopenicilina-N-sintetasa (IPN sintetasa) y la biosíntesis de penicilina en general. Estos resultados apoyan la hipótesis de que hay un mecanismo común en *P. chrysogenum* que está involucrado en la represión catabólica por glucosa de: a) enzimas catabólicas para la utilización de azúcares y; b) enzimas de las vías biosintéticas de antibióticos. Su evidencia experimental sugiere que el mecanismo molecular podría involucrar a la glucoquinasa como efector.

Recientemente, Espeso & Peñalva (1992) encontraron que, en *Aspergillus nidulans*, la síntesis de penicilina también es controlada por represión catabólica. Con sofisticados experimentos los autores demostraron que la biosíntesis del antibiótico también es regulada por represión catabólica a través del control transcripcional de los genes estructurales. Los autores realizan análisis de Northern con RNA total y una sonda de IPN sintetasa. Así demuestran que la cantidad de transcritos de IPN sintetasa es varias veces más alta en cultivos crecidos en lactosa que en sacarosa. Probaron varias mutaciones hipofuncionales del gen *creA* (el gen regulatorio que media la represión catabólica del catabolismo de azúcares en *A. nidulans*; la mayor parte de las mutaciones que afectan la represión catabólica mapean en este gen), las cuales desreprimieron sólo parcialmente la transcripción de la IPN sintetasa en presencia de glucosa.

Muy recientemente un grupo austríaco (Ontiveros, 1993) clonó el gen de la IPN sintetasa de *P. chrysogenum* Q-176 en un plásmido y fusionó el promotor con una sección del gen estructural al gen *lac Z*. Posteriormente hicieron deleciones de diferente tamaño en la región 5' del promotor y transformaron su cepa. Seleccionaron transformantes con una sola copia del gen y con diferentes tamaños de promotor y probaron actividad de β -galactosidasa en condiciones represivas. Una de sus cepas recombinantes, en la que el promotor comenzaba con la región -357, resultó desregulada para represión catabólica.

Por otro lado, el grupo de Scazzocchio en Francia (resultados no publicados) encontró que el sitio de unión al DNA de la proteína regulatoria (negativa) producto del gen *creA* tiene la secuencia GCGGGG. Resulta entonces muy significativo que esta

secuencia esté presente en la región eliminada en la recombinante desregulada mencionada anteriormente.

Estos resultados sugieren fuertemente que la represión catabólica que regula la producción de penicilina y de otros antibióticos sea un caso del mecanismo general que regula las enzimas catabólicas para la utilización de azúcares.

Regulación por nitrógeno

Un intermediario común de los antibióticos β -lactámicos es el tripéptido ACV (α -aminoadipato-cisteinil-valina), de manera que se esperaría que la regulación de la disponibilidad de nitrógeno-amino tenga un papel importante en la síntesis de estos antibióticos. De hecho, Aharonowitz & Demain (1979) demostraron que la síntesis de cefamicinas por *Streptomyces clavuligerus* está controlada por el tipo y la disponibilidad de fuente de nitrógeno.

Sánchez *et al.* (1988) revisaron el tema de la regulación por nitrógeno de la síntesis de β -lactámicos y la dividieron, en el caso de la penicilina, en inducción por glutamato y represión por amonio. También examinaron el efecto estimulatorio del ácido α -aminoadípico y la inhibición (represión) causada por lisina y la que ocasiona el glutatión. Los autores dan un panorama amplio, intentando integrar los estudios sobre fuentes de nitrógeno de utilización rápida y de aminoácidos sobre la producción del antibiótico. Sin embargo, es importante recordar que los mecanismos más importantes son la regulación por amonio y la retrorregulación por lisina.

Regulación por amonio

Aunque se le suele llamar represión por amonio, es importante notar que se hace referencia, como en el caso de la glucosa, a un mecanismo más general en el que el amonio afecta negativamente la síntesis de enzimas involucradas con la utilización de diversas fuentes de nitrógeno.

En el caso de la penicilina, en 1981 Sánchez *et al.* descubrieron que a concentraciones de amonio de 85 mM la síntesis de penicilina es severamente reducida, en relación a un medio con 8.5 mM, y sin afectar similarmente o significativamente el crecimiento y el pH. En este estudio se utilizó un medio definido y el cultivo se siguió hasta las 96 h. La cinética de consumo de amonio indicó que cuando se utilizó baja concentración el amonio fue totalmente consumido, mientras que con alta concentración se consumió una pequeña parte del amonio inicial. Posteriormente, el mismo grupo encontró que con alta concentración de amonio en el medio de cultivo, se incrementa la poza metabólica de glutamato, pero deprime parcialmente la NADP-glutamato deshidrogenasa y sobre todo la glutamino sintetasa (Mateos *et al.*, 1990).

Por otro lado, se ha demostrado que la síntesis de cefalosporina C, por *Acremonium chrysogenum*, responde de manera similar al amonio (Shen *et al.*, 1984). En este caso se ha encontrado que el amonio reprime la deacetoxicefalosporina C sintetasa, disminuyendo también el nivel de la ACV sintetasa (Zhang *et al.*, 1987).

En el caso de la síntesis de penicilina por *P. chrysogenum* no se ha determinado el sitio de regulación a nivel enzimático y en ninguno de los dos casos se conoce el efector. Evidencia encontrada en mutantes de *S. cerevisiae* y *A. nidulans* (*gdhA*) sugiere que la

enzima NADP-glutamato deshidrogenas es el efector del mecanismo general de represión por amonio antes mencionado. No se sabe si este fenómeno puede extenderse a la regulación de antibióticos β -lactámicos, aunque existe una cierta evidencia indirecta que sugiere que la NADP-glutamato deshidrogenasa y quizás la glutamino sintetasa están involucradas (Sanchez *et al.*, 1988).

Regulación por lisina

En 1957, Demain descubrió que la presencia de lisina en el medio de cultivo inhibe la producción de penicilina por *P. chrysogenum*. El mismo grupo (Somerson *et al.*, 1961) encontró que la presencia de α -aminoadipato restaura la producción del antibiótico en presencia de lisina. La elucidación de la ruta de del α -aminoadipato en la biosíntesis de lisina en hongos sugería una conexión entre ambos compuestos, por lo que, en este trabajo, se propuso que la inhibición de la producción podía ser causada por una retroregulación, es decir una regulación por producto ejercida por la lisina misma, disminuyendo la disponibilidad de α -aminoadipato para la producción de penicilina. Posteriormente, los estudios de Goulden & Chataway (1968) hicieron observaciones que apoyaban la hipótesis, usando un mutante con un bloqueo tardío, en la que la acumulación de α -aminoadipato guardaba una relación inversa con la concentración de lisina en el medio. Más tarde, el grupo de Demain (Masurekar & Demain; 1972; Friederich & Demain, 1977) demostró que la homocitrato sintetasa era inhibida y reprimida por la lisina. Luengo *et al.*, 1980 encontraron que la lisina reprime la síntesis de homocitrato sintetasa de *P. chrysogenum* tanto en cepas de baja como de alta producción.

Retroregulación por penicilina

Se ha encontrado que varios antibióticos inhiben su propia síntesis. En algunos casos ha sido posible demostrar que el antibiótico inhibe sus propias sintetetasas (Martín & Demain, 1980). Gordee y Day (1972) reportaron que la adición de penicilina V, en cualquier momento del cultivo, inhibe la posterior acumulación de penicilina V en el caldo, aunque no afecta el crecimiento. También la penicilina G, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y algunas penicilinas semisintéticas mostraron este efecto. Observaron que el nivel de penicilina necesario para inhibir la síntesis de una cepa particular es similar al nivel de producción de la cepa. Posteriormente, Revilla *et al.* (1978) confirmaron estos resultados, determinando la incorporación de valina marcada a la penicilina en experimentos cortos con un sistema de células en reposo. Sin embargo, estos autores demostraron que la penicilina inhibe su propia síntesis si se adiciona al tiempo de inoculación, pero tiene menos efecto o nada si se adiciona después. Aparentemente, esto está relacionado con la disminución de la permeabilidad del micelio a la penicilina exógena (Martín *et al.*, 1979).

2.3 Producción

El proceso típico de producción de penicilina consiste en una reacción biológica en lote, en la cual *P. chrysogenum* es inoculado a un medio líquido en un tanque de fermentación aireado y agitado con capacidad de 50 a 200 mil litros. Los ingredientes del medio son a

menudo subproductos complejos y heterogéneos de otros procesos industriales. No hay una receta única para el medio. Los diferentes productores han optimizado su propio medio y además, es necesario volverlo a optimizar para cada nueva mutante sobreproductora que alcanza escala de producción. Formulaciones típicas incluyen glucosa o melazas (por alimentación continua), sólidos de agua de cocimiento de maíz, manteca de cerdo o aceite vegetal como antiespumante (por alimentación continua) y precursor como fenilacetato. En algunos casos los medios son suplementados con sales inorgánicas. El agua de cocimiento de maíz ha comprobado ser una valiosa fuente de nitrógeno orgánico y elementos traza. Otras fuentes útiles de nitrógeno orgánico son harina de semilla de algodón (pharmamedia), harina de cacahuate y sulfato de amonio. La mayor parte de los procesos de fermentación utilizan temperaturas de 25 a 30 °C en dos fases de operación ((Queener & Swartz, 1979)). La primera fase es el desarrollo de inoculo (fase de crecimiento) y ocurre secuencialmente en una serie de reactores agitados de tamaños crecientes. La segunda fase es la de producción y se realiza en un solo tanque agitado de gran tamaño (Demain, 1974). Los niveles máximos de producción son alcanzados en este reactor en seis a ocho días de fermentación.

3. Fermentación en medio sólido

3.1 Generalidades

La fermentación en medio sólido ha sido empleada desde la antigüedad para la preparación de alimentos fermentados, el ensilaje y el composteo. El uso del koji para salsa de soya data de 1000 años A.C. y puede ser considerado como un prototipo de fermentación sólida (FS). Este consiste en cultivar *Aspergillus oryzae* en granos y soya para producir proteasas y amilasas, las cuales degradan las proteínas y convierten el almidón en azúcar. De esta manera, el material fermentado se utiliza para la producción de salsa de soya o para la producción posterior de vino de arroz o saké.

A partir de los años cuarenta, la FS fue reemplazada por la fermentación sumergida (FSm) en los países occidentales. Los trabajos de Hesseltine *et al.* (1972, 1977a, 1977b) estudiaron y describieron los procesos tradicionales de FS en Oriente e informaron de la importancia tecnológica de estos sistemas de cultivo. Es probable que estos trabajos sean, en gran parte, responsables del repunte en el interés por la FS que se ha observado en los últimos diez ó quince años. Es importante notar que los procesos de manufactura de alimentos orientales tradicionales tipo koji están bien establecidos en Oriente (principalmente Japón) y que pueden tener ventajas significativas sobre los métodos de cultivo sumergido para la manufactura de productos no tradicionales de interés para las industrias agropecuaria, de alimentos, farmacéuticas y químicas. También es un campo prometedor en el frente de tratamiento de desechos sólidos.

3.2 Definición

El término "fermentación sólida" (o semisólida), especie de traducción del inglés "solid state fermentation", es definido por Hesseltine (1972) como una fermentación en la que el sustrato no es líquido". Posteriormente, diferentes autores la describen como el crecimiento y el metabolismo de microorganismos sobre materiales sólidos (con una

estructura organizada) en la ausencia de líquido en forma libre (Raimbault, 1980; Moo-Young *et al.*, 1983). Para Aidoo *et al.* (1982), la FS engloba todo cultivo que tiene lugar sobre un sustrato sólido o un soporte nutricionalmente inerte. Una definición más amplia y conveniente es la propuesta por Lonsane *et al.* (1985), como un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y al interior de una matriz sólida y en ausencia de escurrimiento de líquido. La matriz porosa puede ser un sustrato húmedo o un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes disueltos en una solución.

De esta manera, se pueden distinguir dos tipos de FS en función de la naturaleza de la fase sólida utilizada:

1) Cultivo sólido con una fase sustrato-soporte. La fase sólida esta constituida de un material que asume simultáneamente la función de soporte y de fuente de nutrientes. Este material es generalmente amiláceo o lignocelulósico (aunque puede ser también protéico como en los queso y la keratina que forma las plumas. La mayor parte de las aplicaciones de la FS utiliza este sistema.

2) Cultivo sólido con un soporte impregnado de un medio líquido. En este tipo de fermentaciones, la fase sólida esta considerada como un soporte inerte que sirve de reservorio de una solución nutritiva. En la FS en general y en este tipo en particular la capacidad de retención de agua es un factor importante en la elección del soporte. Los materiales utilizados son diversos (por ejemplo: bagacillo de caña de azúcar, aserrín de madera, esponja, poliuretano, resinas sintéticas y vermiculita). Este sistema ha sido descrito como de cuatro fases (soporte insoluble, agua, biomasa y aire) por Villegas *et al.* (1993).

3.3 Ventajas y Desventajas

La FS y la FSm han sido comparadas por algunos autores (Mudgett, 1986; Hesseltine, 1987; Lonsane *et al.*, 1985).

Las ventajas incluyen:

- * Simplicidad del medio de cultivo, a menudo es suficiente con adicionar agua.
- * Disminución de contaminaciones debido a la baja humedad del medio.
- * Requieren menor energía de proceso que las correspondientes en FSm.
- * Muchas veces utilización directa de sólidos fermentados.
- * Disminución de efluentes líquidos a tratar si el producto se utiliza directamente o el producto se obtiene más concentrado.
- * Condiciones de cultivo cercanas a las de sus habitat naturales para hongos y actinomicetos.
- * Para las fermentaciones tradicionales la microflora del soporte sirve como inóculo.
- * Aireación fácil debida a la porosidad del material.
- * Volumen menor del fermentador que en el cultivo líquido, a cantidades iguales de sustrato.
- * En muchos casos se obtiene más producción.

Las desventajas:

- * Problemas de disipación de calor
- * Regulación difícil de los parámetros de cultivo como pH
- * Falta de conocimientos básicos y tecnológicos
- * Falta de sensores y métodos eficientes de manejo de sólidos.
- * Difícil adicionar nutrientes y agentes controladores.

3.4 Tipos de Microorganismos

Varios grupos de microorganismos son capaces de crecer en sustratos sólidos (Smith, 1985). Sin embargo, los hongos filamentosos tienen la mejor capacidad para crecer en ausencia de agua libre. Bacterias y levaduras crecen en sustratos sólidos con 40 a 70 % de humedad, como en composteo y ensilado. Además, los hongos presentan la ventaja adicional de invadir el soporte o sustrato sólido gracias al crecimiento apical y ramificaciones. Lo anterior, ligado a la geometría del sustrato utilizado permite un crecimiento orientado en todas las direcciones (incluyendo cierta penetración) de espacios libres, permitiendo el aprovisionamiento de nutrientes (Raimbault, 1980). Las levaduras y bacterias sólo pueden desarrollarse en la superficie y al interior de las cavidades de la matriz sólida (Saucedo-Castañeda, 1991).

Como se mencionó anteriormente, en la práctica, los sustratos más comunes para procesos de FS son materiales amiláceos como granos y tubérculos, y lignocelulósicos como madera, paja y heno. Hongos de las Clases Phycomyces, Ascomycetes y Deuteromycetes han encontrado importancia práctica convirtiendo el almidón en azúcar. En particular varias especies de *Rhizopus*, *Mucor* y especialmente *Aspergillus* han sido utilizadas para producir biomasa, enzimas y micotoxinas.

Aunque muchos microorganismos producen celulasas, muy pocos pueden degradar lignocelulosa. Esto es importante no sólo para la producción de biomasa y/o enzimas a partir de estos materiales, sino como un medio para reciclar desechos y remediar problemas de contaminación. Entre las bacterias que degradan la celulosa destaca *Cellulomonas* y entre los hongos las Clases Ascomycetes y Basidiomycetes. Los mejores convertidores de celulosa en procesos de FS son especies de *Trichoderma* y de *Chaetomium*. Entre los *Basidiomycetes* los llamados hongos "white rot" atacan tanto la lignina como la celulosa. También los hongos comestibles de esta Clase crecen bien en material lignocelulósico mezclado con estiercol (Moo-Young *et al.*, 1983).

En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos de investigación sobre procesos de FS que utilizan una gran variedad de microorganismos. Pandey (1992) hace una relación de productos, microorganismos y sustratos utilizados. En esta relación se pueden contar 27 géneros diferentes de hongos, 2 de bacterias (*Bacillus* y *Streptomyces*) y 3 de levaduras (*Saccharomyces*, *Pichia* y *Candida*).

3.5 Aplicaciones

En la naturaleza los sustratos sólidos, como residuos vegetales y animales, son degradados por varios procesos microbianos. En esas condiciones, una sucesión de colonizaciones microbianas es el proceso típico como en el ensilaje y el composteo.

Las aplicaciones de la FS se pueden dividir en aquellas que se realizan con la flora natural como se puede hacer el composteo y el ensilaje, y aquellas en las que se usan

cultivos puros como en el procesos tipo koji. El uso de cultivos puros mejora el control sobre la utilización del sustrato y sobre todo sobre la formación de productos.

Numerosas fermentaciones alimentarias y agrícolas basadas en este principio son practicadas tradicionalmente en el mundo entero. La diversidad de aplicaciones industriales (actuales y potenciales) hacen que vayan apareciendo un gran número de campos de aplicación. En la Tabla 1 se dan ejemplos de procesos de FS clasificados en 11 campos de aplicación.

Campo de Aplicación	Producto	Microorganismo	Referencia
Alimentos Fermentados	Quesos Koji Pozol Pan Cacao	<i>Penicillium spp</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Lactobacillus spp</i> y levaduras Levaduras y <i>Acetobacter spp</i>	Larroche & Gros, 1989 Raimbault, 1980 Saucedo-Castañeda, 1987 Sánchez, 1983
Alimentos Fermentados Enriquecidos en Proteínas	A partir de fibras A partir de material amiláceo	<i>Aspergillus terreus</i> <i>A. niger</i>	González-Blanco <i>et al.</i> , 1990; Raimbault, 1980.
Producción de Enzimas	Amilasas Proteasas Celulasas Pectinasas	<i>Aspergillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Trichoderma</i> <i>Aspergillus</i>	Oriol <i>et al.</i> , 1986a Fukushima, 1982 Roussos, 1985 DuFour, 1990
Metabolitos Primarios	Ac. Cítrico Ac. Gálico Ac. Glucónico	<i>A. niger</i> <i>A. niger</i> <i>A. niger</i>	Hang & Woodadams, 1987 Raimbault, 1980
Metabolitos Secundarios	Micotoxinas	<i>A. flavus</i> y otros	Hesseltine, 1977
Producción de Alcohol	Etanol	<i>Saccharomyces spp</i>	Gibbons & Wetsby, 1988a
Producción de Esporas	Inóculo Lucha Biológica	<i>Penicillium spp</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	Laroché <i>et al.</i> , 1986 Roussos, 1985
Composteo	Composta	Flora mixta	Aidoo <i>et al.</i> , 1982
Ensilaje	Ensilado	<i>Lactobacillus spp</i>	Saucedo-Castañeda <i>et al.</i> , 1990a,c
Hongos Superiores (Macromicetos)	<i>Pleurotus</i>	<i>Pleurotus spp</i>	Zadrazil, 1975
Filtros Biológicos	Aguas tratadas	Flora mixta	Aidoo, <i>et al.</i> , 1982

Tabla 1 Campos de aplicación de la FS.

3.6 Aspectos Fisiológicos y Control del Metabolismo y del Crecimiento en Fermentación Sólida

3.6.1 Patrones de Crecimiento

Los hongos filamentosos crecen de manera diferente en cultivos líquidos sumergidos que en FS. En un típico fermentador agitado el hongo se multiplica por fragmentación del micelio. Bajo ciertas condiciones el micelio se enreda para formar esferas conocidas como "pellets", en las cuales el crecimiento apical prevalece en la superficie exterior. En una superficie de dos dimensiones, como una placa de agar, el hongo crece por extensión apical, de manera radial hacia un gradiente creciente de concentración. El crecimiento es lineal y depende del ancho de la zona periférica de crecimiento donde el crecimiento de la hifa es exponencial y parecido a las tasas de crecimiento específico ($0.11 - 0.15 \text{ h}^{-1}$) observados en cultivos líquidos (Trinci, 1971a,b).

En la mayor parte de las FSs, los materiales naturales forman una superficie compleja y de muchas caras que se resiste a una caracterización sencilla en cuanto a patrón y velocidad de crecimiento. El crecimiento también se caracteriza por extensión radial de la hifa en la superficie de la matriz sólida, pero la dirección y velocidad del crecimiento depende de la disponibilidad de nutrientes y la configuración geométrica de la matriz.

La adhesión a la superficie juega un papel importante en el crecimiento y distribución del micelio. Muchos hongos filamentosos y levaduras secretan polisacáridos con propiedades adhesivas (Corpe, 1980)

Una característica adicional en los cultivos de hongos es que los componentes celulares de un micelio o incluso de una sola hifa se encuentran en diferente estado fisiológico. La punta de la hifa contiene células jóvenes que se encuentran en la fase exponencial de crecimiento, mientras que las partes que no crecen contienen células con un metabolismo lento o aún células muertas (Moo-Young, *et al.*, 1983).

3.6.2 Aspectos Fisiológicos

Los efectos fisiológicos del ambiente acuoso sobre la formación de biomasa y de productos por hongos filamentosos ha sido han sido intensamente estudiados en cultivo líquido sumergido (Berry *et al.*, 1975; Bull & Bushnell, 1976). Sin embargo, hay poca información disponible sobre el efecto del ambiente sólido sobre los microorganismo en FS. Presumiblemente, estos efectos son similares a los de cultivo sumergido, modificados por la composición química y estructura física de los sustratos y por variaciones locales de temperatura, pH y concentración de nutrientes y gases disueltos (Mudgett, 1986).

Desde el punto de vista aplicado, la pregunta que surge es: ¿cuáles son las variables de proceso, en FS, que controlan el crecimiento y el metabolismo microbiano?

Moo-Young *et al.* (1983) indican que, en la práctica, las FS se controlan con:

- 1) la aireación y el mezclado,
- 2) el tamaño de partícula,
- 3) los nutrientes y
- 4) los factores ambientales: * humedad,

- * la temperatura y
- * el pH.

Mudget (1986) sugiere las mismas variables de proceso y considera adicionalmente:

5) la densidad de inóculo.

En realidad estos son los mismos parámetros que se controlan en FSm (excepto la humedad y el tamaño de partícula). Sin embargo, esto no indica que se conozca bien su efecto en los cultivos sólidos, sino más bien el hecho de que se aplican directamente los conceptos de FSm.

3.6.3 Efecto de los Factores Físicos

3.6.3.1 Importancia de la Cantidad y de la Actividad del Agua

En FS la capacidad de retención de agua del soporte determina la cantidad máxima de líquido presente en la fase sólida. Según Doelle (1985) la necesidad de agua de un microorganismo puede expresarse cuantitativamente refiriéndose a la actividad de agua (Aw). El valor de este parámetro es de 1 para el agua pura y disminuye con la concentración de soluto(s) (también con el número de iones formados y coeficiente osmótico molar de éste). La Aw se determina y define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el medio. En general, se puede decir que el crecimiento microbiano se puede dar en valores de Aw entre 0.6 y 0.99.

El agua en materiales biológicos existe generalmente en tres estados, que pueden determinarse por medidas de isoterma de adsorción en las cuales el sólido absorbe o desorbe vapor de agua en equilibrio con la humedad relativa (actividad de agua) de la fase gaseosa. En una región monomolecular en la superficie, el agua está fuertemente unida a las superficies sólidas (5-10% de humedad en materiales agrícolas). En una región multicapa, más allá de la monocapa, el agua está menos fuertemente unida en capas sucesivas con estados progresivamente descendientes de energía. Después de la multicapa, el agua libre existe en una región de condensación capilar.

La línea divisoria entre las últimas dos capas ha sido estimada por medidas eléctricas en sustratos agrícolas amiláceos. La línea fue definida por un contenido de humedad de 25 a 30% y una actividad de agua de 0.80 a 0.85, el límite inferior para el crecimiento microbiano (excepto para algunos microorganismos halófilos y osmófilos).

El agua interviene en la constitución de los microorganismos, y en FS también en la difusión de enzimas, nutrientes y productos a través de la matriz sólida (Oriol, 1987). Es importante notar que el agua libre no debe ser demasiado abundante para no reducir la porosidad del material y en consecuencia disminuir el intercambio gaseoso. Por otro lado, se producen cambios en la humedad en el curso de la fermentación. Estos cambios son debidos a la evaporación y a la producción de agua por el metabolismo.

Dada la importancia de la humedad del medio y la Aw en FS, varios autores han realizado estudios sobre estos dos parámetros.

Oriol *et al.* (1988a) realizaron estimaciones sobre el agua total, el agua consumida y el agua residual en FS de harina de yuca (amiláceo). Un cálculo teórico, basado en la ecuación de Ross, indicó que la actividad de agua del sustrato descendió a 0.85 al final

del cultivo. Los autores interpretaron esto como la causa por la que el crecimiento se detuvo.

Por otro lado, Sato *et al.* (1983) desarrollaron un modelo matemático para estudiar el crecimiento de de micorganismos en FS utilizando como soporte pulpa de madera impregnada de medio de cultivo. Los resultados con *Candida lipolitica* mostraron el aumento de la velocidad específica de crecimiento está directamente ligado al aumento de la humedad del medio de cultivo así como a la humedad relativa del aire que pasa a través del fermentador.

Oriol *et al.* (1988b) realizaron estudios con *A.niger* en FS usando bagacillo de caña con medio absorbido. Los autores encontraron que al variar la humedad inicial entre 40 y 75 %, pero manteniendo constante la A_w (0.97) no se modificó μ (0.4 h^{-1}). Sin embargo, al modificar A_w (y la humedad inicial) entre 0.9 y 0.986 con diferentes concentraciones de glucosa, la velocidad específica de crecimiento varió entre 0.19 y 0.54 h^{-1} . Claro que la cantidad de biomasa generada fue mayor en los medios más concentrados, sin embargo, el rendimiento $Y_{x/s}$ no se modificó apreciablemente. El impacto más importante fue sobre el tiempo de germinación, el cual varió entre 5 y 20 h.

3.6.3.2 Tamaño de Partícula

Generalmente se considera que los tamaños de partícula pequeños proveen una gran área superficial para la transferencia de calor e intercambio de gases. Esto también resulta en mayores concentraciones superficiales de nutrientes y vías más cortas para la difusión de éstos, tanto en la superficie como en los poros del sustrato (Mudget, 1986). Por otro lado, un tamaño de partículas menor resulta en una mayor densidad de empaque y en una concomitante reducción del espacio vacío entre partículas, lo cual tiende a reducir el área de transferencia de calor e intercambio de gases con la atmósfera circundante, a menos que haya mezclado en el proceso. Se puede pensar que habría un límite inferior en el que la transferencia de calor y de gases limitaría el proceso, y un límite superior en el que la transferencia de nutrientes sería limitante.

Aparte de estos aspectos teóricos, el tamaño de partícula ha sido sugerido por Hesseltine (1977a,b) como una de las variables de proceso principales para el desarrollo de un proceso de FS.

3.6.3.3 Efecto del Ambiente Gaseoso

Las presiones parciales de CO_2 y O_2 (p_{CO_2} y p_{O_2}) del ambiente gaseoso de una FS son factores importantes para el crecimiento y la formación de producto (o el desarrollo). El O_2 debe ser suficiente para no limitar el crecimiento. Esto depende del flujo de gas en la masa de producto, la velocidad de transporte del O_2 en el medio y de la velocidad de consumo de por los microorganismos (Raimbault, 1980).

Para Moo-Young *et al.* (1983) la transferencia de gas puede ser efectuada por los siguientes mecanismos.

* La transferencia interpartícula relacionada con el intercambio de gases y humedad (masa) y calor entre la atmósfera del espacio vacío inter-partícula (o porosidad) y el sólido. Esta porosidad es función tanto de la naturaleza del material

utilizado como de la cantidad de líquido absorbido y del grado de desarrollo del cultivo (Auria *et al.*, 1993).

* La transferencia intrapartícula relacionada con la difusión de O_2 y CO_2 (en general materia y energía) entre la interfase sólido-gas y el interior de la matriz sólida.

En FS, la aireación es un factor que asegura diferentes funciones.

- a) el aprovisionamiento de O_2 para el crecimiento aerobio y metabolismo,
- b) la regulación de la temperatura,
- c) eliminación de CO_2 y ciertos metabolitos volátiles.

Varios autores han puesto en evidencia el efecto de la composición en CO_2 y O_2 sobre el metabolismo microbiano cultivado en FS. Bajracharya & Mudget (1980) encontraron que el crecimiento de *Aspergillus oryzae* era insensible a pO_2 , pero sensible al pCO_2 . Ulmer *et al.* (1981) encontraron que la producción de biomasa por *Chaetomium cellulolyticum* en FS de fibras de estiércol no estaba limitada por oxígeno sino que dependía de la ventilación del CO_2 . Una alta pCO_2 también deprimió la producción de amilasas en FS de arroz, pero observaron efectos positivos por una alta pO_2 sobre la producción de amilasas (Bajracharya & Mudget, 1980). Una aireación mayor estimuló la producción de α -glucosidasa e invertasa en FS de salvado de trigo con *Aspergillus awamori* (Silman, 1980).

Por otro lado, Narahara *et al.* (1982) obtuvieron mejores rendimientos de enzima con una baja pCO_2 (2-5%).

Para controlar el ambiente gaseoso de las FSs se utiliza la aireación y el mezclado. Sin embargo, muchas FSs son sensibles al corte y no pueden ser agitadas vigorosamente o, en algunos casos, no es posible mezclarlas. Esto es especialmente importante en fases tempranas del cultivo (Underkofler *et al.*, 1947). La sensibilidad al mezclado es atribuida a la ruptura del contacto sustrato micelio, particularmente para organismos con enzimas unidas al micelio para la hidrólisis de polímeros sólidos.

Sin embargo, el mezclado en agitadoras de matraces ("shakers"), o en reactores rotatorios con circulación de aire precondicionado es usado en algunos procesos para enzimas (Toyama, 1976) y ha sido particularmente útil en producción de micotoxinas (Hesseltine, 1977; Knapp & Howell, 1980; Silman, 1980).

3.6.3.4 Temperatura

En FS la generación de calor por la actividad metabólica de los microorganismos puede provocar una elevación de la temperatura en el fermentador y plantear un serio problema. (Hesseltine, 1987). Esto se debe a la elevada concentración local de sustrato y de microorganismos, al bajo contenido de agua, complicado con la ausencia de mezclado en FSs estáticas así como a la débil conductividad térmica de los materiales biológicos (Moo-Young, *et al.*, 1983; Grajek, 1988; Bastrow *et al.*, 1988; Saucedo-Castañeda, 1991).

Con el objeto de resolver el problema, varios autores han establecido estrategias para la regulación de la temperatura. La mayor parte de ellas usan una convección forzada de aire a través del fermentador. Otros han utilizado las propiedades refrigerantes de la

evaporación del agua para controlar automáticamente la humedad y la temperatura (Gervais & Bazeline, 1986; Bastrow *et al.*, 1988; Durand & Cherow, 1988; Saucedo-Castañeda, 1991).

3.6.3.5 pH

El pH global de la fase líquida de una FS puede ser considerablemente diferente de los niveles locales de pH en la superficies sólidas cerca de las cuales ocurre la mayor parte de la actividad biológica, debido a efectos de carga superficial y equilibrio iónico modificado por efectos de transporte de solutos (Mudgett, 1986). aunque no hay un procedimiento estándar para medir el pH, un procedimiento general es determinar el pH global después de suspender una muestra en un volumen de agua 10 veces mayor (Oriol, 1987).

3.6.4 Efecto de los Factores Nutricionales

Los factores nutricionales son usualmente limitantes en el crecimiento de los microorganismos (Rhigelato, 1975). En materiales sólidos esta limitación es mucho más severa debido a las limitadas tasas de difusión del sustrato y del limitado acceso del hongo a éste.

En realidad, hay una gran falta de estudios sobre este tema, seguramente debido a que la mayor parte de los procesos estudiados se realizan en sistemas donde el sustrato y el soporte son el mismo. La mayor parte de estos materiales son amiláceos como granos y raíces; o lignocelulósicos como paja y madera. De esta manera, el medio es ya adecuado para el crecimiento o se balancea con fuentes de nitrógeno y fósforo. Moo-Young *et al.* (1983) consideran que el amplio rangos de relaciones C/N óptimas en diferentes procesos de FS indica que la disponibilidad de la fuente de carbono o nitrógeno puede ser más importante que la relación en sí. También que los altos valores C/N utilizados, junto con bajas tasas específicas de crecimiento sugieren una reutilización del nitrógeno por procesos autolíticos.

En FS de yuca con *A.niger* se encontró una concentración crítica de nitrógeno (0.75%), por arriba de la cual el crecimiento declinaba rápidamente (Carrizales *et al.*, 1981). El tipo de fuente de N es crítica en algunos procesos de FS. Mushikova *et al.* (1978) eran capaces de cambiar la relación de pectinasas, amilasas, hemicelulasas y proteasas producidas por *A.awamori* cambiando la relación de salvado de trigo con cabezas de remolacha.

Es interesante el hecho de que para algunos hongos "brown rot", el crecimiento y la degradación de lignina no procede sin una suplementación de una fuente carbono de fácil asimilación *i.e.* cometabolismo (Horvath, 1972).

3.6.5 Tamaño de Inóculo

En general, las FSs se inoculan con altas concentraciones de esporas. Mudgett (1986) indica que es necesario optimizar la densidad de inóculo y considera que una densidad demasiado baja puede dar insuficiente biomasa y permitir el crecimiento de organismos indeseables; una densidad demasiado alta puede producir demasiada biomasa y agotar los nutrientes necesarios para la formación de producto.

Saucedo-Castañeda (1991) estudió el efecto del tamaño de inóculo (de 5.7×10^7 a 3.6×10^3 células/ml) sobre el crecimiento de una levadura en FS de bagacillo de caña con medio absorbido. Se observó que la fase de latencia o lag disminuyó al aumentar el tamaño de inóculo. También la velocidad específica de crecimiento μ aumentó al incrementar la densidad de inóculo (en realidad se estabilizó en 5.8×10^5), mientras que la biomasa final pareció menos sensible a este factor.

Los experimentos de Oriol *et al.* (1988b) confirman estos resultados (disminución de la fase de latencia), utilizando tasas de inóculos de 5.8×10^5 a 10^9 esporas de *A.niger* por g de bagacillo de caña. Es interesante destacar que a esas concentraciones de esporas se ha observado un efecto inhibitorio de la germinación en medio líquido (Barrios-González *et al.*, 1989).

3.7 Metabolitos Secundarios

Actividad antimicrobiana ha sido detectada en cepas de *Rhizopus* y *Actinomicor* utilizadas en fermentaciones tradicionales de alimentos orientales (Wang *et al.*, 1972).

Hesseltine y colaboradores, en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (Norther Regional Research Laboratories), adaptaron del sistema koji de FS de granos para producir micotoxinas en concentraciones mucho más altas que en FSm (Hesseltine, 1977a,b). Los autores explican que les encomendaron la producción de grandes cantidades de la toxina para pruebas de campo. Obviamente, lo primero que intentaron fue producirlas en FSm, con resultados altamente insatisfactorios. Después aplicaron la metodología del koji de arroz con mucho mejores resultados. Sin embargo, un incremento sorprendente en producción sobrevino cuando, por alguna razón, incubaron un matraz con el arroz inoculado en una agitadora (200 r.p.m.) como si contuviera medio líquido. Se obtuvieron concentraciones impresionantes de aflatoxinas de hasta 1.5 g/kg. El método fue adoptado por este grupo para producir micotoxinas de varios géneros y especies con excelentes resultados. Concentraciones similares de ocratoxinas fueron producidos con algunas especies de *Aspergillus* cultivadas en trigo (en maíz la producciones fueron menores) (Hesseltine, 1972).

La ocratoxina ha sido producida en concentraciones de hasta 2.4 g/kg. de sólidos en trigo, utilizando un fermentador rotatorio de cuatro compartimentos o cámaras, con deflectores que elevan y dejan caer el grano en cada revolución (Lindenfelser & Ciegler, 1975). La mayor velocidad de agitación probada (16 r.p.m.) dio la mayor producción, pero requirió 12 a 19 días para alcanzar la producción máxima. A 1 r.p.m., producciones habituales de 2.3 y 2.5 g/kg. se obtuvieron en 8 a 9 días. En cultivo estático se obtuvieron concentraciones de sólo 0.1 y 0.2 g/kg. de sólido. Hesseltine (1977a,b) resume las ventajas del mezclado en la producción de micotoxinas como: a) efectiva distribución del inóculo de esporas; b) mantenimiento de la homogeneidad y prevención de la formación de "pellets"; c) mejora la aireación y d) facilita la transferencia de calor.

En la investigación sobre la producción de micotoxinas en FS se distinguen dos épocas. La primera es la desarrollada por el grupo de Hesseltine desde finales de los años 60 y durante la primera mitad de los años 70. Estudiaron la producción de varias micotoxinas en FS usando diferentes granos y forrajes como alfalfa. Su método de

producción de micotoxinas en sólido se volvió clásico. Las variables de proceso más importantes que manejaron son:

1) selección del sustrato que son los granos. Hesseltine sugiere arroz completo o sin cáscara, cebada y trigo, maíz y frijol soya.

2) pretratamiento que incluye remojo y cocción. También incluye la abrasión ligera de la cubierta del grano "pearl" para cebada y trigo y fraccionar los granos de maíz y soya en cinco o seis pedazos.

Hesseltine sugiere que:

1) el tamaño de partícula debe mantenerse en un rango limitado para prevenir aglomeración de los granos;

2) la humedad debe mantenerse baja para prevenir contaminación;

3) los granos deben ocupar un volumen relativamente pequeño del volumen total del recipiente.

La segunda época se desarrolló durante la segunda mitad de los años 70, en el MIT de Boston con el grupo del Dr. Demain. Este grupo estudió la producción de otras micotoxinas en el sistema de FS arriba mencionado. Inicialmente produjeron citocalasina E (junto con 2 agentes tremorogénicos) con *A. clavatus* en FS de cebada (Demain *et al.*, 1977). En estos casos las producciones obtenidas fueron menores. En el caso de la citocalasina E, obtuvieron 35 mg./kg. junto con 80 mg./kg de tremorógenos. Es interesante notar que la producción en cultivo agitado (200 r.p.m.) fue tres veces superior a la producida en cultivo estático con arroz. Posteriormente produjeron ácido ciclopizónico con *A. flavus* (Luk *et al.*, 1977), malformina C con *A. niger* (Kobbe *et al.*, 1977) y cicloclorotina, un hepatotóxico producido por *Penicillium islandicum* (Ghosh *et al.*, 1978).

En estos estudios se notó que la agitación no favorecía la síntesis de algunas toxinas y, en general, procesos relativamente complicados de extracción.

III.- OBJETIVOS

Al comenzar esta tesis, se observó que la aplicación de la FS a la producción de metabolitos secundarios de alto valor agregado sería de gran utilidad en muchos campos. También, que las productividades de ciertas fermentaciones industriales en FS_m han incrementado de manera logarítmica en un periodo de varias décadas. Tales incrementos se han debido, en parte a la investigación en fisiología, bioquímica y genética microbiana y en parte a la investigación en ingeniería (Demain, 1977).

Sin embargo, aunque los efectos del ambiente acuoso sobre la fisiología microbiana han sido ampliamente estudiados en cultivo sumergido, hay poca información sobre el efecto del ambiente sólido sobre el crecimiento microbiano y menos aún sobre la idiofase.

Dada esta situación, una aproximación prometedora a la FS en general, y a la producción de metabolitos secundarios en particular, parecía ser el ampliar y profundizar los estudios básicos, a diferentes niveles (fisiológico y genético), sobre el comportamiento microbiano en medio sólido. Mediante su conocimiento, sería posible desarrollar procesos de FS más productivos.

Sólo después de esto será posible evaluar adecuadamente los alcances y ventajas de la FS y, sobre todo, compararla de una manera objetiva con el método convencional de FS_m.

Dada su importancia económica y a lo bien estudiado que esta su fisiología, bioquímica y genética, se tomó la penicilina como modelo de metabolito secundario.

Se realizaron estudios sobre el efecto de diferentes factores ambientales, nutricionales y genéticos sobre la síntesis de penicilina en FS en soporte impregnado. En el caso de algunos factores, se realizaron estudios comparativos FS vs FS_m.

1. Objetivo General

Determinar el efecto de varios factores físicos, nutricionales y genéticos sobre la producción de penicilina en FS en soporte (y establecer comparaciones con su efecto en FS_m), con el fin de establecer los factores que la controlan y de comprender las particularidades de su funcionamiento (principios básicos). De esta manera tener una idea de los niveles de producción que se pueden obtener y el camino para incrementarlos.

2. Objetivos Particulares

- 1) Evaluar el efecto de algunos factores ambientales sobre la producción de penicilina en FS: a) relación de los componentes del medio sólido (nutrientes/agua/soporte), tamaño de partícula del soporte, densidad de empaque y mezclado.
- 2) Comparar el efecto (regulatorio) de la concentración de glucosa en el medio sobre la síntesis de penicilina en FS y FS_m.
- 3) Establecer qué tipo de cepas son más productivas en FS.

HIPÓTESIS

La hipótesis a probar en el presente trabajo es entonces, que la producción de metabolitos secundarios en FS es afectada de forma importante, o controlada, por factores ambientales (relación agua / nutrientes / soporte), tamaño de partícula del soporte, densidad de empaque y mezclado), nutricionales (concentración de glucosa) y genéticos.

En este trabajo se presentan los estudios sobre el efecto de factores ambientales, constituidos por el artículo A, seguido por resultados que no han sido publicados aún (efecto de los constituyentes: nutrientes/agua/soporte) y el artículo B. Posteriormente, se exponen los estudios sobre el efecto de los factores nutricionales (fuente de carbono y regulación de la síntesis). Finalmente se presenta el estudio sobre los factores genéticos (efecto de la cepa), en forma del artículo C.

VI.- MÉTODOS

1. *Microorganismos*

En este estudio se utilizaron las siguientes cepas de *Penicillium chrysogenum*: Wisconsin 54-1255; ASP-78, R-8, P2 (ATCC 48271) y mutantes generadas de estas cepas. En una parte se utilizó una cepa industrial: CIBIOSA (Barrios-González *et al.*, 1993c). Para bioensayo se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

2. *Medios de cultivo*

2.1 *B. subtilis* se cultivó en medio de esporulación; peptona 8 g/l; extracto de carne 3 g/l; Ca Cl_3 10^5 M, a 30°C. Se utilizó triptosa soya agar 1% para el bioensayo.

2.3 Medio de esporulación para *P. chrysogenum*. Las cepas se conservaron liofilizadas y, los cultivos de trabajo fueron mantenidos en congelación a -20°C en varios eppendorfs con una solución de glicerol al 25%. Las esporas para cada experimento fueron producidas a partir de un eppendorf con el que se inocularon matraces con medio de esporulación (Power) Barrios-González, *et al.* (1993b). En estudios de las secciones 1.2, 2.2 y 3.4 de Resultados, se produjo el inóculo directo de una ampolleta de liofilizado.

2.4 Medios para la FS_m. Los medios complejos de crecimiento y producción fueron los reportados por Somerson, *et al.* (1961), los cuales se utilizaron para cepas P-2, R-8 y Wisconsin. Para ASP-78, los medios reportados por Luengo *et al.* (1980). El medio utilizado con la cepa de CIBIOSA es el que llaman medio diluido de producción y es utilizado por la empresa para realizar fermentaciones rápidas para evaluar materia prima. Esta compuesto de lactosa, pharmamedia, agua de cocimiento de maíz y Ca CO_3 en concentraciones similares a las de los otros medios.

Para los experimentos de regulación se utilizó el medio definido de Jarvis & Johnson (1947) como medio de crecimiento (para la FS_m). Como medio de producción se utilizó el medio definido reportado por Luengo *et al.* (1979) con las siguientes modificaciones. Se eliminó la sacarosa y se substituyó el sulfato de cobalto por cloruro de cobalto, manteniendo constante la molaridad del cobalto. De igual manera, la etilamina se substituyó por dietilamina, en una relación equimolecular de amina. La concentración de fenilacetato se fijó en 0.2%.

2.5 Medios para la FS. Los medios usados para impregnar el soporte sólido para FS fueron una modificación de los medios de producción mencionados anteriormente. Se duplicaron las concentraciones originales de los medios de producción, se agregó 1.4 % de glucosa y la concentración de ácido fenilacético se fijó en 0.4%. El pH del medio líquido se ajustó a 6, de manera que al impregnarlo en el bagacillo dio 6.5. Cuando el texto menciona cantidad o concentración de nutrientes, esto se refiere a la suma de todos los ingredientes agregados al medio líquido con el que se impregnó el bagacillo o soporte. Estos, junto con el soporte constituyen los sólidos del medio.

3. *Producción de Penicilina*

3.1 Producción de Penicilina en FS_m y Cilindro de Agar. La producción en cilindros de medio (Power) con agar, así como las fermentaciones en medio líquido (matraz agitado) se realizaron como se describió anteriormente (Barrios-González, *et al.* 1993b).

3.2 Producción de Penicilina en FS. Los cultivos sólidos se realizaron bajo condiciones no asépticas, de la manera descrita por Barrios-González, *et al.* (1988). Para cada experimento se abrió una ampollita de la cepa liofilizada, con la cual se inoculó el medio de esporulación. Una vez esporulado el cultivo, se suspendieron las esporas en agua (estéril), con las cuales se inoculó el medio líquido estéril (10^6 esporas por ml) utilizado para impregnar el soporte (bagacillo de caña). Los reactores tubulares se empacaron con 12 g de medio sólido húmedo. El bagacillo fue previamente molido y tamizado (10-30 mesh, a menos que se especifique otro tamaño) antes de la esterilización. La densidad de empaque fue de 0.3 (a menos que se especifique otra). La temperatura de incubación fue de 25 °C y la velocidad de aireación de 2 l/h por columna (0.17 l/h*g de medio húmedo).

La principal variable fue la producción de penicilina, aunque también se determinó la humedad, el pH y la concentración de azúcares reductores o de glucosa. En algunos casos se determinó la concentración de biomasa por el método gravimétrico. Esta última determinación dio resultados reproducibles y consistentes, aunque diferentes a los obtenidos en respirometría, por lo que se le consideró poco confiable. En algunos experimentos se determinó la actividad de agua en las muestras del tiempo cero. En la mayor parte de los experimentos se cuantificó la concentración de O₂ y CO₂ a la salida de los reactores. En todos los casos se realizaron cinéticas completas de estas variables, aunque en ocasiones sólo se menciona la producción máxima.

El muestreo se hizo generalmente por duplicado (en ocasiones por triplicado) y cada experimento se repitió al menos dos veces.

4. Métodos Analíticos

La extracción de la penicilina del medio sólido se realizó con solución amortiguadora de fosfatos como se reportó anteriormente Barrios-González, *et al.* (1993b). La penicilina se cuantificó por bioensayo y en ocasiones también por HPLC, en la forma descrita en la misma referencia.

La extracción y cuantificación de azúcares reductores (Método de Miller) se realizó de la manera ya descrita (Barrios-González *et al.*, 1988), excepto que en el resto del trabajo la determinación se hizo del extracto para cuantificación de penicilina. De esta misma muestra se cuantificó la glucosa, en la parte de regulación, por el método de la glucosa oxidada en un autoanalizador.

Para determinar la concentración de biomasa (método gravimétrico) se pesó el contenido total de la columna y se lavó en un buchner para eliminar los nutrientes. Posteriormente se pesó una parte representativa (4 g) para calcular el incremento en peso del bagacillo seco.

En estos experimentos la actividad metabólica se siguió por medio de un respirómetro automático computarizado, que determina la producción de CO₂ y el consumo de O₂. En realidad la concentración de estos gases a la salida de los reactores, a tiempos predeterminados (generalmente 1 h), en reactores predeterminados (usualmente 6). El equipo consta de cromatógrafo de gases (Gow Mac®) con muestreador automático de movimiento neumático, conectado a un controlador marca Vici®, el cual es manejado por una computadora con el programa Maxima de Waters®. Los cromatogramas y datos integrados y transformados en concentración son almacenados en el disco.

Estas mediciones de respiración son muy precisas y se pueden graficar como la velocidad de respiración (producción de CO₂ por ejemplo) =dCO₂/dt*g de materia seca ó en forma integrada (método del trapecio según Saucedo-Castañeda, 1991) como producción total CO₂ total/g (ó por columna), la cual indica la actividad catabólica y es, teóricamente, paralela a la curva de crecimiento (siempre y cuando el coeficiente de mantenimiento "m" sea constante). Aunque no se conoce este coeficiente, estas curvas resultan por el momento el mejor indicador del crecimiento. De estas cinéticas se determinó el tiempo de germinación y en algunos casos (pendiente de log [] vs t) la velocidad específica de producción de CO₂ (μ).

La actividad de agua se determinó en medio (inoculado) del tiempo cero con un Decagon®. Las mediciones microscópicas con un microscopio óptico acoplado a una cámara de video y a una computadora con el programa Imagina de Biocon® (procesador-digitalizador de imágenes).

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se dividieron en tres secciones: 1. Factores Ambientales; 2. Factores Nutricionales y 3. La Cepa y el Nivel de Producción.

Gran parte de estos resultados se encuentran en tres artículos (A, B y C) de manera que se presentan estos artículos antecedentes por una traducción de su parte de resultados. En en algunos casos los artículos son precedidos por resultados inéditos sobre el mismo tema.

Para favorecer la claridad, a continuación se da un resumen de la organización y en el contenido de este capítulo.

Resumen y Estructura de Resultados

1. Factores Ambientales

1.1 Producción de Penicilina por FS. (Barrios-Gonzalez, *et al.*, 1988), en el que se utiliza la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y:

- 1) se demuestra que es posible producir penicilina por FS en soporte y que el producto y otros componentes del medio pueden extraerse y cuantificarse.
- 2) el hongo muestra un comportamiento diferente en FS en relación a la FSm. Es decir, le favorece un medio más concentrado en FS.
- 3) se encuentra que la humedad inicial tiene un fuerte impacto sobre el nivel de producción obtenido.
- 4) bajo las condiciones usadas, la producción de penicilina en FS es varias veces más alta y obtenida en tiempos más cortos.

1.2 Efecto de la Relación de los Constituyentes (soporte, nutrientes y agua) sobre la Producción de Penicilina en FS.

Resultados inéditos con la cepa P-2, en los que se reconoce que un mismo valor de humedad o concentración del medio sólido puede representar diferentes combinaciones de los tres constituyentes principales: (nutrientes/bagacillo/agua) y posiblemente dan un resultado distinto. Estos resultados pueden resumirse en:

- 1) la producción de penicilina bajo diferentes condiciones se representó como una superficie de respuesta formada por combinaciones de los tres componentes principales del medio sólido (nutrientes/bagacillo/agua) y cuya variable de respuesta (Z) es la producción máxima de penicilina lograda en esas condiciones.
- 2) se encontró que ni la actividad de agua (concentración del medio) ni la humedad inicial controlan la producción de penicilina directamente, sino la relación entre el soporte (bagacillo) y los otros dos componentes.
- 3) las mayores producciones se obtuvieron en la zona de alto relación nutrientes/soporte (2 g/g) y menor relación agua/soporte (5 g/g) y otro en la región de alto agua/soporte (7) y menor nutrientes/soporte (1.5).

1.3 Efecto del Tamaño de Partícula del Soporte, Densidad de Empaque y Agitación sobre la Producción de Penicilina en FS. Trabajo publicado (Barrios-González *et al.*, 1993a) en el que se utiliza la cepa *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 y se encuentra que:

- 1) El tamaño de partícula del bagacillo no afecta la producción de penicilina.
- 2) Los cultivos más empacados (0.35) muestran una mayor producción del antibiótico (45%).
- 3) El mezclado (una vez cada 24 h) no tiene un efecto negativo sobre la producción si se restituye el agua que se va perdiendo en cada operación.

1.4 Efecto del Mezclado sobre la Producción de Penicilina y Actividad Metabólica de *P. chrysogenum* P-2.

Resultados inéditos relacionados con el efecto del mezclado en una FS con una cepa de mayor nivel de producción (P-2).

2. *Factores Nutricionales* (Efecto de la Glucosa sobre la Producción de Penicilina en FS y FSm).

Estos resultados inéditos indican que la glucosa tiene un efecto regulatorio similar en FS y en FSm.

3. *La Cepa y el Nivel de Producción*

Constituido enteramente por un trabajo publicado (Barrios-González, *et al.*, 1993b), con el título Desarrollo de Cepas de Alta Producción para FS. Se utilizaron cinco cepas con diferente nivel de producción (en FSm) y mutantes provenientes de ellas.

- 1) Se encontró que las cepas que más producen en FSm tienden a ser las que más producen en FS.
- 2) Sin embargo, estas cepas tienden a ser menos eficientes para producir en FS, en el sentido que producen menos veces más en FS que en FSm (menor producción relativa)
- 3) Se diseñó un método para seleccionar mutantes de alta producción de penicilina, especiales para FS.

1. Factores Ambientales

1.1 Traducción de Resultados del Artículo A: "Producción de Penicilina por Fermentación Sólida".

Se realizaron dos FSs simultáneas, una fue inoculada con esporas y otra con micelio de *P. chrysogenum* NRRL 1951. Una pequeña producción de 6 U/ml fue obtenida en el primer cultivo, mientras que el segundo no produjo nada. Debido a esto, se utilizó inóculo de esporas en el resto del trabajo.

Concentración del Medio

Se estudió el efecto de la concentración de los nutrientes del medio (multiplicación de la concentración de los ingredientes) en FS utilizando a la cepa Wisconsin 54-1255 N. Para mantener la humedad inicial (HI) constante, el incremento de nutrientes fue

compensado con una disminución en bagacillo. Esto resultó en grandes diferencias en tonicidad del medio pero pequeñas diferencias en relaciones bagacillo/agua.

La Fig. 1-A muestra la producción máxima obtenida en fermentaciones utilizando diferentes concentraciones de medio. Se observa que, en FS, el medio 2X soportó una producción 5 veces mayor que el resto. En FSm inoculada con micelio, el incremento de la concentración del medio tuvo un efecto adverso en la producción, mientras que ningún efecto significativo fue observado en FSm inoculada con esporas.

En FS la producción de penicilina comenzó a las 24 h en todos los casos excepto en el medio 4X (48 h). Cuando las concentraciones de aceite y de precursor también fueron multiplicadas la producción no mejoró y el mejor resultado fue obtenido con el medio X.

Se realizaron fermentaciones utilizando el medio 2X y diferentes HI. Para ajustar la HI a diferentes valores y mantener el contenido de nutrientes constante en 2X, se disminuyó el contenido de bagacillo. Esto resultó en grandes diferencias en HI (60, 70, 73 y 78%) y en relaciones bagacillo/agua, pero pequeñas diferencias en tonicidad del medio. La Fig. 2-A muestra cómo la humedad se eleva ligeramente durante las fermentaciones, pero conservando las diferencias iniciales entre tratamientos.

En el intervalo estudiado, la HI no afectó el tiempo de inicio de la producción, pero tuvo una importante influencia en la producción de penicilina alcanzada y en su estabilidad. Se obtuvo una producción máxima de 800 U/ml en 46 h utilizando 70 y 73 % de HI.

Las cinéticas de consumo de azúcares mostraron una forma similar en la que se pueden distinguir 5 etapas: a) incremento de los azúcares reductores (hidrólisis de sacarosa residual del bagacillo); b) consumo rápido; c) consumo lento (probablemente representa el consumo de lactosa), que correlaciona con la fase de baja tasa de producción de penicilina; d) consumo rápido (en 70 y 73 % de HI), prácticamente agotando los azúcares, lo cual correlaciona con la fase de alta tasa de producción; consumo moderado en 60 y 78% de HI, con degradación total de penicilina en el primero y parcial degradación en el segundo; e) un consumo relativamente rápido en 78% acompañado de una alta tasa de producción, mientras que un rápido consumo sin producción se observó en 60%.

Comparación FS vs FSm

Se comparó el comportamiento de varias fermentaciones sólidas y líquidas (Tabla 1-A). Se observó que la media de la producción en FS fue 17 veces mayor que la de medio líquido, y alcanzada en una tercera parte del tiempo. Un cálculo aproximado reveló que el rendimiento (Y_p/s) fue 7 veces mayor en FS. Finalmente, la FS mostró una productividad volumétrica 8.7 veces mayor.

En FS (en soporte impregnado) y determinar sus ventajas sobre la FSm. Una vez adaptado el sistema se evaluó el efecto de la concentración de nutrientes así como el de la humedad inicial.

Este es el único estudio, de los que componen la tesis en el que se utilizó el medio de producción (complejo) de Sylvester & Coghill (1954).

**1.1.1 SOBRETIRO ARTICULO A: PENICILLIN PRODUCTION BY
SOLID STATE FERMENTATION**

PENICILLIN PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION

J. Barrios-González *, A. Tomasini, G. Viniestra-González, J. López.
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana,
Apdo. Postal 55 - 535, Iztapalapa, 09340, México, D. F.

SUMMARY Penicillin was produced by a non-sterile solid state fermentation (SSF) on bagasse impregnated with culture medium. The use of concentrated media greatly enhanced the antibiotic production in this system. It was observed that adequate initial moisture content (70%) of the impregnated solid medium results in higher production. A comparison between solid and liquid fermentation showed superior yield and productivity.

INTRODUCTION

Solid state fermentation (SSF) is an old method that has been reevaluated and modernized lately to produce protein and enzymes (Aidoo et al., 1982). Several mycotoxins have been produced in very high quantities by SSF on grains and other agricultural products (Hesseltine, 1972), and a solid fermentation process for gibberellic acid production has been reported (Kumard & Lonsane, 1987). In 1980 Raimbault & Alazard developed a method to study fungal growth in solid fermentation, which permits improved control of culture conditions. This technique has been used in the development of a process for protein enrichment of cassava by SSF (Raimbault et al., 1985). It has also been applied in the development of similar processes to produce: cellulases (Roussos, 1985), pectinases (Trejo, 1985), and aflatoxins (Barrios-González et al., 1986). Some of these results have been scaled up to 30 Kg. in reactors with different configuration (Huerta et al., 1986). Recent studies explored different SSF systems, particularly the use of inert supports impregnated with liquid media. This system has been patented (Barrios-González et al., 1988) and characterized by Oriol et al., (1988). The objectives of this work were to evaluate the possibility of producing penicillin by this SSF system and determine its advantages, if any, over the conventional LF one.

METHODS

Microorganisms: *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 was used in initial experiments and a reisolate of *P. chrysogenum* Wis 54-1255 which was called Wis 54-1255 N, was used in the rest of the work. Strains were maintained in soil cultures.

Pretreatment of raw material. Sugarcane bagasse, free from sugar was obtained and prepared as previously described (Oriol et al., 1988b).

Preparation of spore inoculum. Spores were obtained from flasks with PDA medium incubated at 27°C for a week and suspended in sterile water. An inoculum size of 0.5×10^6 /ml was used in all experiments.

Liquid fermentation. Submerged culture was performed in 250 ml. erlenmeyer flasks with 50 ml of production medium reported by Sylvester & Coghill (1954) (in g/l): corn steep liquor 30, lactose 30, glucose 5.0, CaCO_3 3.0, lard oil 1.87, phenyl-acetamide 0.05, NaNO_3 3.0, ZnSO_4 0.044, MgSO_4 0.25, pH adjusted at 5.5. This medium was inoculated with spores or with mycelium and incubated at 26°C in a rotary shaker at 250 rpm. Mycelium was obtained from a 3 day shake flask culture with the following medium: glucose 20 g/l, sucrose 6.8 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 g/l, KH_2PO_4 9.06 g/l, CaCO_3 3.0 g/l, ZnSO_4 0.02 g/l, CuSO_4 0.005 g/l, MgSO_4 0.02 g/l, pH adjusted at 5.0. In both cases, two flasks were collected at every sampling time.

Solid state fermentation. The culture was achieved under non-aseptic conditions as previously described (Raimbault & Alazard, 1980). Column fermentors containing 11 g. of moistened and inoculated support were incubated in a 26°C water bath. Several fermentors were run simultaneously with individual aeration of 2 l/h.

The production medium solids, were dissolved in the amount of water needed to achieve the desired moisture content (usually 70%). In this stage pH was adjusted to 3.5, and sterilized 15 min. at 1 bar. Sterile medium was inoculated and mixed with the bagasse which resulted with a pH value of 5.5. In some experiments the concentration of solids (except lard oil and phenyl-acetamide) was multiplied by 2 or by 4, etc. and these media were named 2X, 4X, etc.

Sample analysis. Samples from the LF were filtered, rinsed and the biomass dried in a convection oven at 60°C for 48 hrs. Penicillin, reducing sugars and pH were determined in the filtrate.

Two complete columns of SSF were collected at each time and 1.0 g. of each was used for pH determination (by mixing with 10 ml. of distilled water, stirring for 5 mins. and using a pH meter on the solution), 0.5 g. for penicillin assay and the rest was dried at 60°C for 48 hrs. The dry sample was used afterwards to determine moisture content (weight loss), reducing sugars and biomass as nucleic acids.

Penicillin was extracted from SSF samples by mixing with 3 ml. of ethyl acetate and separated by centrifugation (10 min.) at 5,000 rpm. 20 micro liters of the solvent were used to determine penicillin concentration by bioassay. In LF, the bioassay was done directly with the filtered fermentation broth.

0.5 g. of the dry bagasse were homogenized in 45 ml. of distilled water with an Ultra-Turrax. A 5 ml. aliquot was centrifuged (5 min. at 5,000 rpm) and reducing sugars measured from the supernatant by the Miller method (1959). Nucleic acids were extracted from the pellet with 5 ml. of 0.7 M HClO₄ and absorbance determined at 260 nm.

RESULTS

Two solid fermentations were performed simultaneously, one was inoculated with spores of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951, and the other one with mycelium. A small production of 6 U/ml. was obtained in the first case, while no production was obtained in the last case. The same results were obtained in a second experiment, so spore inoculum was used throughout the study.

Medium Concentration.

The effect of medium concentration in SSF was studied using *Penicillium chrysogenum* Winsconsin 54-1255 N. To keep initial moisture content (IMC) constant (70%) in these experiments, nutrient increase was compensated with a decrease in bagasse. This resulted in big differences in medium tonicity but very small differences in bagasse/H₂O ratios.

Fig 1 shows maximal production obtained in fermentations using different medium concentrations. It can be seen that in SSF, medium 2X supported a production 5 times higher than the rest. In LF inoculated with mycelium, increasing medium concentration had an adverse effect on production, while no significant effect was observed in LF inoculated with spores. In SSF penicillin production started at 24 hrs. in all cases except 4X (48 hrs). When lard oil and precursor concentrations were also multiplied, production did not increase and best performance was obtained with X medium.

Four simultaneous fermentations were performed with 2X medium and different initial moisture contents (IMC). To adjust IMC at different levels and keep nutrient content of the impregnated solid medium constant in 2X, water increase was compensated with bagasse decrease. This

resulted in big differences in IMC (60, 70, 73, 78%) and bagasse/H₂O ratios (0.58, 0.35, 0.3, 0.22 respectively) but slight differences in medium tonicity. Fig. 2 shows that moisture level increases slightly during the fermentations but within the range of the initial IMC of the case.

In the range studied (60 -78%), IMC did not affect the time at which production started, but had an important influence on the penicillin production reached and its stability. A maximum production of 800 U/ml. was obtained after 46 hrs of incubation with 70 and 73% IMC.

Sugar consumption kinetics showed similar form and 5 stages could be distinguished: a) reducing sugar concentration increase; probably caused by hydrolysis of residual sucrose in the bagasse; b) rapid sugar consumption; c) slow consumption rate; probably represents lactose consumption and correlates with low rate production phase; d) fast sugar consumption in 70 and 73% IMC, practically exhausting sugars, correlating with high production rate; moderate consumption in 60 and 78% IMC with total penicillin degradation in the former and partial degradation in the latter; e) fairly rapid consumption in 78% accompanied by a rapid production rate while rapid consumption rate but no production was observed in 60%.

Comparison SSF vs. LF.

The performance of several solid and liquid fermentations was compared (Table 1). It can be observed that average production by SSF was 17 times higher than the one obtained by LF, and achieved in one third of the time. An approximate calculation revealed that the efficiency of sugar utilization to produce the antibiotic (Y p/s) was 7 times higher in SSF. Finally, SSF showed 8.7 times greater volumetric productivity.

System	P max (a) (U/ml)	Time P max (Hrs)	Y p/s (U/mg)	Productivity (U/r-ml Hr)
SSF	686	49	10.77	2.01
LF	38.5	166	1.5	0.23

Table 1. Average performance of five penicillin solid and liquid fermentations with *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 N. The medium reported by Sylvester & Coghil (1954) (X medium) was used in shake flask culture or (2X medium) in solid state fermentations (SSF) carried out at 70% initial moisture. (a) maximum penicillin production.

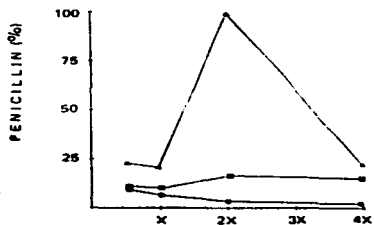


Fig. 1. Effect of medium concentration on penicillin production by SSF (▲), by LF inoculated with mycelium (●) and LF inoculated with spores (■).

Medium Concentration

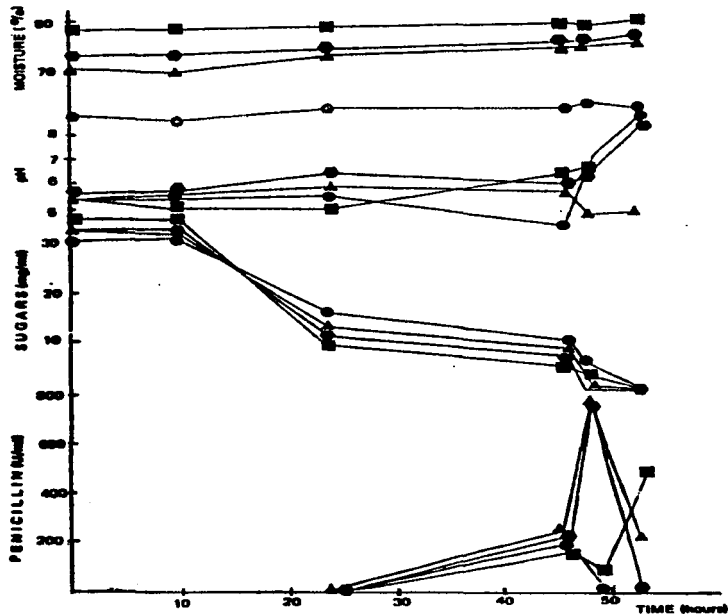


Fig. 2 Time course of penicillin solid state fermentation using 2X medium and different initial moisture contents: 65% (○) 70% (△), 73% (□) and 78% (◇). All fermentation were inoculated with spores of *P. chrysogenum* var. S-8286 N.

DISCUSSION

The present work shows that it is possible to produce penicillin by SSF. The system employed is solid fermentation on impregnated bagasse. In this system liquid media developed for LF can be employed and the fermentation products can be recovered by extraction with solvents or by pressing the bagasse. In this way accurate comparisons can be established between solid and liquid fermentations.

Results showed important differences between these culture methods. An important feature of the penicillin SSF is that the process is carried out under non-sterile conditions without contamination or product degradation problems. This means that the culture technique allows the setting of environmental conditions that give ecological advantages to the fungus. *F. chrysogenum* showed different physiology in SSF since it was shown that relatively concentrated media are needed in this solid fermentation system to reach adequate growth and production and that this effect is not observed in LF. These findings agree with previous studies (Oriol et al., 1988b) which indicated that, in this system, *A. niger* can efficiently utilize high substrate (glucose) concentrations that would be inhibitory in submerged culture.

It is considered that in cassava SSF (and similar systems), growth is limited by water availability, i.e. high tonicity of the residual free water (Raimbault, 1980; Oriol et al., 1988a). In SSF on impregnated bagasse the support is inert, so it does not dissolve in the residual free water as the fermentation proceeds. Therefore growth must be limited by a different cause in this system.

In the present study sugar consumption and penicillin production kinetics indicate that a first and partial limitation to growth is caused by a change of the substrate (lactose) that is being consumed. At the end of the culture a second and complete limitation seems to be caused by sugar exhaustion.

Previous work (Oriol et al., 1988b) showed that water content (IMC and bagasse/H₂O ratio) does not have an important effect on the growth phase of *Aspergillus niger* in this SSF system. The authors observed that growth and germination were affected by Aw (tonicity) of the liquid phase.

Results of the present work showed that IMC strongly influenced idiophase. During the last hours of the culture, fermentations with IMC of 70% (bagasse/H₂O ratios near 0.35) presented very high production rates while the fermentation with lower IMC (60%) presented fast antibiotic degradation rate.

From an applied point of view it is seen that, in the penicillin SSF, higher production was obtained and in a shorter time than in LF. Higher penicillin yields and volumetric productivity were also observed in this culture method.

These advantages together with the low energy costs of the process (sterilization, aeration agitation) indicate that this system has an important industrial potential. It is also seen that physiology in solid can be very different from the one observed in liquid medium, so more studies at this level are necessary to exploit the system's full potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CONACYT, Mexico, for financial support (Grant No. PVT/AI/NAL/85/2759). This work was performed as part of the agreement UAM (Mexico)-ORSTOM (France).

LITERATURE CITED

Aidoo, K. E., Hendry, R., Wood B.J. B. (1982) Adv. Appl. Microbiol., 28,

201-212.

- Barrios-González, J., Tomasini, A., Raimbault, M. (1986) VI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, 27 - 30 de abril, México, D.F.
- Barrios-González, J., Viniestra, G., Gutiérrez, M., Roussos, S., Raimbault, M. (1988) Certificado de invención No. 17184 en trámite, México.
- Hesseltine C. W. (1972) *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 517-532.
- Huerta, S., Gutiérrez, M., López, R., Massuco, A. E., Viniestra, G. (1986) *Revista de la Academia Nacional de Ingeniería, México* **5**, 46-53.
- Kumar, P.K.R., Lonsane, B.K. (1987) *Biotechnol. Letters* **2**, 179-182.
- Miller, G.L. (1959) *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
- Oriol, E., M. Raimbault, S. Roussos, G. Viniestra-González (1988a) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 498-503.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniestra-González, G., Raimbault, M (1988b) *J. Ferment. Technol.* **66**, 1-6.
- Raimbault, M., Alazard, D. (1980) *European J. Appl. Microbiol.* **9**, 199-209.
- Raimbault, M. (1980) These de Doctorat, U.P.S. Toulouse.
- Raimbault, M., Rehva, S., F. Pila, P. Villalobos. (1985) *J. Ferment. Technol.*, **63**, 395-399.
- Roussos, S. (1985) These de Doctorat, Université de Provence.
- Sylvester, J.C. and Coghill, R.D. (1954) In "Industrial Fermentations" Vol. 2, (ed) Underkofler, L.A., IMCcky R.J. Chemical Publishing, New York, pp 219-263.
- Trejo, M. R. (1986) Tesis Profesional, Universidad Nacional Autónoma de México.

1.2 Efecto de la Relación de los Constituyentes (soporte, nutrientes y agua) sobre la Producción de Penicilina en FS.

El trabajo anterior encontró que es posible producir penicilina en FS en soporte, proceso que mostró un importante potencial industrial. Se demostró que la humedad inicial tiene un fuerte efecto sobre la producción. También que el uso de medios concentrados favorece la producción del antibiótico en FS.

Si se consideran los tres componentes del medio sólido, el determinar el efecto de incrementar la humedad o los nutrientes en forma aislada nos da una visión muy estrecha o limitada ya que hay varias maneras de llegar a ese valor. Por ejemplo, se puede incrementar la humedad por tres caminos diferentes: 1) a costa de disminuir el contenido de soporte e incrementar los nutrientes lo suficiente para mantener una concentración constante en el medio líquido; 2) incrementar la humedad y el contenido de soporte a costa de disminuir los nutrientes; 3) incrementarla a costa de disminuir ambos factores (soporte y nutrientes). Seguramente estas tres estrategias llevan a resultados diferentes, ya que representan diferentes combinaciones de los componentes.

El triángulo de la Fig. 1 representa las combinaciones teóricas que se pueden hacer con estos componentes. Sin embargo, como medio para FS hay restricciones que limitan las combinaciones que se pueden utilizar (zona sombreada). Estas restricciones se deben a que a bajas humedades los microorganismos no crecen, mientras que humedades muy altas no las retiene el soporte (en algunas se estaría hablando de FSm con bagacillo en suspensión). Los microorganismos no crecen, o crecen poco a concentraciones muy bajas de nutrientes, mientras que concentraciones muy altas no permiten el crecimiento. Además, esta última condición no dejaría espacio para el soporte. El soporte también tiene sus límites ya que muy poco no retendrá el agua y mucho no dejará espacio para nutrientes.

Más recientemente, se realizaron experimentos para determinar el papel que juegan los constituyentes principales del medio sólido en la idiofase. En estos estudios se utilizó la cepa P-2 y un medio complejo (Somerson). Se estudió la producción de penicilina en el área delimitada por 10 a 24 % de soporte, 58 a 80% de agua y 4 a 26 % de nutrientes (0.5 a 3.2 X), la cual viene a ser un pequeño hexágono en la esquina de alta humedad y bajos nutrientes y soporte.

Evidentemente, se está hablando de condiciones iniciales. Viéndolo desde esta perspectiva, se puede pensar que durante la fermentación el contenido de soporte no varía, mientras que los nutrientes van disminuyendo, siendo substituidos por micelio y productos. El contenido de agua va subiendo, donde sus componentes: el agua del micelio va aumentando, el agua ligada va disminuyendo y el agua disponible no se sabe (es decir, avanzaría un poco hacia arriba y hacia la derecha del triángulo).

En un sistema de FS tradicional (harina amilácea por ejemplo) habría diferencias, se prevé que el soporte va disminuyendo y los nutrientes aumentando, mientras que el agua también aumenta. Sus componentes, el agua del micelio y el agua ligada aumentan, mientras que el agua disponible disminuye (es decir, avanzaría un poco hacia arriba y a la izquierda del triángulo).

Estos experimentos pueden ser enmarcados en el esquema de los tres caminos para incrementar la humedad arriba descritos y que es la aproximación utilizada en el Artículo A.

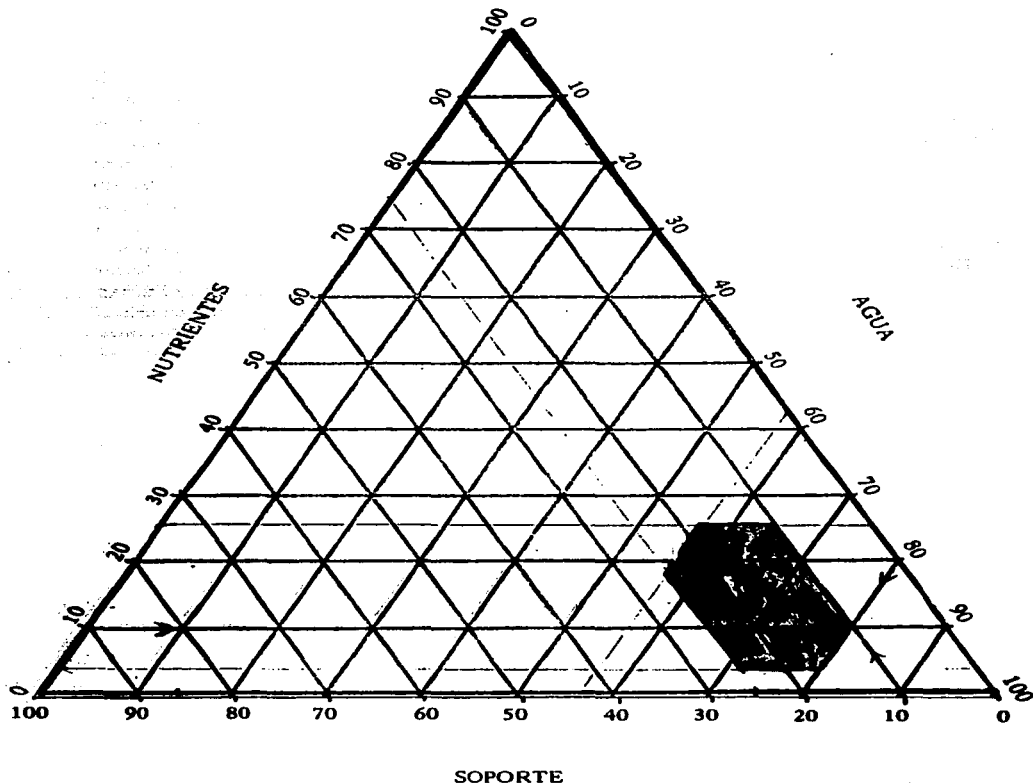


Fig. 1 Combinaciones teóricas de los componentes del medio sólido (nutrientes/ agua/ bagacillo). Marcada en negro la zona en la que se estudió la producción de penicilina.

Entonces, se incrementó la humedad: 1) a costa de disminuir el contenido de soporte e incrementar los nutrientes lo suficiente para mantener una concentración constante en el medio líquido; 2) incrementar la humedad y el contenido de soporte a costa de disminuir los nutrientes; 3) incrementarla a costa de disminuir ambos factores (soporte y nutrientes). Es interesante destacar que la primera estrategia es la que se realizó en el artículo A, pero con cepa y medio diferentes.

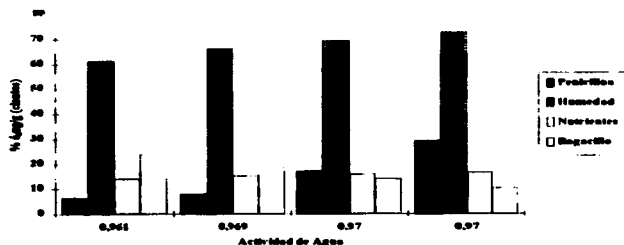


Fig. 2 Producciones máximas de penicilina obtenidas en cultivos sólidos con humedades crecientes, contenidos de bagacillo decrecientes y concentraciones de nutrientes crecientes.



Fig. 3 Producciones (máximas) de penicilina obtenidas en cultivos sólidos con humedades crecientes, contenidos de bagacillo y concentraciones de nutrientes decrecientes. Relación bagacillo/nutrientes constante.

Los resultados obtenidos en este primer caso confirman los obtenidos en el artículo A, ya que la producción máxima de penicilina fue mayor en las FSs con mayor humedad inicial (Fig. 2). En esta gráfica se observa cómo al incrementar la humedad el contenido de soporte disminuye (de 24 a 10.3%). También que la relación entre agua y nutrientes se mantuvo constante con la intención de conservar una A_w inicial de 0.97 en todos los tratamientos. Sin embargo, el cultivo con menos humedad presentó una menor A_w , probablemente debida a la gran cantidad de bagacillo.

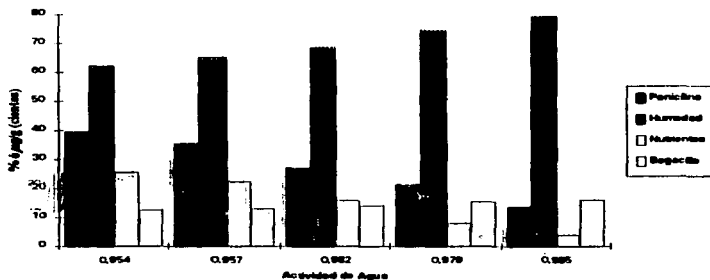


Fig. 4 Producciones (máximas) de penicilina obtenidas en cultivos sólidos con humedades crecientes, contenidos de bagacillo crecientes y concentraciones de nutrientes decrecientes. Relación bagacillo/agua constante.

En el segundo caso (Fig. 3), se encontró que la producción máxima de penicilina aumentó fuertemente al incrementar la humedad. Es interesante notar que en este caso se disminuyó el contenido de soporte y también (ligeramente) el contenido de nutrientes (de 2.8 a 1.6 X), por lo que fue posible incrementar la humedad inicial hasta 80% (con una A_w de 0.985).

En el tercer caso la producción máxima de penicilina bajó al incrementar la humedad (y la A_w). Es importante destacar que en esta estrategia se incrementó también el contenido de bagacillo (Fig. 4).

Hasta aquí se podría concluir que el incrementar la humedad inicial del medio sólido no siempre ocasiona un incremento en la producción de penicilina, sino que puede ocasionar un decremento, según la estrategia que se siguió para hacerlo.

De esta manera, la principal variable responsable de la disminución en la producción fue el contenido de soporte. La producción obtenida fue elevada en condiciones de alta o baja humedad (73-75.5% y 62.2%), siempre que el contenido de bagacillo fue bajo (10.3-11 y 12.5%).

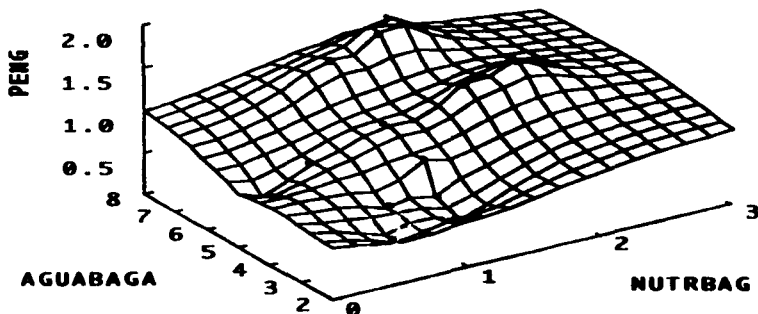


Fig. 5a Superficie de respuesta de la producción de penicilina en cultivos sólidos con diferentes relaciones agua/soporte (AGUABAG) y nutrientes/soporte (NUTRBAG). La concentración de penicilina obtenida fue normalizada en relación a la producción de las condiciones control.

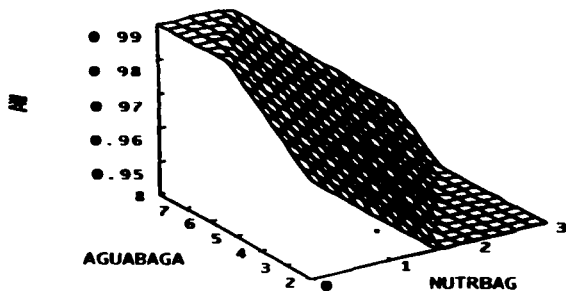


Fig. 5b Actividad de agua (A_w) inicial de cultivos con diferentes relaciones agua/soporte (AGUABAG) y nutrientes/soporte (NUTRBAG).

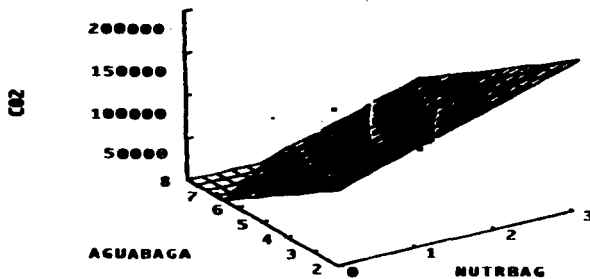


Fig. 5c Producción total de CO₂ (ml totales/columna) de cultivos sólidos con diferentes relaciones agua/soporte (AGUABAG) y nutrientes/soporte (NUTRBAG).

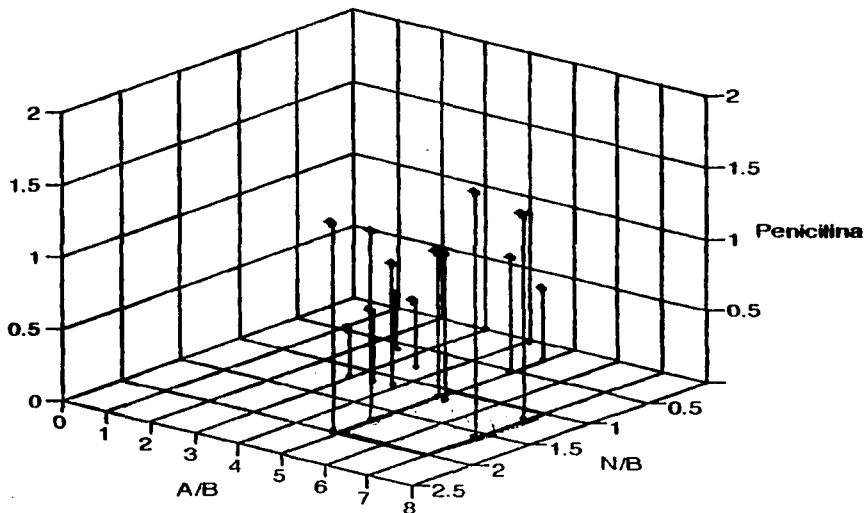


Fig. 5d Producción de penicilina en cultivos sólidos con diferentes relaciones agua/soporte (A/B) y nutrientes/soporte (N/B). Recuadro en zona de máximos

Considerando estos experimentos dentro del esquema global planteado inicialmente (como casos dentro de una superficie de combinaciones de los tres componentes: zona sombreada Fig 1), se entiende que los medios con humedades iguales, obtenidas por diferente estrategia, representan combinaciones distintas de los tres componentes.

Para hacer una gráfica, se puede eliminar una de las variables (el soporte) poniéndola en función de las otras. De esta manera, se puede graficar la relación entre los nutrientes y el soporte (N/S) y el agua y el soporte (A/S) contra producción de penicilina (variable de respuesta en el eje Z). Debido a que esta aproximación engloba resultados de varios experimentos diferentes, la producción de penicilina fue normalizada en función del control de cada experimento. Es decir de la producción en las condiciones estándar: 70% de humedad; 16% de nutrientes y 14% de bagacillo.

La gráfica conformada de esta forma (Fig. 5a) es una superficie de respuesta (ajuste cuadrático) y muestra que la producción de penicilina es mala en la zona de baja relación N/S (< 1 g/g) y baja A/S (< 4.5 g/g). Es decir en condiciones de alto contenido de bagacillo. También se observa que la producción del antibiótico sube hacia la zona de bajo soporte. De hecho es posible ver dos máximos, uno en la región de alto N/S (2) y menor A/S (5) y otro en la región de alto A/S (7) y menor N/S (1.5).

En estos experimentos la actividad metabólica se siguió por medio de un respirómetro automático computarizado (ver Material y Métodos) que determina la producción de CO_2 y el consumo de O_2 . Estas mediciones de respiración son muy precisas y se pueden graficar como la tasa de respiración (producción de CO_2 por ejemplo) $=d\text{CO}_2/dt \cdot g$ de materia seca ó en forma integrada como producción total CO_2 total/g (ó por columna), la cual indica la actividad catabólica y es, teóricamente, paralela a la curva de crecimiento (siempre y cuando el coeficiente de mantenimiento "m" sea constante). Aunque no se conoce este coeficiente, estas curvas resultan por el momento el mejor indicador del crecimiento. La Fig. 5c representa la producción total final de CO_2 en las diferentes sitios de la superficie arriba mencionada (ajuste lineal). Se observa que se produjo más CO_2 en condiciones de mayor concentración de nutrientes y menos contenido de humedad. Se puede decir que esta comportamiento es opuesto al de la actividad de agua (ajuste lineal) inicial (Fig. 5b). La Fig. 5d muestra los sitios de la superficie estudiados.

En relación a la fase de crecimiento, la Tabla 2 muestra cómo el tiempo de germinación (tiempo que tarda en comenzar la producción del CO_2) está regido por la A_w . En los casos 1 y 2 se puede observar que el CO_2 total final disminuye, conforme aumenta la humedad y disminuyen los nutrientes, independientemente de si sube o baja el contenido de bagacillo. En el caso 3 se puede decir que el CO_2 total final es constante excepto en el caso de mucho bagacillo y poca humedad.

Estrategia	Soporte	Humedad	Nutrientes	Nutrientes	Aw	Producción Penicilina G	Germi nación	CO2 total
	%	%	%	X		$\mu\text{g/g a}$	(h)	ml CO2 / columna
CASO 1	23.9	61.3	14.1	1.8	0.961	630	22.5	89,915
	18.7	66.3	15.2	1.9	0.969	788	22.5	63,663
	14.1	69.6	15.9	2	0.970	1,715	22.5	62,179
	10.3	73	16.6	2.1	0.970	2,929	21.5	66,078
CASO 2	12.5	62.2	25.5	3.2	0.954	3,949	66	44,290
	13	65.2	22.2	2.8	0.957	3,542	45	91,425
	14.1	68.7	15.9	2	0.962	2,699	47	63,890
	15.4	74.7	7.9	1	0.979	2,117	26	38,662
	16.1	79.5	3.9	0.5	0.985	1,340	25	28,789
CASO 3	19.7	57.2	22.2	2.8	0.944	1,574	46	150,571
	17.8	61.25	20.1	2.5	0.955	2,418	42	105,444
	16.6	64.7	18.7	2.3	0.966	4,253	36	73,535
	14.1	72.0	15.9	2.0	0.968	5,100	37	78,121
	11.0	75.5	12.4	1.5	0.974	7,198	32	23,342

Tabla 2. Efecto de la relación de los componentes del medio sólido sobre la producción de penicilina y el crecimiento de *P. chrysogenum* P-2.

De las cinéticas de log de producción total de CO₂ fue posible cuantificar dos velocidades específicas de producción de CO₂ (que son una medida indirecta del crecimiento), μ_1 (fase de crecimiento) y μ_2 (idíofase). En la Tabla 2 se observa que los cultivos con alta relación nutrientes/soporte produce una lenta μ primaria y una alta μ secundaria, mientras que los cultivos con alta relación agua/soporte y menor relación nutrientes/soporte genera μ primaria mayores pero μ secundarias menores, aunque proporcionales a la relación nutriente/soporte.

Cultivo	agua/ soporte	nutrientes /soporte	Aw	CO ₂ Total ml CO ₂ / columna	$\mu_1 \alpha$ (h ⁻¹)	$\mu_2 \alpha$ (h ⁻¹)
3	7	1.13	0.974	23,340	0.086	0.025
1	7	1.6	0.970	66,000	0.296	0.041
2	5	2	0.954	44,300	0.026	0.108

Tabla 3. Velocidades específicas de formación de CO₂ en las condiciones de máxima producciones de penicilina en FS. α Tasa específica de formación de CO₂.

1.3 Traducción de Resultados del Artículo B: "Efecto del Tamaño de Partícula del Soporte, la Densidad de Empaque y Agitación sobre la Producción de Penicilina en FS".

Tamaño de Partícula del Soporte

Se realizaron cultivos con soporte de diferente tamaño de partícula (retenida en malla (mesh) 10: 14 X 1.7 mm; 10-30 mesh: 5.9 X 0.85 mm y 30-50 mesh: 3.2 X 0.4 mm; las cuales fueron llamadas grande, mediana y pequeña). Las cinéticas de producción de penicilina fueron similares, excepto que en el cultivo con partículas grandes el período de producción duró diez horas más, alcanzando 1,680 $\mu\text{g/g}$ de materia seca, es decir 37% más que los otros dos cultivos (Fig. 1-B). Las cinéticas de pH y crecimiento fueron similares en todos los casos, así como la concentración de biomasa final. Se observó una diferencia importante en las cinéticas de concentración de azúcares reductores (Fig. 2-B), donde fue evidente una mayor concentración inicial en el cultivo con tamaño de partícula grande.

Se repitió el experimento usando bagacillo lavado para eliminar azúcares residuales en el material. En esta ocasión, las cinéticas de concentración de azúcares y de penicilina fueron parecidas en los cultivos con diferente tamaño de partícula (Fig. 3-B y Fig. 4-B), alcanzando 600 $\mu\text{g/g}$ en 54 h.

Densidad de Empaque

Se realizaron tres fermentaciones con diferente densidad de empaque (D1 = 0.23; D2 = 0.35; D3 = 38 g/ml). La producción de penicilina fue mas alta (20%) en el cultivo más empacado, debido a un mayor periodo de producción (entre las 54 y las 72 h). La concentración de penicilina en la fermentación D2 se incrementó ligeramente en ese periodo, mientras que en el cultivo D1 (menor densidad) la concentración de penicilina decreció.

No se detectaron diferencias significativas en las cinéticas de humedad, azúcares reductores y pH. La conidiación comenzó hacia el final de la fase de producción y fue inhibida de manera creciente a densidades de empaque crecientes (Fig. 5-B).

Agitación

Se comparó una fermentación estática (normal) con un cultivo en el que los reactores tubulares fueron desempacados en un vaso de precipitado estéril y mezclados perfectamente cada 24 h. En estos experimentos se utilizó el tamaño de partícula (5.9 mm) y densidad de empaque estándar. Los resultados (Fig. 6-B) mostraron 30% menos producción en el cultivo agitado. Sin embargo, se observó que las cinéticas de humedad fueron diferentes, inicialmente iguales, pero conforme transcurría el tiempo el cultivo agitado se hizo relativamente más seco. Se realizó un nuevo experimento en el que la pérdida de humedad calculada para cada punto (basada en el experimento previo), fue restituida al medio sólido desempaclado en forma de aerosol. En este caso, las cinéticas de producción fueron muy parecidas y la brecha en humedad se redujo (Fig. 7-B).

**1.3.1 SOBRETIRO ARTICULO B: EFFECT OF SUPPORT PARTICLE
SIZE, PACKING DENSITY AND AGITATION ON PENICILLIN PRODUCTION
IN SOLID STATE FERMENTATION.**

EFFECT OF PARTICLE SIZE, PACKING DENSITY AND AGITATION ON PENICILLIN PRODUCTION IN SOLID STATE FERMENTATION

JAVIER BARRIOS-GONZÁLEZ, HILDA GONZÁLEZ and ARMANDO
MEJÍA

*Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Apdo.
Postal 55-535, 09340 México*

ABSTRACT

The use of a large particle size (14 mm) support (sugar cane bagasse) increased penicillin production by solid state fermentation by 37 %, however this effect was due to a higher sugar concentration in this bagasse fraction. Cultures with closer packing densities (0.35) produced 20 % more penicillin. Agitation did not have a negative effect on production if moisture loss during the operation is restituted.

KEY WORDS: Penicillin, solid-state fermentation, particle size, packing density, agitation.

INTRODUCTION

Solid state fermentation (SSF) using an inert support impregnated with liquid medium is a relatively new method that has been applied to produce: cellulases (Roussos, 1991), pectinases (Dufour, 1990), and ethanol (Saucedo-Castafeda et al., 1992). Barrios-González et al. (1988) showed that this culture method can be an attractive alternative for penicillin production, since higher yields and productivities were obtained in relation to the conventional liquid submerged fermentation. The authors emphasize that an important factor limiting the exploitation of the system's potential is the lack of knowledge on fungal physiology in these solid media. Particle size, packing density and agitation are considered important variables in this culture system.

It is considered that, in SSF, smaller particle sizes provide a larger contact area with the fungus as well as with the gas environment. It also results in shorter pathways for diffusion of nutrients (Mudgett, 1986). This is particularly important in the SSF with impregnated inert support where nutrients diffuse from the center to the surface of the particles.

Oriol *et al.* (1988), studied growth kinetics of *A.niger* in this SSF system. The authors found that an increase in particle size produced a decrease of the growth rate in the deceleration phase of growth, and concluded that the depressive effect might be due to limitations caused by intraparticle diffusion of nutrients. This effect might favor secondary metabolite production since nutrient limitation triggers and maintains idiophase. Kumar and Lonsane (1987) reported an important increase in gibberellic acid production by using large particle size (3-4 mm) in a SSF system using wheat bran. However, the authors suggested that this effect was caused by an improvement in oxygen transfer caused by the large particle size.

Packing density is another parameter unique to SSF that can be an important process variable. It can be assumed that an increase in packing density causes a reduction in the void space between particles and a concomitant reduction in the area of exchange with the surrounding atmosphere.

Agitation prevents heterogeneity in the solid medium composition and in mycelial age. Movement breaks long mycelial nets, favoring shorter mycelia in similar physiological stages. Moreover, mixing can be a useful tool in research or process development since water, nutrients or pH controlling agents can be added to the culture. Agitation can also be used to improve gas exchange and to remove metabolic heat, thus controlling temperature. On the other hand, it has been reported that some fungi do not tolerate agitation in SSF (Mudgett, 1986). Although most koji processes in Japan are not greatly mixed, agitation on shakers or rotating vessels with circulating conditioned air is used in some enzyme processes (Toyama, 1976; Sisman, 1980) and has been particularly useful in mycotoxin production i.e. aflatoxin and ochratoxin (Hesseltine, 1977).

The aim of this work was to evaluate the effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in SSF.

Microorganisms

A reisolate of *Penicillium chrysogenum* Wis. 54-1255 was used in the fermentations. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was used as indicator organism in the bioassay. Strains were maintained freeze-dried. Working cultures were kept at -20°C in 20% glycerol, and one micro vial (Eppendorf) was used for inoculum production every experiment.

Media

B.subtilis was cultured in nutrient broth at 30°C. Triptose Soy Agar 1%, was used for the bioassay. For *P.chrysogenum*, spore inoculum was produced in Power solid medium: a mixture 1:1 of Csapect (Luengo et al., 1980) and FN1 (López-Nieto et al., 1985). The liquid growth and production medium used to impregnate the solid support was a modification of the one reported by Semerson et al. (1961). The original concentration was duplicated, 1.4% glucose added and phenylacetic acid concentration was made 7.4 mM. pH was adjusted to 6.65, which gave 6.5 after sterilization and in the solid medium.

Solid State Fermentation

The culture was achieved under non-aseptic conditions as previously described (Barrios-González et al. 1988). Column fermentors contained 12 g of sugar cane bagasse pith impregnated with the inoculated (2×10^6 spores/ml) liquid medium. Bagasse was ground and sieved (10-30 mesh) before pretreatment. In some experiments, different particle sizes were used. Incubation temperature was 25 °C and aeration rate was 2.4 l/h column.

Analytical Methods

Two complete columns were collected at every sampling time, and analyzed as described before (Barrios-González et al., 1988). Penicillin was extracted from SSF samples with phosphate buffer, 0.1 M pH 5.5 (when necessary, the pH was adjusted with H_3PO_4). 60

μ l of the extract or a convenient dilution was used for the bioassay. Production was expressed in μ g of penicillin G per g of dry fermented material. Biomass concentration was estimated by hydrolysis with 7 N HCl of the washed solid medium for 15 min at 121 °C. The amino acids in the supernatant were determined by a colorimetric reaction with ninhydrin (Oriol *et al.*, 1988). Spore concentration in the solid medium was determined in a water extract by means of a Neubauer chamber. Experiments were performed in duplicate and in at least 2 separate experiments. Variation within experiments, in SSF, were < 10% for penicillin production.

RESULTS

Support Particle Size

Three fermentations with different support particle sizes (retained on 10 mesh: 14 X 1.7 mm, 10-30 mesh: 5.9 X 0.85 mm and 30-50 mesh: 3.2 X 0.4 mm; which were called large, medium and small) were performed simultaneously. Similar penicillin production

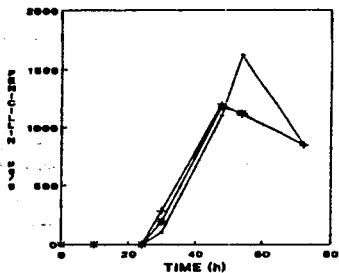


Fig. 1. Penicillin production kinetics by *P. chrysogenum* (Wis. 54-1255) in SSF, using different support (sugarcane bagasse) particle sizes: 14 (---), 5.9 (+) and 3.2 mm (*), with impregnated liquid medium.

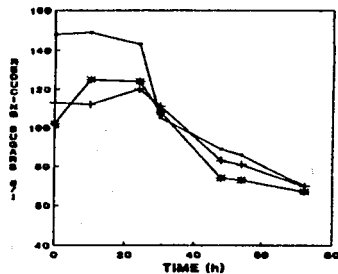


Fig. 2. Reducing sugars uptake kinetics in penicillin SSF, using different support particle sizes: 14 (---), 5.9 (+) and 3.2 mm (*), with impregnated liquid medium.

kinetics were obtained, except that in the culture with large particles production continued for 10 additional hours, reaching 1,680 $\mu\text{g/g}$ of dry medium, e.g. 37% more than the other two cultures (Fig 1). The pH and the growth kinetics were similar in all cases, as well as final biomass concentration. An important difference was observed in the reducing sugars concentration kinetics (Fig. 2), which showed higher initial concentration in the fermentation with large support particles.

The experiment was repeated using washed bagasse to eliminate residual sugars in the material. In this case, sugar concentration and penicillin production kinetics obtained with the different particle sizes were very similar (Fig. 3 and Fig. 4), reaching 600 $\mu\text{g/g}$ in 54 h.

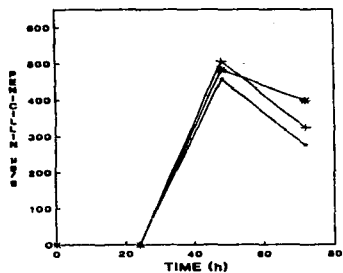


Fig. 3. Time course of penicillin production in SSF, using different washed bagasse particle sizes: 14 (---), 5.9 (+) and 3.2 mm (*), with impregnated liquid medium.

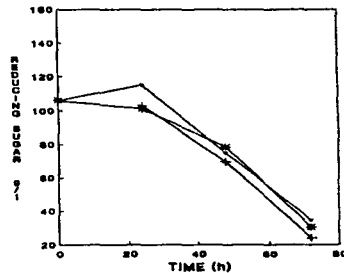


Fig. 4. Reducing sugars uptake kinetics, using different washed bagasse particle sizes: 14 (---), 5.9 (+) and 3.2 mm (*), with impregnated liquid medium.

Packing Density

Three fermentations with different packing densities ($D_1 = 0.23$; $D_2 = 0.31$; $D_3 = 0.35$ g/ml) were carried out simultaneously. Penicillin production was highest (20 %) in the most densely packed fermentation, due to a longer production period (between 54 and 72 h). Penicillin concentration, in the fermentation with D_2 , increased slightly in that period, while in the culture with D_1 (lower density) penicillin concentration decreased (Fig. 5).

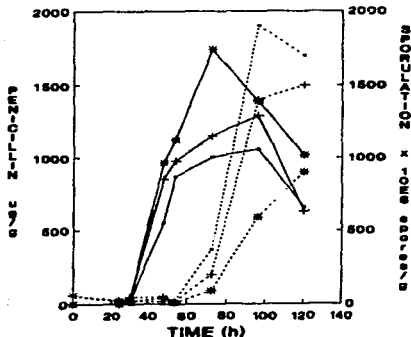


Fig. 5. Effect of support packing density on penicillin production (—) and conidiation (---) in SSP. 0.23 (—), 0.31 (+) and 0.35 g/ml (*).

No significant difference was detected in moisture content, reducing sugars or pH kinetics. However, an important effect was observed in sporulation kinetics. Conidiation started towards the end of the production phase and was increasingly inhibited at increasing packing densities (Fig. 5).

Agitation.

A normal static fermentation was compared with a culture where the column reactors were unpacked in a sterile beaker and thoroughly mixed every 24 h. The standard particle size (5.9 mm)

and packing density (0.31) were used in these experiments. The results (Fig. 6) showed 30 % less production in the agitated culture. However, it was observed that moisture content kinetics were different, initially equal, but as time passed the agitated culture became relatively more dry. A new experiment was performed where the calculated water loss at each point, (based on the previous experiment) was restituted to the unpacked solid medium in the form of a water spray. In this case, production kinetics were very similar (slightly higher in the mixed culture) and the gap in moisture content kinetics became smaller (Fig. 7).

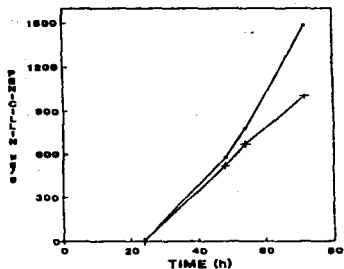


Fig. 6. Effect of agitation on penicillin production in SSF. Support particle size 5.9 mm and packing density 0.31 g/ml. Static (—) and agitated (once every 24 h) fermentation (+).

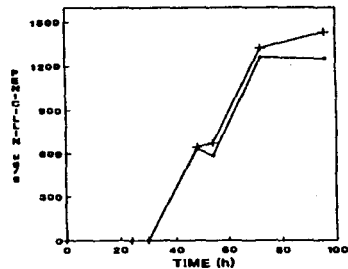


Fig. 7. Effect of restituting water loss during the agitation operation. Static (—) and agitated (once every 24 h) fermentation (+).

DISCUSSION

Higher production of penicillin (1,680 $\mu\text{g/g}$ vs 1,450 $\mu\text{g/g}$) was obtained in the solid state cultures with larger support particle sizes. However, further studies using washed bagasse showed that increased production was due to higher sugar content in that bagasse fraction and not to the particle size. This indicates that, in this SSF system and in the range of particle sizes used (0.4 - 1.7 mm), this parameter does not affect penicillin production.

Although packing density is another parameter unique to SSF, this variable is seldom studied in SSF processes. Increased penicillin production was obtained in the cultures with higher packing densities. The reason for this is unclear. It is probably related to the reduction in void space between particles and reduction in the area of exchange with the surrounding atmosphere. Space limitation for conidiophore formation might be the reason for the sporulation inhibition observed at high packing densities. It is possible that penicillin production increase obtained in this condition is related to sporulation inhibition.

Agitation of the solid culture once every 24 h had certain deleterious effect on penicillin production (66% lower) in SSF. It is shown that this effect is due to moisture loss during the mixing operation (unpacking the column reactor, mixing and packing). When water was restituted during agitation, no significant differences were observed. This indicates that mixing can be used as a tool for research or process development in this system since water, nutrients or pH-controlling agents can be added to the culture. As mentioned before, agitation can also be used to improve gas exchange and to remove metabolic heat.

Acknowledgments. This work was financed by IFS (Grant E/737-2) and SEP, México (Grant 8010441 & 900844).

REFERENCES

- Barrios-Gonzalez, J., Tomasini, A., Viniegra-González, G. and López, L. (1988). *Biotechnol. Lett.* 10 (11) 793-798.
DuFour, D. (1990) Thèse Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, France.
Hesseltine C. W. (1977) *Process Biochem.* 12 (6) 24-27.

- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. (1987). *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 267-271.
- López-Nieto, M.J., Ramos, F.R., Luengo, J.M., and Martín, J.F. (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 343-351.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R. and Martín, J.F. (1980). *J. Bacteriol.* **144** (3) 869-876.
- Mudgett, R.E. (1986). Solid State Fermentations. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, A.L. Demain and N. A. Solomon, eds. pp. 66-83, Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-González, G. and Rimbault, M. (1988). *J. Ferment. Technol.*, **66** (1) 57-62.
- Roussos, S., Rimbault, M., Viniegra-González, G., Saucedo-Castafeda, G. and Lonsane, B.K. (1991). *Micología Neotropical Aplicada* **4**, 83-98.
- Saucedo-Castafeda, G., Lonsane, B.K., Krishnaiah, M.M., Navarro, J.M., and Rimbault, M. (1992). *Process Biochem.* **27**, 97-107.
- Silman, R. W. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 411 - 420.
- Somerson, N.L., A.L. Demain and T.D. Nunheimer. (1961). *Arch. Biochem.* **93**, 238-241.
- Toyama, N. (1976) *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 207 - 219.

1.4 Efecto del Mezclado sobre la Producción de Penicilina y la Actividad Metabólica en *P. chrysogenum* P-2.

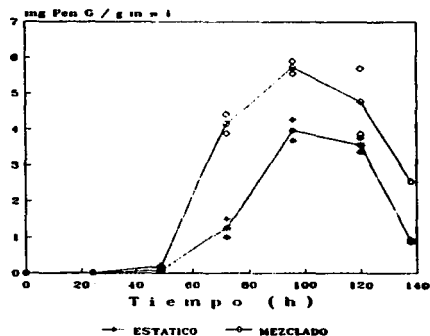


Fig. 6 Efecto del mezclado sobre la producción de penicilina por *P. chrysogenum* P-2 en FS.

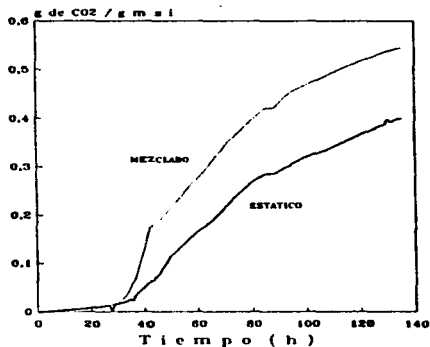


Fig. 7 Efecto del mezclado sobre la respiración (producción de CO₂ total/g de materia seca inicial) de *P. chrysogenum* P-2.

En experimentos más recientes se encontró que el mezclado tiene un efecto positivo sobre la producción de penicilina en la cepa P-2 (Fig. 6). En estas condiciones, también se observó un efecto estimulador sobre la actividad metabólica (Fig. 7). El aspecto del cultivo parece indicar que este incremento no refleja una mayor concentración de biomasa, sino una mayor actividad específica. Observaciones microscópicas mostraron que los micelios del cultivo mezclado son más cortos (aproximadamente 200 μ en lugar de 500 μ) y con una mayor frecuencia de ramificación (ramificaciones cada 67 μ \pm 25, contra cada 246 μ \pm 70 en el cultivo estático o control), siendo los diámetros similares (2.8 μ). Los datos anteriores corresponden a las muestras de 140 h y son la media de 25 determinaciones.

Aparentemente, los efectos del mezclado dependen de la cepa, tema que es examinado con detalle a continuación.

2. Factores Nutricionales

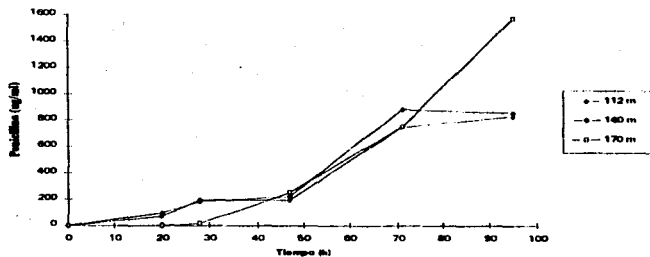
2.1 Efecto de la Glucosa y Regulación de la Biosíntesis de Penicilina en FS y en FSm.

Sistema de FS para Estudios de Regulación

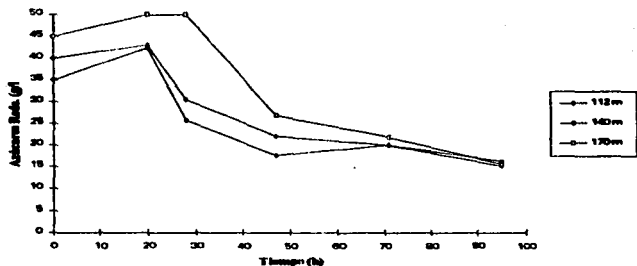
En esta parte del proyecto se establecieron las condiciones para realizar estudios de regulación en FS. Estas condiciones incluyeron el uso de un medio definido y la eliminación de los azúcares residuales del bagacillo. Las condiciones óptimas encontradas para eliminar los azúcares fueron las siguientes: adicionar 40 ml de agua destilada a 80°C por cada gramo de bagacillo tamizado seco y agitar durante 15 min y filtrar. La operación se realiza cuatro veces.

Regulación por Carbono en Medio Líquido

En esta sección se realizó un estudio comparativo sobre el efecto regulador de la glucosa en la síntesis de penicilina por, *P. chrysogenum*, P-2, en FS y en medio líquido. En los experimentos iniciales de FSm, se suplementó el medio líquido de producción (conteniendo de 3 % de lactosa) con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (112, 140 y 170 mM), en condiciones de C/N variable. En la Fig. 8a se observa que en el cultivo con mayor concentración de glucosa el inicio de la síntesis de penicilina sufre un retraso de alrededor de 15 h, al no encontrarse producción a las 20 y 28 h. El hecho de que el efecto regulador sólo se manifieste en ese periodo se puede explicar al observar la cinética de consumo de azúcares reductores (Fig 8b), ya que las concentraciones de azúcares son ya relativamente bajas a las 47 h y la diferencia de concentración entre tratamientos se va reduciendo hasta llegar a concentraciones similares a las 71 h.



A



B

Fig. 8 Producción de penicilina (a) y consumo de azúcares reductores (b) durante el crecimiento de *P.chrysogenum* P-2 en fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.

Pensando en la fuente de variación adicional que representa el modificar la cantidad de nutrientes en la FS (disminución de contenido de soporte así como cambios en densidad y capacidad de retención de agua del medio sólido), y que eventualmente se compararía el efecto en ambos sistemas, se estudió el efecto de la glucosa en medios con una concentración de nutrientes constante (C/N constante).

Se realizó un experimento similar al anterior, con la diferencia de que se mantuvo constante la concentración de fuente de carbono total (relación C/N). Es decir, al aumentar la concentración de glucosa se redujo proporcionalmente la concentración de lactosa. En estas condiciones, se observó un efecto muy parecido al arriba descrito, el cual sólo fue notorio durante la parte inicial del cultivo. En la Fig. 9a se observa que el periodo comprendido entre las 4 y las 19 h es crítico pues es en el que se manifiesta el efecto regulatorio de la glucosa. La síntesis de penicilina se inicia a las cuatro h en los cultivos con 56 y 140 mM de glucosa inicial, mientras que en el cultivo con 170 mM la síntesis inicia a las 20 h.

En estos experimentos se cuantificó la concentración de glucosa en el medio de cultivo a los diferentes tiempos de muestreo. Al examinar la cinética de consumo (Fig. 9b) se encontró que, al iniciar la síntesis, el cultivo con 56 mM contiene 10 g de glucosa/l, mientras el cultivo con 140 mM contiene 21 g de glucosa/l. Quince h después, el cultivo con 170 mM inicia la síntesis, con una concentración de glucosa de 14.3 g/l. También es posible ver que, cuando el cultivo con 140 mM inicial contiene 28 g de glucosa y la síntesis se encuentra reprimida.

Ya que la concentración máxima de glucosa que produjo desrepresión fue 21 g/l y la mínima que causó represión fue 28 g/l, se estimó que el umbral regulatorio se encuentra, en estas condiciones, entre 20 y 28 g de glucosa/l.

Por otro lado, la Fig. 9c indican que el perfil de biomasa no muestran diferencias importantes entre tratamientos, en el periodo entre las 4 y las 20 h. En la Fig. 9d se observa que no hay diferencias de pH entre los cultivos con 140 mM y con 170 mM, que son con los que se estimó el umbral.

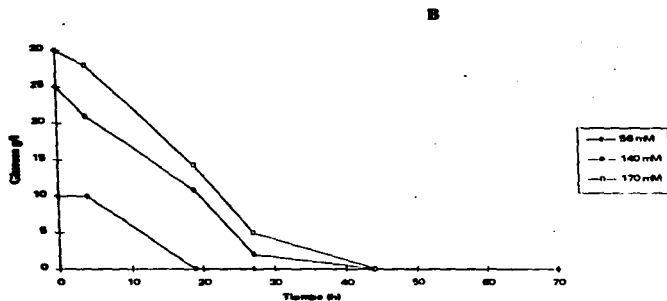
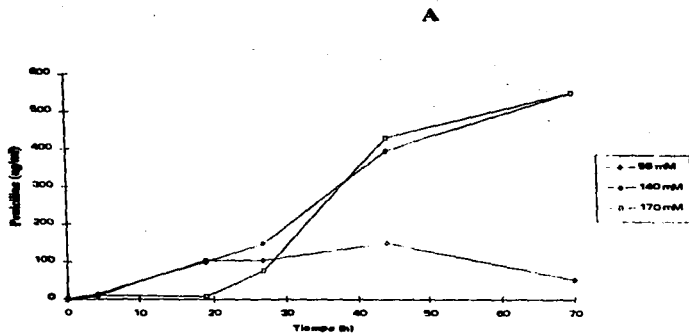


Fig. 9 Producción de penicilina (a) y consumo de glucosa (b) de *P. chrysogenum* P-2 en fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.

ESTA COPIA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

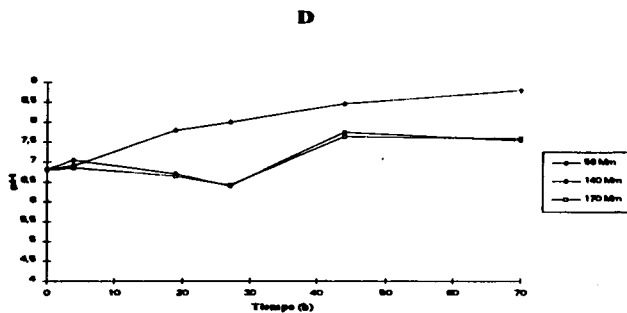
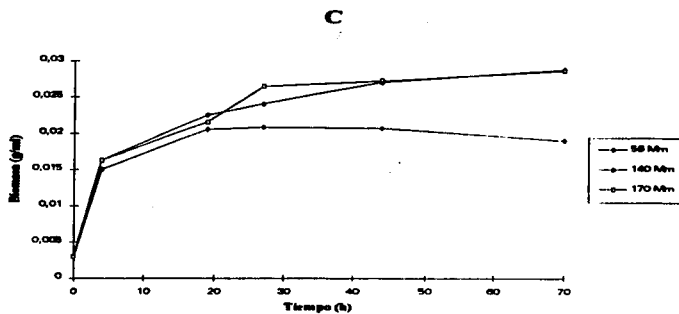


Fig. 9 Crecimiento (c) y variación de pH (d) durante el cultivo de *P. chrysogenum* P-2 en fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.

Regulación por Carbono en Fermentación Sólida

Inicialmente se realizaron experimentos con C/N variable (concentración de lactosa constante) y altas concentraciones de glucosa (222, 334, 502 y 782 mM), pensando que la producción no se afectaría fácilmente. En el cultivo con la concentración mayor no se detectó síntesis de penicilina, en el de 502 mM el inicio se retrasó hasta las 85 h. Además de estas observaciones, se confirmó que el cambio de relación bagacillo/nutrientes/agua ocasionaba fuertes diferencias en densidad y aspecto del material, por lo que se siguió con la estrategia de usar un contenido fijo de nutrientes (azúcares) en los diferentes tratamientos y de utilizar concentraciones menores de glucosa.

Se realizaron experimentos con C/N constante de manera análoga a lo realizado en medio líquido, probando concentraciones de glucosa por debajo de 224 mM.

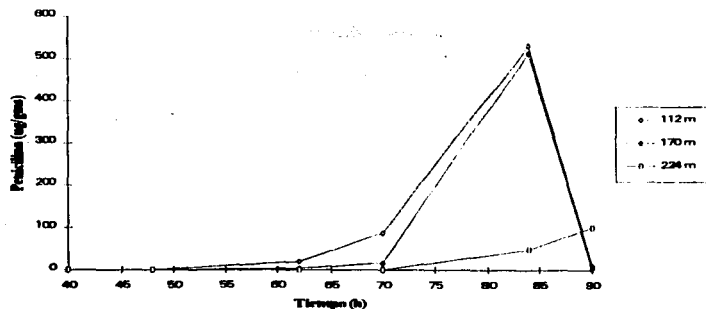
En estos experimentos, se observaron tasas de producción lentas seguidas por tasas rápidas, en lo que parece una desrepresión parcial y una desrepresión total de la síntesis (Fig. 10a). Se puede decir que el periodo crítico es el comprendido entre las 70 y las 84 h, ya que los cultivos con 112 y 170 mM se encontraban totalmente desreprimidos con concentraciones de glucosa por debajo de los 14.8 g/l (Fig. 10b). En ese periodo, el cultivo con 224 mM estaba parcialmente desreprimido, con concentraciones de glucosa que van de 38 g/l a 20.7 g/l. Es importante notar que en el periodo anterior este cultivo se encontraba reprimido con concentraciones de glucosa entre 38 y 36 g/l.

Entonces, la concentración máxima de glucosa con desrepresión de la síntesis fue 14.8 g/l, mientras la concentración mínima con represión fue 36 g/l. Por lo tanto, se estimó que el umbral regulatorio en este sistema se encuentra entre 15 y 36 g de glucosa/l.

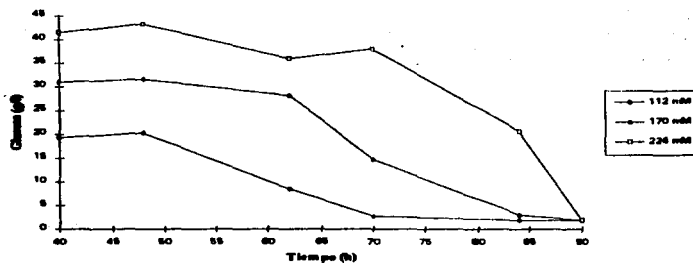
Tampoco en este caso muestran, los valores de pH de los cultivos, diferencias importantes (Fig. 11a), lo mismo que las cinéticas de humedad. Este último parámetro se comportó de una manera normal para estas condiciones (bagacillo lavado y medio sintético): bajan ligeramente hasta las 70 h y después comienzan a subir hasta el final (Fig. 11b).

La concentración de biomasa parece cercanas después de las 70 h (Fig 11c), aunque hay que recordar que este método de cuantificación de biomasa (gravimétrico) no es muy confiable.

Sobre la tasa o velocidad de consumo de glucosa, es posible observar (Tabla 4) que ésta sube al incrementarse la concentración inicial del azúcar en FS. Sin embargo, el fenómeno es parecido en FSm aunque menos acentuado.

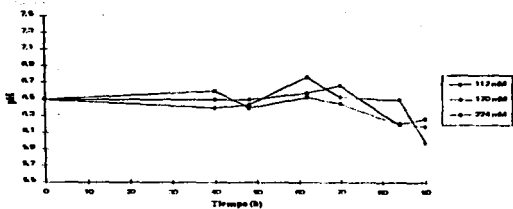


A

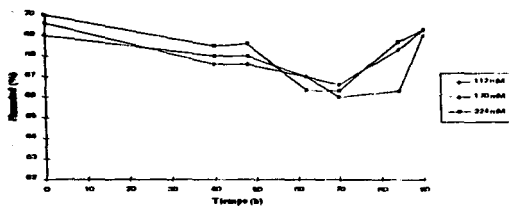


B

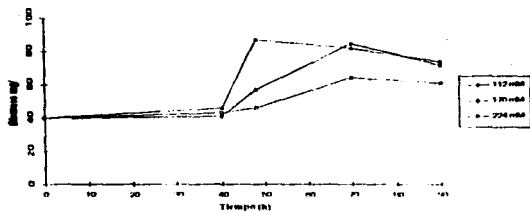
Fig. 10 Producción de penicilina (a) y consumo de glucosa (b) durante el crecimiento de *P. chrysogenum* P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante). La concentración de glucosa se da en g/l, ya que se considera que este efector se encuentra disuelto en el agua absorbida en el medio sólido.



A



B



C

Fig. 11 Cinéticas de pH (a), humedad (b) y concentración de biomasa (c) (método gravimétrico) durante la producción de penicilina en FS.

Sistema	Condiciones Iniciales	Periodo (h)	Tasa de Consumo de Glucosa (g/l*h)
Fermentación Sumergida	56 mM	4 a 19 h	0.66
	140 mM	0 a 27 h	0.85
	170 mM	0 a 27 h	0.92
Fermentación Sólida	112 mM	48 a 70	0.84
	170 mM	62 a 84	1.14
	224 mM	70 a 90	1.84

Tabla 4. Cálculo aproximado de las tasas de consumo de glucosa en FSm y FS con diferentes concentraciones iniciales del azúcar.

Otros Mecanismos Regulatorios de la Biosíntesis de Penicilina

Recientemente hemos comenzado a estudiar la retrorregulación (o "feed back") por penicilina en FS. Es decir la regulación que ejerce la penicilina sobre su propia síntesis. Para esto se ha seguido la estrategia de adicionar diferentes concentraciones de penicilina V, como efector, desde el tiempo cero y determinar la síntesis de penicilina G. Ambas penicilinas se separan y cuantifican por HPLC.

Resultados iniciales, utilizando *P. chrysogenum* P2-2, mostraron un claro efecto regulatorio que se manifestó como una depresión en la síntesis a una concentración inicial de 5,000 µg/ml, mientras que este fenómeno no se observó en cultivos con concentraciones iniciales de 1,000 y 2,500 µg/ml (Fig. 12). La Fig. 13 muestra la estabilidad de la penicilina V durante estos experimentos.

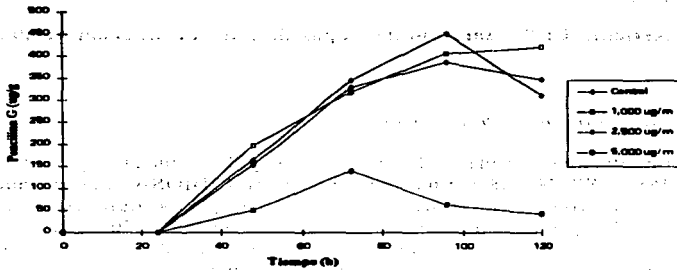


Fig. 12 Producción de penicilina G por *P. chrysogenum* P-2, en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de penicilina V. La concentración de penicilina V se da en µg/ml por considerarse que este efector se encuentra disuelto en el agua absorbida en el medio sólido.

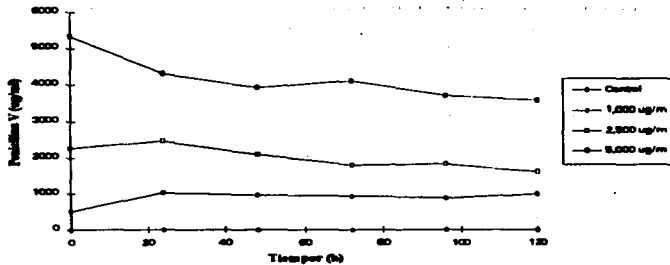


Fig. 13 Estabilidad de la penicilina V (exógena) durante el cultivo de *P. chrysogenum* P-2 en FS.

3. La Cepa y el Nivel de Producción.

3.1 Resultados Artículo C: "Desarrollo de Cepas de Alta Producción de Penicilina para FS".

Producción de Penicilina por Diferentes Cepas

Se realizaron fermentaciones sólidas y líquidas (sumergidas) con las siguientes cepas: Wisconsin 54-1255, ASP-78, R8 y una cepa industrial CIBIOSA. Las producciones máximas obtenidas en fermentación sumergida FSm fueron 9,804 µg/ml con CIBIOSA, 830 µg/ml con P-2, 783 µg/ml con ASP-78, 633 µg/ml con R-8 y 560 con Wisconsin. La Fig. 1-C muestra las cinéticas de producción en FS. La Fig. 2-C ilustra la tendencia de las cepas más productoras (en FSm), de alcanzar las mayores producciones en FS. Los tiempos para alcanzarlas variaron entre cepas, pero siempre fueron más cortos en FS.

Comportamiento Comparativo (Sólido vs. Líquido)

Se calculó la producción relativa y la productividad relativa para las cinco cepas (Fig. 3-C)

La primera observación importante es que la producción relativa fue diferente para cada cepa, con valores entre 1.4 a 2.5. En términos generales las cepas de mayor producción (en FSm) mostraron producciones relativas (PS/PL) y productividades relativas menores. Los tiempos relativos no variaron mucho: 0.45 para Wisconsin; 0.63 para R-8 y 0.65 para P-2 y 0.7 para ASP-78.

Comportamiento Comparativo de los Clones

Aislamiento de los Clones. Para explorar las características de la población que constituye cada cepa (revertantes, mutantes espontáneas, cambios en ploidía, etc.), se aislaron 40 clones (colonias que mostraron diferente producción en cilindro de agar) de cada cepa excepto la de CIBIOSA (la cual no se utilizó más).

Los clones de cada cepa fueron evaluados para producción de penicilina en cilindro de agar, y se seleccionaron dos clones de alta producción, dos de media y dos de baja producción en ese sistema. Se realizaron cinéticas de producción de penicilina en FS y FSm para cada cepa.

Comportamiento Relativo. Considerando todos los clones como un grupo, se observó un rango mucho mayor de PS/PL, comprendiendo desde 0.6 a 16.7. De hecho desde 0.1 si se considera al clon 7 de P-2. Este clon fue el segundo mejor productor en FSm, pero creció y produjo muy poco en FS (Tabla 1-C). Debido a que los periodos de producción fueron generalmente más cortos, las productividades relativas mostradas por los clones estuvieron entre 0.1 y 29 veces más altas en FS. El intervalo de tiempos relativos

encontrados en los clones fueron ligeramente más altos que los encontrados en las cepas. Es interesante notar que se encontraron tiempos relativos de 1.1 y 1.3 en algunos clones de P-2, i.e. periodos de producción ligeramente mayores en FS. Otro resultado importante fue que se obtuvieron algunas muy altas productoras de penicilina en medio sólido (ver Los Mejores Clones para FS).

Producción en Sólido vs Producción en Líquido. Entre los clones de cada cepa se observó lo que parece una relación inversa entre la producción en sólido y la producción en líquido. Cuando la producción en FS de cada clon de una cepa se graficó contra su producción en FSm, se obtuvieron coeficientes de correlación de relativamente bajos (0.127 a 0.761). Este hecho puede verse de otra manera. En la Tabla 2-C se observa que el mejor clon para FS (de cada cepa) es generalmente el peor para FSm. De manera inversa, los mejores clones para FSm son los peores en FS. Esta tendencia no se aplicó a la cepa ASP-78, ya que en este caso la relación fue directa (R-Cuadrada 0.566). Es interesante notar que esta cepa fue también la más heterogénea, mientras que la R-8 fue la más homogénea. Esto indicado por la diferencia en características de producción de sus clones (Tabla 1-C).

Mejores Clones para FS.

Considerando todos los clones juntos, 4 de las mejores 5 productividades relativas se encontraron en clones derivados de Wis (Figs. 4-C & 6-C). Sin embargo, los clones más productivos en FS fueron el clon 20 de ASP-78, el clon 4 de P-2, el clon 6 de Wis y el clon 9 de P-2. En otras palabras, la mayor parte provino de cepas de alta producción (en FSm). Es más, los mejores productores de penicilina en FS también derivaron de cepas de alta producción (en FSm), y presentaron valores de PS/PL notablemente altos (Tabla 3-C).

Es interesante notar que las producciones de penicilina, en FS, de estas clones sobreproductores, representan incrementos de producción mayores de 500%, en relación a la producción de las cepas parentales correspondientes (Tabla 1-C).

**3.1.1 SOBRETIRO ARTICULO C: DEVELOPMENT OF HIGH
PENICILLIN PRODUCING STRAINS FOR SOLID STATE FERMENTATION**

DEVELOPMENT OF HIGH PENICILLIN PRODUCING STRAINS FOR SOLID STATE FERMENTATION

JAVIER BARRIOS-GONZÁLEZ, TERESA E. CASTILLO and
ARMANDO MEJÍA

Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Apdo.
Postal 55-535, 09340, México

ABSTRACT

Penicillin production with an industrial strain and 4 strains of *P. chrysogenum*, in solid state fermentation (SSF) and liquid submerged fermentation (LSF), was determined. Their ability to produce the antibiotic in SSF in relation to their capacity to do so in LSF was evaluated. This was done by calculating the ratio PS/PL (production in SSF/production in LSF), which was called relative production. Clones were isolated from each strain and evaluated in a similar way. The strains presented different relative productions (from 1.4 to 2.5). Within the clones, a much wider range of relative productions was observed (0.6 to 16.7). On the other hand, the highest-producing strains in LSF were also the highest producers in SSF. This indicates that the production potential of a strain is an important factor in its production level in SSF. Moreover, the highest penicillin producing clones (9,500 to 10,500 µg of penicillin/g were generated from high-yielding strains (P2 and ASP-7B). However, the higher-producing strains (in LSF) showed lower relative performance, suggesting that higher producing strains tend to express less efficiently their potential in SSF. In this study, several overproducing clones, particularly suited for SSF, were obtained by the procedures followed. Production increases of 500 to 600 %, in this culture system, were achieved.

Key Words: *Penicillium chrysogenum*, penicillin production, solid-state fermentation, liquid fermentation, strains and clones, screening, improvement.

INTRODUCTION

One of the major positive aspects of solid state fermentation (SSF) (specially when molds are involved) is that metabolites are, in most cases, produced at much higher yield than by liquid submerged fermentation (LSF) (Hesseltine, 1982; Lindentseher & Clegler, 1975; Ghildyal *et al.* 1985; Barrios-González *et al.* 1988; Barrios-González *et al.* 1990a). However, these

comparative studies have been performed with relatively low-yielding strains, which are closer to the wild type than to the hyperproducing mutants used in modern liquid fermentation industry. It is difficult to imagine that a high-yielding strain (developed for LSF) will produce several times more in SSF.

The problem of obtaining adequate strains for this culture system has not attracted researchers' attention. It has been intuitively considered that obtaining a high-producing-conventional strain (for LSF) and using it in a SSF process would give the desired results. That is, the strain would produce more, keeping all the advantages associated with SSF.

It may be speculated that high producing strains, developed for LSF, are in certain ways specialists for this culture system, therefore their performance in SSF would very probably be poor. In other words, these microorganisms would have lost, during their genetic improvement, certain characteristics or capacities that allow good growth and performance in SSF, which is the natural habitat of fungi and actinomycetes. In fact there is a lack of information regarding the relationship between the microbial strains and the culture system used. It is not known if all the strains can produce more in SSF or even if all can produce and/or grow in both systems.

Recent reports on enzyme production seem to support the idea that good producers in LSF are generally poor producers in SSF. Shankaranand *et al.* (1992), working with alpha-amylase-producing strains of *Bacillus*, found that of 51 strains studied, 42 did not grow on wheat bran in SSF. Of the strains that did grow in SSF, 2 did not produce the enzyme in this system. Three strains were able to produce the enzyme in SSF as well as in LSF. The authors concluded that high producers in LSF were poor producers in SSF. However, this is not seen in the data presented since one of the two highest-producers in SSF was a high producer in LSF (*B. licheniformis* M27). This work shows that not all the strains, at least of *Bacillus*, can grow in SSF. Also, that discrepancies in production level in these fermentation systems indicate the need for intensive screening to select potent cultures particularly suited to the system concerned. An important conclusion is that the cultures that are good producers in LSF can not be relied upon to perform well in SSF. However, *Bacillus* might be an extreme case since it is a bacterium. It is important to note that solid medium is the natural habitat for molds and actinomycetes, so their behavior might be quite different.

Antler *et al.* (1991) stressed the importance of water activity in SSF and developed a selective agar medium with low water activity (A_w 0.96), pectin and 2-deoxy-glucose. Lowering A_w was obtained by adding ethylene glycol. In this medium the authors selected pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* particularly adapted to SSF. Derepressed mutant strains that hyperproduced pectinase were also obtained using a similar medium with higher A_w (0.999). Six A_w 0.99 mutant strains were obtained, from which 3 strains produced higher litres of the enzyme in LSF. It was found that all of them had decreased pectinase production in SSF. All the A_w 0.96 mutants obtained (four) presented increased SSF and LSF activity. Nevertheless, production increases were greater in the solid medium (63% in 2 strains).

Probably the main interest of this work is that an effort begins to be directed towards detecting the particular characteristics that allow a strain to perform well in SSF, and towards applying this information to the development of rational screening methods for these mutants.

In relation to secondary metabolite production, Kumar & Loneane (1987) obtained encouraging results in gibberellic acid production by SSF, except for the inconsistency of the metabolite yields. This inconsistency was attributed to the strain so the authors tested 5 strains of *Gibberella fujikuroi* and 5 of *Fusarium moniliforme*. They selected *G. fujikuroi* P-3 due to its capacity to produce consistent yields of gibberellic acid in SSF. This shows that production inconsistency might not be due to medium heterogeneity in SSF, but is an intrinsic characteristic of some strains. Consistent yields and product stability at the end of the fermentation will probably be part of the phenotype profile selected for when developing strains for SSF.

The first objective of the new work presented here was to find out if the better performance (higher penicillin production in shorter times) observed in SSF is due to the culture system or if intrinsic characteristics of the strain employed play an important role. If this was the case, we planned to obtain information regarding to what makes a strain perform well in SSF and what procedures should be followed to generate special strains for SSF. The ability of different strains to produce the antibiotic in SSF in relation to their capacity to produce it in LSF was evaluated. This was done by calculating the ratio PS/PL (production in SSF/production in LSF), and was called relative production. PS/PL may be interpreted as the amount production in SSF is greater than production in LSF.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms. The following strains of *Penicillium chrysogenum* were used in the fermentations: Wisconsin 54-1255, ASP-78, R8, P2 (ATCC 48271) and an industrial strain CIBIOSA. Wis and ASP-78 were kindly provided by Dr. J.F. Martín (Universidad de León, Spain), while R8 is a mutant resistant to phenylacetic acid obtained in earlier work (Barrios-González et al. 1990b). P2 was obtained from ATCC. Experiments with CIBIOSA strain were performed within the company's laboratories. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was used as indicator organism in bioassay. Strains were maintained freeze-dried. Working cultures were kept at -20°C in 20% glycerol, and one micro vial (ependorf) used for spore inoculum production for each experiment.

Media. *B. subtilis* was cultured in nutrient broth at 30°C. Triptose Soy Agar 1%, was used for the bioassay. For *P. chrysogenum*, spore inoculum was produced in Power solid medium: a mixture 1:1 of Czapeck production medium (Luengo et al., 1980) and Pflü medium (López-Nieto et al., 1985). The complex growth and production media reported by Somerson et al. (1961) were used for liquid submerged fermentations with *P. chrysogenum* P2, R8 and Wisconsin. For ASP-78, growth and production media reported by Luengo et al (1980) was employed. The medium used for CIBIOSA strain is the one they call diluted production medium and is used in the company to perform rapid fermentations to evaluate raw material. It consists

of lactose, pharmaceuticals, corn steep liquor and Ca CO_3 in concentrations that do not differ greatly from the other media.

The media used to impregnate the solid support for SSF was a modification of the production media mentioned before. The original concentrations were duplicated, 1.4% glucose added and phenylacetic acid concentration fixed at 7.4 mM. pH was adjusted to 6.65 which gave 6.5 after impregnating the solid medium.

Production in Agar Disks. For production evaluation in agar disks, 30 ml of the medium (Power) were used per petri dish (9.5 cm). Cylinders were cut with an 8 mm punch, and placed in a sterile empty petri dish. Cylinders were inoculated in the center with spores from a colony with a sharp tooth pick. The dishes were sealed with parafilm and incubated until sporulation (around 4 days), production was measured by direct bioassay of the cylinders.

Liquid Fermentation. For liquid submerged fermentations, 50 ml of growth medium in 250 ml erlenmeyer flasks were inoculated with 10^6 spores/ml. Flasks were incubated at 25°C for 40 to 60 hrs (depending on the strain) at 250 rpm. Five ml of this culture were used to inoculate 45 ml of production medium in 250 ml erlenmeyer flasks, which were incubated (250 rpm) at 25°C .

Solid State Fermentation. The culture was achieved under non-aseptic conditions as previously described (Barrios-González *et al.*, 1988). Column fermenters contained 12 g of sugar cane bagasse pith impregnated with the inoculated (2×10^6 spores/ml) liquid medium. Bagasse was ground and sieved (10-30 mesh) before pre-treatment. The incubation temperature was 25°C and the aeration rate 2 l/h column.

Analytical Methods. In liquid fermentations 2 flasks were collected at every sampling time. Cultures were filtered and biomass estimated by dry weight. Penicillin was determined by bioassay using 60 μl of the filtrate. In a similar way, 2 complete solid fermentation columns were collected at every sampling time, and analyzed as described before (Barrios-González *et al.*, 1988). Penicillin was extracted from SSF samples with phosphate buffer 0.1 mM pH 5.5 (if necessary, pH was adjusted with H_3PO_4) by centrifugation 20 min at 1700 rpm. Sixty μl of the extract or a convenient dilution were used for the bioassay. Production was expressed in μg of penicillin G per g of dry fermented material. Biomass concentration was estimated by dry weight. All experiments were performed in duplicate.

Definition of Parameters. As mentioned before, the ability of a strain to produce penicillin in SSF in relation with the capacity to do so in LSF was evaluated by calculating certain parameters. Relative production was defined as the ratio of production in solid/production in liquid or PS/PL. This parameter may be interpreted as the number of times the production in one gram of dry solid medium (in SSF) is greater than the production in one ml in LSF. It may be assumed that 1 ml weighs 1 g to obtain an adimensional parameter, or consider ml/g to be the units. In this last case, the parameter could be interpreted as the number of ml of LSF that produce the penicillin found in one gram of SSF. This parameter is not intended to be an absolute measure since other criteria may be used (concentration in SSF may be given in $\mu\text{g}/\text{ml}$ of moisture or both concentrations given in $\mu\text{g}/\text{ml}$ of reactor, etc.) and different values are obtained. In a similar way relative productivity = productivity in solid ($\mu\text{g}/\text{g}^*\text{h}$) / productivity in liquid ($\mu\text{g}/\text{ml}^*\text{h}$); relative time = time to reach peak production in SSF / time to reach peak

production in LSF. These parameters indicate what was called the relative performance of a strain. Relative productivity gives an idea of how many times is the SSF process more productive. Relative time indicates in what fraction of the time required for peak production in LSF is the maximal production in SSF reached.

Production potential was considered to be the theoretical production limit in SSF, an unknown value related to the level of production obtained in LSF. Although the former value is not known, it was considered to be several times higher than the production in LSF and would be the product of multiplying peak production in LSF by a theoretical relative production. The value of this last parameter is also unknown but would be greater than 16.7 (which is the highest determined in this work).

RESULTS

Penicillin Production by Different Strains

Penicillin fermentations were performed in liquid submerged and solid state fermentation using the following strains: Ws 54-1255, ASP-78, R6, P2 and an industrial strain CIBIOSA. Peak productions obtained in LSF were: 9, 804 $\mu\text{g/ml}$ by CIBIOSA; 830 $\mu\text{g/ml}$ by P-2; 783 $\mu\text{g/ml}$ by ASP-78; 633 $\mu\text{g/ml}$ by R-6 and 560 $\mu\text{g/ml}$ by Wisconsin. Fig. 1 shows the production kinetics in SSF. Fig. 2 illustrates the tendency of higher-producing strains (in LSF) to reach the highest yields in SSF. Times for maximal production varied among strains, but were always shorter in SSF.

Comparative Performance (Solid vs Liquid)

Relative production and relative productivity were calculated for the 5 strains (Fig. 3).

The first important observation is that relative production was different for each strain, ranging from 1.4 to 2.5. In general terms, higher producing strains (in LSF)

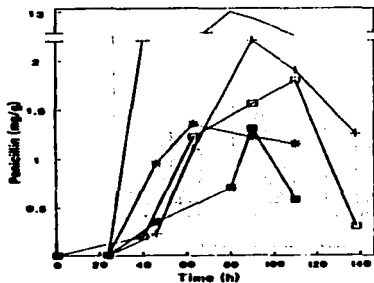


Fig. 1. Time course of penicillin production in SSF by different strains of *P. chrysogenum*. CIBIOSA (-), P2 (+) ASP-78 (■), R6 (□), Ws 54-1255 (*)

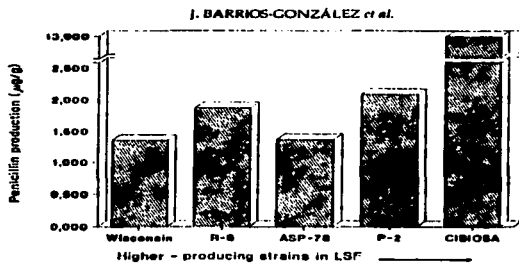


Fig 2. Peak penicillin production in SSF by strains of *P. chrysogenum* with different production level in LSF.

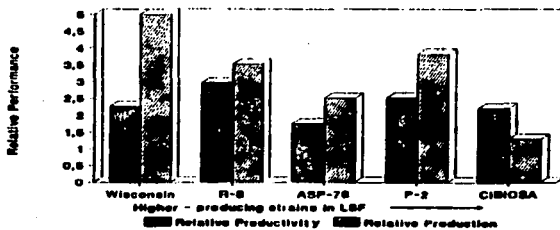


Fig 3. Relative performance of strains of *P. chrysogenum* of different production level in liquid fermentation.

gave lower relative productions (PS/PL) and relative productivities. Relative times did not vary greatly: 0.45 for Wisconsin; 0.6 for CIBIOSA; 0.63 for R-8; 0.65 for P-2 and 0.7 for ASP-78.

Comparative Performance of Clones

Isolation of Clones. To explore the characteristics of the population that constitutes each strain (revertants, spontaneous mutants, changes in ploidy, etc.), 40 clones were isolated from each strain, except CIBIOSA (since no further work was preformed with this strain). Clones were colonies isolated on agar plates that had been inoculated with a spore suspension. Clones of each strain were screened for penicillin production in agar disks and 2 high, 2 medium and 2 low producers (in agar disk) were selected. Penicillin production kinetics, in SSF and LSF, were performed for each clone of each strain (not shown).

Comparative Performance. Considering all the clones as a group, a much wider range of PS/PL was observed, ranging from 0.8 to 16.7. In fact, from 0.1 if clone 7 of P2 is considered. This clone was the second best producer in LSF, but grew and produced very poorly in SSF (Table 1). Since production periods in SSF were usually shorter, relative productivities showed by the clones ranged from 0.1 to 29 times more productive in SSF. The range of relative times found with the clones was slightly greater than the one observed in the strains. It was interesting, though, that relative times of 1.1 and 1.3 were observed in some clones of P2, i.e. slightly longer production periods in SSF. Another important result was that some very high penicillin producers (in SSF) were obtained (see Best Clones for SSF).

Table 1. Comparative performance (SSF/LSF) of the clones derived from each strain of *P. chrysogenum*

ORIGINAL STRAIN	CLONES		
	RANGE OF PS/PL _a	RANGE OF RELATIVE PRODUCTIVITY	RANGE OF TS/TL _c
P2	0.1 - 10.8	0.08 - 8.4	0.50 - 1.34
R8	2.2 - 5.1	2.9 - 6.7	0.67 - 0.76
ASP-78	0.6 - 15.4	1.3 - 29.0	0.43 - 0.59
Wis b	5.76 - 16.7	7.8 - 25.0	0.46 - 0.66

a: Relative production = production in SSF / production in LSF; b: Wisconsin 54-1255; c: relative time.

Table 2. Performance in LSF of the best clone (of each strain) in SSF, and performance in SSF of the best clone in LSF.

STRAIN	BEST CLONE IN SSF	PERFORMANCE IN LSF	BEST CLONE IN LSF	PERFORMANCE IN SSF
Wis	# 6	worst	# 15	worst
R8	# 12	worst	# 14	worst
P-2	# 4	4 of 5	# 17	3 of 5
ASP-78	# 20	best	# 20	best

Production in Solid vs Production in Liquid. Among the clones of each strain, what seemed an inverse relation was observed between production in SSF and production in LSF. Clones that showed high production in SSF tended to show low production in LSF. This inverse relation was far from perfect. When production in SSF of each clone of the strain was plotted against its production in LSF, correlation coefficients of 0.127 for Wisconsin, 0.157 for P-2, 0.567 for ASP-78 and 0.761 for R-8 were obtained. However, this fact can be further illustrated by Table 2. It is observed that the best clone for SSF (of each strain) is generally the worst for LSF. Conversely, the best clones for LSF are the worst for SSF. This relations did not apply to clones of ASP-78, since in that case the relation was direct (R-Square 0.566). It is interesting to note that this was also the most heterogeneous strain, while R-8 was the most homogeneous. Indicated by the difference in production characteristics of the clones (Table 1).

Best Clones for SSF

Considering all the clones together, it is observed that 4 of the best 5 relative productivities were found in clones derived from Wis (Figs 4 & 6). However, the most productive clones in SSF were clone 20 from ASP-78, clone 4 from P2, clone 6 from Wis and clone 9 from P2. In other words, the majority came from high producing strains (in LSF). Moreover, the highest penicillin producers in SSF also were derived from high producing strains (in LSF) and presented notably high PS/PL values (Table 3).

It is interesting to note that penicillin yields in SSF of these high-producing clones represent production increases greater than 500 % when compared to the production of the corresponding parental strain (Table 3).

HIGH PENICILLIN PRODUCING STRAINS

533

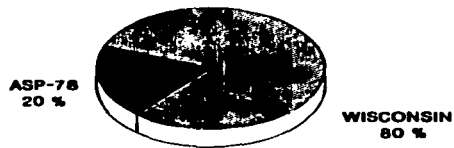


Fig 4. Origin of the clones that showed the five highest relative productivities.

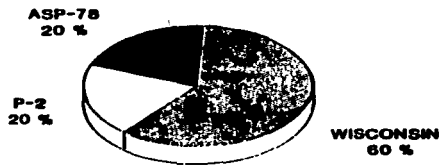


Fig 5. Origin of the clones that showed the ten highest relative productivities

Table 3. Genetic improvement obtained in the best clones isolated.

	STRAIN	CLONE	PRODUCTION IN SSF ($\mu\text{g/g}$)	RELATIVE PRODUCTION (PS/PL) ^a	TIME ^c (h)	PRODUCTION INCREASE (%)
	P2	Pa b	2,084	2.5	115	0
1	P2	# 4	10,555	10.8	138	506
2	P2	# 9	9,695	9.6	138	465
	ASP-78	Pa	1,366	1.7	92	0
3	ASP-78	# 20	8,750	15.4	84	640
4	P2	# 17	5,661	9.9	113	271
	WIS	Pa	1,354	2.3	70	0
5	WIS	# 6	4,531	16.7	61	334
6	WIS	# 12	4,057	11.2	66	300

^a Production in solid divided by maximal production in liquid. b Pa = Parental strain. c time to reach maximal production.

DISCUSSION

The ability of different strains to produce penicillin in SSF relative to their capacity to do so in LSF was quantified. This was done by calculating the ratio PS/PL (production in SSF / production in LSF), which was called relative production. Results showed that different strains have different relative productions. In other words, some strains express their production potential in SSF better than others.

Recent reports on enzymes production suggest that high producing strains in LSF are generally poor producers in SSF (Shankarand *et al.* 1992; Antler *et al.* 1991). However, in this work the highest penicillin-producing strains in liquid medium also produced the highest titres in SSF. This indicates that the production level of a strain (indicated by its yield in liquid medium) exerts a great influence on the production level attained in SSF and that mutations, which have altered metabolic control of the strain, are also useful to produce in SSF.

A strain is usually genetically heterogeneous, unless it has been recently isolated or purified. The degree of heterogeneity also depends on its handling and preservation. This phenomenon is particularly noticeable in secondary-metabolite-producing strains (Ball 1980; Riech 1992). Taking advantage of this, clones were isolated from each strain to study the characteristics of closely related populations.

Although the higher producing strains in LSF were also the highest producers in SSF, among the clones of each strain, an inverse tendency was detected. That is, the highest producing

clones in LSF were lower producers in SSF and *vice versa*. A possible explanation is that the great difference in production level between strains mask this inverse tendency. The fact that ASP-78 was the most heterogeneous strain and that its clones showed a direct relation seems to support this hypothesis.

When relative performances of the clones were determined, a much wider range of relative productions and productivities was observed. Clones were found that produced up to 16 times more in SSF (PS/PL) and were up to 29 times more productive. Conversely, few clones were isolated that grew and produced much better in LSF. These results confirm the above mentioned conclusion *i.e.* some strains express their production potential better in SSF. On the other hand, higher yielding strains (in LSF) showed a tendency to present lower relative performance (PS/PL and relative productivity). These results suggests that higher-producing strains tend to express less efficiently their production potential in SSF. The reason for this could be the loss of certain characteristics, needed to grow and produce in SSF, during their improvement program.

Moreover, when all the clones tested were compared, it was observed that the clones with the highest relative productivities were derived from the low producing strain (Wisconsin). This indicates that strains closer to the wild type adapt and perform (within its production potential) better in SSF. A previous idea is complemented by the latter conclusion. *i.e.* higher producing strains tend to express less efficiently their production potential in SSF, while strains closer to the wild type tend to express it fully. A possible interpretation is that the low-yielding strains have kept certain characteristics that, although not directly related with the biosynthesis of the antibiotic, are useful for growth and production in SSF (the natural habitat for molds).

Nevertheless, in terms of antibiotic titre reached in SSF, results confirmed the importance of the production potential. The highest-producing clones in this culture system, were generated from liquid-high-yielding strains. However, these clones possessed both characteristics : high production potential and its efficient expression SSF.

At this point, it is interesting to note that several very high producing clones, that can be considered specialists for SSF, were obtained by the procedures performed. Five and six fold increases in penicillin production in SSF were obtained (compared to the production of the corresponding parental strain). This means that an effective procedure to isolate potent cultures particularly suited for SSF is clone screening of the liquid highest producing strain(s) available.

CONCLUSIONS

- 1) The capacity of a strain to produce penicillin in SSF is not directly related to the capacity to produce the antibiotic in LSF. That is, some strains express better their production potential (indicated by its production in LSF) in SSF.
- 2) Production potential of a strain is an important factor in determining maximum penicillin titre in SSF.

3) High-producing strains (for LSF) were also the highest producers in SSF. However, among the clones of each strain an inverse tendency was observed *i.e.* higher producing clones in SSF tend to be the worst in LSF and *vice versa*.

4) Higher producing strains (developed for LSF) tend to express less efficiently their production potential in SSF. Nevertheless, some of their clones have kept the characteristics that allow good performance in SSF.

5) An effective procedure to isolate potent cultures, particularly suited for SSF, is clone screening of the highest producing liquid strains available.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by International Foundation for Science (Grant E/0737-2) and by CONACYT, Mexico (Grant 0406N). The authors wish to thank D. Butruille and R. Chávez from CIBIOSA for the opportunity to use their strain and laboratories.

REFERENCES

1. P. Antier, M. Raimbault, G. Viniegra and A. Minjares, Obtención de cepas hiperproductoras de hidrolasas en fermentación en medio sólido: importancia de la actividad de agua, 4^o Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Mérida, Yucatán, Mexico, p. 17-C (1991).
2. C. Ball, Genetic modification of filamentous fungi, in *Fungal Biotechnology*, Smith *et al.* (Eds), Academic Press, New York, p 43-55 (1990).
3. J. Barrios-Gonzalez, A. Tomasini, G. Viniegra-González and L. López, Penicillin production by solid state fermentation, *Biotechnol. Lett.*, **10**, (11): 793-798 (1988).
4. J. Barrios-González, G. M. Rodríguez and A. Tomasini, Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, (5) 329-333 (1990a).
5. J. Barrios-Gonzalez, E. Montenegro and J. F. Martín, Penicillin production by mutants resistant to PAA, 6th International Symposium Genetics of Industrial Microorganisms (GIM'90), Strasbourg, France, p 122 (1990b).
6. C. W. Hesselatine, Solid state fermentations, *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 517-532 (1982).
7. P. K. R. Kumar and B. K. Lonsane, Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields, *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 267-261 (1987).
8. M. J. López-Nieto, F. R. Ramos, J. M. Luengo and J. F. Martín, Characterization of the biosynthesis *in vivo* of alpha aminoadypil-cysteinyI-valine in *P.chrysogenum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 343-351 (1985).

9. J. M. Luengo, G. Revilla, M. J. López, J. R. Villanueva and J. F. Martín, Inhibition and repression of homocitrate synthetase by lysine in *P.chrysogenum*, *J. Bacteriol.*, **144**, (3) 869-876 (1980).
10. R. E. Mudget, Solid state fermentations, In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, A. L. Demain and N. A. Solomon (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 66-83 (1986).
11. S. Risch, Ploidy of *Penicillium* strains, 1st European Conference on Fungal Genetics, Nottingham, England, p 79 (1992).
11. V. S. Shankaranand, M. V. Ramesh and B. K. Lonsane, Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures, *Process Biochem.*, **27**, 33-36 (1992).
12. N. L. Somerson, A. L. Demain and T. D. Nunheimer, Reversal of lysine inhibition of penicillin production by alpha - amino adipic acid, *Arch. Biochem.*, **93**, 236-241 (1961).

V.-DISCUSION

1. Producción de Metabolitos Secundarios por FS

1.1 El Sistema de FS (soporte-sustrato)

Como se indicó en Antecedentes, las fermentaciones sólidas tradicionales (tipo koji) se realizan en granos de cereales o leguminosas, sin embargo las FS no tradicionales, en las que se ha notado un gran repunte de interés en los últimos 15 años, se realizan en sustratos amiláceos como harina de yuca, desechos de camote o plátano; pulpa o desechos de uva, manzana y cítricos. También en sustratos lignocelulósicos como bagazo, olote, paja de trigo, aserrín, etc., principalmente con el objeto de enriquecerlos en proteína o para producir enzimas.

Nuestros estudios sobre metabolitos secundarios en FS comenzaron usando harina de yuca (Barrios-González *et al.*, 1990) y estudiando la síntesis de aflatoxinas y de ácido giberélico (Fajardo & Barrios-González, 1988). En ese período se observó que cuando el soporte y el sustrato son el mismo *i.e.* la fuente de carbono constituye parte de la estructura, las características físicas del soporte se van deteriorando. Esto impide la realización de cultivos por tiempos prolongados que es lo deseable para la producción de metabolitos secundarios.

En este trabajo, se pensó en utilizar un soporte inerte impregnado con medio de cultivo con el fin de que la estructura sólida no se deteriorara durante el cultivo. El sistema presenta ventajas adicionales para estudios básicos (puede utilizar los mismos medios que en FSM, observar el efecto de la presencia de diferentes compuestos y poder recuperar y analizar el medio de cultivo).

Se probaron varios plásticos esponjosos y soportes naturales como bagacillo de caña y olote. Los hongos utilizados (*Gibberella fujikuroi*, *Aspergillus parasiticus* y *P. chrysogenum*) crecieron y produjeron en estos materiales. Sin embargo, el bagacillo de caña sobresalió por el mejor crecimiento y producción (Barrios, 1988; Raimbault *et al.*, 1989). De esta manera, se decidió realizar estos trabajos usando este sistema, que no sólo se considera no tradicional, sino más bien novedoso, dentro de la categoría poco usual de soporte impregnado (Raimbault *et al.*, 1989). Finalmente, el sistema ha resultado no sólo útil para estudios básicos sino excelente para producción de enzimas y de penicilina.

Algunos años después de comenzar esta tesis, apareció un reporte sobre la producción de ácido giberélico en FS utilizando un sistema de salvado de trigo en matraces (Kumar & Lonsane, 1987a), siendo el primer estudio sobre producción de un metabolito secundario útil por FS. Al poco tiempo, se publicó nuestra primera investigación sobre producción de penicilina en FS sobre soporte impregnado (Barrios-González *et al.*, 1988). Más tarde, aparecieron artículos de investigación sobre producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios en diferentes sistemas de FS (Tabla 5). Estos estudios han venido a constituir una segunda etapa de estudio e interés en el tema, después de la etapa de los estudios sobre micotoxinas en la década de los 70 (ver pág. 34). Esta nueva etapa se caracteriza por la diversidad de metabolitos secundarios y por el uso de sistemas no tradicionales de FS. También por que algunos de estos trabajos no sólo optimizan las variables de proceso más

comunes sino que realizan estudios básicos más profundos con el fin de entender el metabolismo secundario en medio sólido.

Microorganismo	Sistema de FS	Producto	Concentración µg/g	Tiempo (días)	Referencia
<i>Gibberella fujikuroi</i> , <i>Fusarium moniliformis</i>	Salvado de Trigo	Acidos Giberélico	1,217	7	Kuhmar & Lonsane, 1987a,b
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Soporte impregnado (bagacillo)	Penicilina	10,500	5-6	Barrios-González et al., 1988, 1993a,b
<i>Streptomyces viridifaciens</i>	Residuos de camote	tetraciclina	4,720	5	Yang & Ling, 1989
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	cebada	cefamicina	300	10	Jermimi & Demain, 1989.
<i>Achremonium chrysogenum</i>	cebada	cefalosporina	950	10	"
<i>Aspergillus parasiticus</i>	yuca	aflatoxinas	60	1.2	Barrios-González et al., 1990
<i>Bacillus subtilis</i>	salvado de trigo	iturina	3,660	2	Ohno et al., 1992
<i>Claviceps purpurea</i> <i>C. fusiformis</i>	centeno soporte soporte centeno	alcaloides	690 960 2,080 0	11 8.5	Trejo, 1992

Tabla 5. Producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios por fermentación sólida

Como se puede observar en la Tabla 5, se han utilizado desde la adaptación del sistema koji utilizado por el grupo de Peoria (Hesseltine, 1977a,b) para la producción de micotoxinas, hasta la FS en soporte impregnado. Los niveles de producción obtenidos en estos trabajos, parecen indicar que en el sistema de FS de granos se obtiene menor producción, y en tiempos más largos. También es posible que se dificulten los procesos de extracción. Se observan altos rendimientos en los sistemas de salvado de trigo y soporte impregnado. Es interesante también la alta producción de tetraciclina obtenida en residuos

de camote. Sin embargo, es conveniente recordar las altas producciones de micotoxinas obtenidas por el grupo de Peoria en FS de granos con agitación.

Las observaciones realizadas en esta tesis indican que, comparativamente con los sistemas de fermentación tipo koji o no tradicionales, la FS en soporte es más fácil de estudiar y de optimizar. Como se vio en secciones anteriores, es posible variar en forma independiente el contenido de agua, nutrientes y soporte. De esta forma se generaron en este trabajo las superficies de respuesta que indican las zonas de máximos de producción. También resultó versátil para realizar estudios de regulación con cierta precisión, lo cual es imposible en los otros sistemas.

1.2 Los Microorganismos y los Productos

Gracias a los trabajos publicados en los últimos seis años, la FS se va definiendo como un método general para la producción no sólo de micotoxinas, sino de antibióticos y diferentes tipos de metabolitos secundarios en general (estimulantes del crecimiento vegetal, alcaloides, aromas, entre otros).

El panorama es también optimista debido al amplio rango de microorganismos que se pueden emplear satisfactoriamente para producción de metabolitos secundarios en FS. Efectivamente, no sólo se pueden utilizar diferentes tipos de hongos sino que ya existen procesos con actinomicetos y al menos uno que emplea una bacteria no filamentosa del género *Bacillus* (Tabla 5).

1.3 Factores que Controlan del Metabolismo Secundario.

1.3.1 Factores Ambientales

1) Humedad y Actividad de Agua

El contenido de agua (la humedad) de una FS aumenta durante el cultivo. La humedad inicial está constituida por el agua ligada y por el agua disponible para el microorganismo. Se considera que, durante el cultivo (FS en soporte), va disminuyendo el agua ligada, pero se va incrementando el agua integrada al micelio. Sin embargo, el agua disponible es una incógnita, ya que no hay forma de medirla.

Por lo tanto, la diferencia en una FS de una fase soporte-sustrato, es que el agua ligada va en aumento debido a la disolución constante de sustrato.

La actividad de agua (A_w) es un parámetro relacionado con la concentración de solutos en una solución, y representa la proporción entre agua ligada y agua disponible. En algún tiempo se pensó que el valor de A_w podría indicar el agua disponible durante la FS, sin embargo esto sólo sucede al inicio del cultivo, ya que en el transcurso de la fermentación este valor se ve crecientemente afectado por el A_w del micelio (Oriol et al., 1988b). Sin embargo, el A_w inicial del cultivo sólido sí representa el agua disponible.

Se ha demostrado que, al menos en FS en soporte, la A_w inicial controla el crecimiento (trofofase). Este parámetro tiene un efecto directamente proporcional sobre velocidad específica de crecimiento e inverso sobre el tiempo de germinación (Oriol et al., 1988a). Se encontró también que la humedad inicial (entre 40 y 75%) no tiene ningún efecto sobre la fase crecimiento de *A. niger* en bagacillo de caña impregnado con medio sintético. Es

decir, no se afectaron: el tiempo de germinación, la duración del cultivo ni la velocidad específica de crecimiento.

En este punto, es necesario recordar que el sistema de FS en soporte está formado por tres componentes principales: el bagacillo, el agua y los nutrientes. El bagacillo y los nutrientes representan los sólidos, de manera que para aumentar la concentración de nutrientes, manteniendo un contenido de humedad, es necesario disminuir la cantidad de bagacillo. De igual manera, para aumentar el contenido de humedad, sin afectar la concentración del medio en la fase líquida, es necesario disminuir la cantidad de soporte (ver Fig. 1).

Los experimentos de Oriol *et al.* (1988b) sobre humedad se realizaron manteniendo la concentración del medio ($A_w = 0.977$) constante a costa de disminuir la cantidad de soporte. Para incrementar la concentración del medio líquido (disminuir A_w) en otra parte del trabajo, los autores disminuyeron la cantidad de soporte y agua, observando un incremento en el tiempo de germinación y un decremento en la velocidad específica de crecimiento, así como un aumento en la concentración final de biomasa. Los autores concluyeron que la actividad del agua del medio absorbido controla el crecimiento, mientras que la humedad inicial no es importante en este sistema de FS.

Efecto de la Humedad y la Concentración de Nutrientes (Actividad de Agua) sobre la Producción de Penicilina por FS.

En contraste con los resultados de Oriol *et al.* (1988b) arriba mencionado, el primer artículo presentado en esta tesis (Barrios-González *et al.*, 1988) indica que la humedad inicial tiene una importante influencia sobre el nivel de producción de penicilina obtenido (la idiofase). Para estudiar este efecto, se modificó la humedad (entre 60 y 78%) manteniendo A_w constante, de manera análoga a lo realizada por Oriol y cols. Se observó que en los cultivos con humedades iniciales de 70 y 73%, se obtuvieron altas velocidades de producción en la parte final del cultivo lo cual permitió alcanzar una producción de 800 U/ml (1,120 $\mu\text{g/gms}$), a diferencia de los cultivos con humedades mayores o menores, los cuales llegaron a 200 U/ml (280 $\mu\text{g/g}$) por falta de este comportamiento en la parte final.

En el mismo artículo se realizaron experimentos en los que se incrementó la concentración de nutrientes (disminuyó A_w) manteniendo constante la humedad en 70%, a costa de disminuir la cantidad de bagacillo. Se encontró que, a diferencia de la trofofase, el uso de medios concentrados favorece la producción del antibiótico en FS. Este efecto fue importante, ya que la producción se incrementó cinco veces en el medio 2X (doble de la concentración utilizada en FS_m) en relación al medio normal 1X. Se comprobó que el uso de estos medios concentrados produce un efecto adverso en FS_m.

Lo anterior representa una diferencia notable en el efecto del contenido y actividad de agua en la trofofase y la idiofase en este sistema de cultivo. Esta característica representa también una diferencia marcada entre la fisiología mostrada por el hongo en FS en relación al comportamiento del hongo en FS_m.

Efecto de la Relación de Componentes del Medio Sólido (Nutrientes/Agua/Soporte) sobre la Producción de Penicilina por FS.

Estudios más recientes confirman los resultados anteriores, utilizando el medio de Somerson y otra cepa de *P. chrysogenum* (P-2), y amplían el horizonte en este campo ya

que se encontró que las conclusiones del primer artículo (arriba mencionadas) son casos de un fenómeno más general.

El estudiar el efecto de incrementar la humedad o los nutrientes, en forma aislada, nos da una visión limitada ya que hay varias maneras de llegar a un cierto valor de humedad o concentración. Por ejemplo, la humedad se puede incrementar por tres caminos diferentes: 1) a costa de disminuir el contenido de soporte e incrementar los nutrientes lo suficiente para mantener una concentración constante en el medio; 2) incrementar la humedad y el contenido de soporte a costa de disminuir los nutrientes; 3) incrementarla a costa de disminuir ambos factores (soporte y nutrientes).

Los resultados de esta sección indicaron que: 1) efectivamente, al incrementar la humedad (a una Aw constante) compensándola con una disminución en el contenido de bagacillo, la producción máxima de penicilina sube; 2) sin embargo, al incrementar la humedad y el bagacillo a costa de disminuir el contenido de nutrientes, la producción baja de forma importante; 3) se encontró también que al incrementar la humedad a costa de disminuir nutrientes y bagacillo la producción máxima de penicilina sube.

Estos resultados demuestran que el efecto (ambiental) positivo más importante se debe a la disminución del contenido de soporte, más que al incremento de la humedad o la concentración. Se encontró que la Aw (varió de manera paralela a la humedad, excepto en el primer caso) no tiene un efecto directo sobre la idiofase, la cual está regida por la relación entre el soporte y los otros dos componentes.

Desde un punto de vista más amplio, las tres estrategias para ajustar el valor de la humedad (o concentración) son en realidad diferentes combinaciones de los tres componentes. En el capítulo de Resultados se mostró un triángulo (Fig. 1) que representa las combinaciones teóricas que se pueden hacer entre soporte, agua y nutrientes. Sin embargo, sólo es posible realizar FS en una pequeña zona. De esta forma, los estudios arriba mencionados caen en una área delimitada: 10 a 24 % de soporte, 58 a 80% de agua y 4 a 26 % de nutrientes, la cual viene a ser un pequeño hexágono en la esquina de alta humedad y zona de bajos nutrientes y soporte.

Para estudiar de esta forma global los resultados arriba expuestos se graficaron las relaciones nutrientes/soporte (N/S) y agua/soporte (A/S) contra producción de penicilina. Esto dio una superficie de respuesta en la que se confirmó que la producción disminuye en la zona de alto soporte *i.e.* baja N/S (< 1) y baja A/S (< 4.5). Se observó que la producción del antibiótico sube hacia la zona de bajo soporte. Sin embargo, la respiración (producción total de CO₂) disminuye al aumentar la humedad y disminuir los nutrientes, pero no responde a diferentes contenidos de soporte.

En la zona de bajo soporte, es posible ver dos máximos de producción de penicilina, uno en la región de alto N/S (2) y menor A/S (5) y otro en la región de alto A/S (7) y menor N/S (1.5). Resulta interesante que, en la zona de bajo contenido de soporte, condiciones iniciales de altos nutrientes y baja humedad sean propicias para una alta producción, al igual que condiciones de menor contenido de nutrientes y alta humedad.

El que se necesite bajo contenido de soporte y alto de nutrientes y/o de agua para tener una alta producción se puede explicar por su efecto a dos niveles. Desde un punto de vista del espacio interpartícula, se puede pensar que los cultivos con menor contenido de soporte (los de mayor producción) tienen una menor densidad aparente, de manera que contenido de espacios vacíos (porosidad) es menor. Esto coincide con los resultados del artículo B de

esta tesis (Barrios-González *et al.*, 1993b), en el que se demuestra que la producción de penicilina se incrementa a mayores densidades. Se considera que las condiciones de reducido espacio vacío no son propicias para el crecimiento pues se llega más rápido a una inhibición por contacto entre micelios. Es posible entonces, que este contacto estimule la producción de penicilina en FS.

Una explicación intrapartícula sería que en los reactores con menor contenido de soporte (condición de mayor producción) tienen un menor número de partículas entre las que se distribuye el agua y los nutrientes. Por lo tanto, cada partícula tiene una mayor cantidad de agua y nutrientes. Estas condiciones iniciales probablemente permiten que haya un mejor aporte de nutrientes durante la idiofase que lo mantenga en un rango de μ_2 adecuado para la producción.

Es posible que haya otro efecto ya que condiciones de alta agua disponible logran transportar la penicilina lejos del micelio que lo formó (puntas de crecimiento) y de esta manera evitar la retroregulación. También es cierto que no toda el área que separa estos dos máximos (de 5 a 7 A/S y de 1.13 a 2 N/S) fue muestreada, por lo que cabe la posibilidad de que todavía exista un máximo igual o mayor en o alrededor de N/S=1.5 y A/S=6.

Humedad Adecuada para Diferentes Grupos Microbianos

Diferentes sistemas de FS tienen diferente capacidad de retención de agua y por lo tanto diferentes niveles de humedad óptima. Sin embargo, en la Tabla 5 es posible observar que, en un mismo sistema de FS, las bacterias (actinomicetos y *Bacillus*) tienen un mayor requerimiento de agua que los hongos. En sistemas de salvado de trigo, la humedad óptima para producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* fue de 60%, mientras que para la producción de iturina por *Bacillus*, en el mismo sistema, fue de 68%. También en el caso de cefalosporinas, la humedad óptima en un sistema de cebada fue de 39.5% para *Streptomyces clavuligerus*, mientras que para *Acremonium chrysogenum* (hongo) fue de 33%.

En tetraciclinas sorprende el alto contenido de humedad que soporta el material usado (desechos de camote): 68%. Aunque no hay reportes de producción de antibióticos de actinomicetos en FS en soporte, el medio óptimo para la producción de tetraciclina tiene una A_w de 0.995, la cual contrasta con la A_w de 0.967 del medio para producción de penicilina en FS en soporte (Somerson 2X).

2) Tamaño de Partícula y Densidad de Empaque

Otro parámetro directamente relacionado con el soporte es el tamaño de partícula. Se considera que, en FS, el uso de partículas de menor tamaño provee una mayor superficie de contacto con el hongo, así como con el ambiente gaseoso. Esto resulta en trayectos más cortos para la difusión de nutrientes (Mudgett, 1986), lo cual es particularmente importante para FS en soporte, en la que los nutrientes difunden del centro hacia la superficie de las partículas.

Oriol *et al* (1988a) estudiaron la cinética de crecimiento de *A.niger* en FS en bagacillo impregnado. Los autores encontraron que un incremento en el tamaño de partícula produjo un decremento en la velocidad de crecimiento al final de la fase de crecimiento y sugirieron que el efecto depresivo podría deberse a la limitaciones causadas por la difusión de nutrientes intrapartícula. Este efecto podría favorecer el metabolismo secundario ya que la

limitación de nutrientes dispara y mantiene la idiofase. Kuhmar & Lonsane (1987) obtuvieron un incremento en la producción de ácido giberélico al usar partículas grandes (3-4 mm) en un sistema de FS de salvado de trigo. Los autores sugirieron que el incremento pudo deberse a una mejora en la transferencia de oxígeno.

En el artículo presentado en esta tesis (Barrios-González et al., 1993a), se determinó el efecto del tamaño de partícula de bagacillo sobre la síntesis de penicilina por *P. chrysogenum* Wis. 54-1255 en FS en soporte. Se realizaron cultivos con diferente tamaño de partícula (retenidas en malla 10: 14 X 1.7 mm; malla 10-30: 5.9 X 0.85 mm y malla 30-50: 3.2 X 0.4 mm). La mayor producción fue obtenida con el tamaño de partícula grande (1,680 µg/g vs 1,250 µg/g). Sin embargo, experimentos con bagacillo lavado demostraron que el incremento en la producción se debió a un mayor contenido de azúcar en esa fracción. Se concluye que el tamaño de partícula no afecta la producción de penicilina. Es posible que la velocidad de consumo sea más lenta que la velocidad de difusión de los nutrientes, de manera que los trayectos de difusión más largos de la partícula grande no retarda la llegada de éstos. Sin embargo, es posible que en el tamaño de partícula grande se obtenga una menor concentración de biomasa, por lo que quizás se podría encontrar un cierto efecto sobre la producción específica en futuros trabajos.

La densidad de empaque del medio sólido es un parámetro que se ha estudiado muy poco en la FS en general y nada en relación a la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, está claro que este parámetro se incrementará en la mayor parte de los reactores estáticos que se pueden utilizar para subir la escala de producción.

Los resultados presentados en esta tesis (Barrios-González et al., 1993a) indicaron un incremento moderado (1,750 vs 1,300 µg/g) en la producción en cultivos muy empacados (densidad de 0.35 g/ml). La razón de este incremento no es clara, pero debe estar relacionada con la reducción de espacio entre partículas y del área de intercambio con la atmósfera circundante. La causa de la inhibición de la esporulación observada en estas condiciones puede ser la limitación de espacio para la formación de conidióforos. Los resultados sugieren que puede haber una relación entre la inhibición de la esporulación y el incremento de la producción. Esto podría explicarse por una mayor disponibilidad o canalización de intermediarios hacia la síntesis del antibiótico.

4) Aireación y Agitación

En un trabajo anterior (Barrios-González et al., 1990) sobre los factores que controlan la producción de aflatoxinas en FS de yuca se estudió el efecto de diferentes velocidades de aireación. Se observó un ligero efecto positivo sobre la producción al incrementar la tasa de aireación entre 0 y 300 ml/h*g msi (materia seca inicial).

Trejo et al (1993) identificaron la aireación como un factor importante para la síntesis de alcaloides en FS. Encontraron un óptimo de 120 ml/h*g msi, tanto para FS de granos de centeno con *Claviceps purpurea* como para FS en soporte (bagacillo de caña) con *C. fusiformis*.

En la sección 3.7 de Antecedentes se describió el efecto del mezclado sobre producción de micotoxinas en FS de granos. En algunos estudios se realizó la agitación a 200 rpm en matraz agitado y en otros, en reactor tipo tambor rotatorio de 1 a 16 rpm.

Sin embargo, Jermini & Demain (1989) reportaron que la agitación de este tipo (en matraz) no fue positiva para la producción de cefamicinas por *S.clavuligerus* y cefalosporina por *A.chrysogenum* en FS de granos de cebada.

En el artículo B (Barrios-González *et al.*, 1993a) se determinó el efecto del mezclado en la producción de penicilina por *P.chrysogenum* Wis. 54-1255 en FS en soporte. Se encontró que agitando el medio sólido una vez cada 24 h (desempacondo, mezclando en un vaso de precipitado y empacando de nuevo la columna) tuvo un efecto negativo sobre la producción. Se demostró que este efecto se debió a la pérdida de humedad durante la operación de mezclado. Cuando el agua perdida fue restituida (en forma de aerosol) durante cada mezclado, no se observaron diferencias entre los cultivos.

Estudios similares con *P.chrysogenum* P-2 indicaron que, en ese caso, la agitación ocasiona un pequeño incremento en la producción de penicilina y un fuerte incremento sobre la actividad metabólica, medida como respiración, que sugiere un mayor crecimiento. Los resultados indican que la población del cultivo mezclado está constituida por micelios más cortos y con una mayor frecuencia de ramificación. Es decir, un mayor número de puntas de crecimiento, lo cual tiene como consecuencia una mayor actividad metabólica y una mayor superficie de secreción, así como una mayor homogeneidad en etapa fisiológica.

A pesar de lo anterior, el efecto del mezclado sobre la producción fue moderado. Sin embargo, el hecho de que la FS de penicilina se pueda mezclar abre nuevas posibilidades. Se podrán realizar adiciones de agua o nutrientes para alargar la fase de producción en una especie de lote alimentado, o sustancias controladoras de pH. También se podrá aplicar el método de mezclado y adiciones para avanzar en el conocimiento básico. Por ejemplo investigar con esta estrategia qué factor limita el crecimiento y la producción, o introducir un compuesto regulatorio en diferentes momentos del cultivo.

1.3.2 Efecto de los Factores Nutricionales

En los sistemas de FS para producción de proteína y/o enzimas no es usual adicionar más que agua y sales minerales para balancear el medio. Como se comentó en la parte correspondiente de Antecedentes, se utiliza el término de suplementación el agregar otro tipo de compuestos, sobre todo glucosa para estimular o iniciar el crecimiento y la degradación de materiales lignocelulósicos.

Los trabajos publicados en los últimos 6 años han demostrado que la suplementación adquiere una importancia fundamental para obtener rendimientos satisfactorios de metabolitos secundarios por FS. Además, llama la atención las altas concentraciones de nutrientes utilizadas, lo cual concuerda con los resultados sobre efecto del soporte, los nutrientes y el agua, obtenidos en este estudio.

En esta tesis no se optimizaron los nutrientes, sino que se investigó cómo afectan la idiofase los diferentes componentes (soporte, nutrientes y agua) del medio sólido. De estos estudios surgió un modelo de cómo se realiza la idiofase en este sistema y las relaciones más convenientes de estos componentes para iniciar una optimización más racional de la producción.

También se realizaron estudios comparativos sobre los mecanismos que regulan la vía de biosíntesis, lo cual profundiza el conocimiento de la idiofase en este sistema de cultivo y

puede ser aplicado tanto al desarrollo de medio de cultivo como al de cepas mejoradas genéticamente.

1) Efecto de la Fuente de Carbono y Regulación de la Síntesis de Penicilina

En los sistemas tradicionales tipo koji o en los sistemas de FS de granos, los efectos del cambio de tipo y balance de nutrientes se realiza indirectamente al cambiar de grano.

En los trabajos iniciales sobre producción de micotoxinas en granos no se utilizó suplementación con fuentes de carbono adicional. Es posible que un balance conveniente de nutrientes se obtuviera de la selección del grano adecuado.

En los trabajos recientes sobre el tema es muy común el uso de fuentes de carbono adicional. El impacto que esto tiene en la producción indica que es uno de los parámetros importantes en el control de la producción.

En la producción de ácido giberélico en FS de salvado de trigo la suplementación con 20% de almidón soluble incrementó 3.5 veces la producción, aunque concentraciones mayores tuvieron un efecto negativo (Kumar & Lonsane, 1987a). La adición de almidón durante el cultivo en una especie de lote alimentado también tuvo un efecto positivo sobre la producción, aunque sólo fue de 18% (Kumar & Lonsane, 1987b).

La producción de tetraciclina en FS de residuos de camote se vio incrementada en 270% al enriquecer el medio sólido con 10% de almidón soluble, a pesar de que los residuos de camote tienen una gran cantidad de almidón (Yang & Ling, 1989). Es importante notar que la adición de 10% de glucosa ocasionó un decremento de 60% en la producción.

En la producción de alcaloides en FS de granos de centeno, la suplementación con 5% de sacarosa resultó favorable. Para optimizar la producción en un sistema de FS en soporte (bagacillo de caña) se realizó una cuidadosa optimización del medio por métodos estadísticos de superficie de respuesta. Como resultado de este análisis, se identificó a la sacarosa (250 g/l) como uno de los factores claves, junto con el triptofano (precursor) y el fosfato (nutriente limitante), para obtener una alta producción (Trejo, 1992).

Por otro lado, resulta contrastante el hecho de que la suplementación con glucosa, KH_2PO_4 y MgSO_4 no tuvo ningún efecto sobre la producción de iturina (antibiótico antifúngico) por una cepa de *Bacillus subtilis* en FS de salvado de trigo (Ohno, *et al.*, 1992).

En estos reportes se confirma la importancia de la suplementación de fuente de carbono para la producción de metabolitos secundarios, aún en sistemas tradicionales. Además, llama la atención las altas concentraciones utilizadas como se mencionó en la sección 3.1.1.

Regulación de la Síntesis de Penicilina en FS

Regulación por Carbono.

Los estudios en medio líquido han demostrado que la fuente de carbono también puede tener efectos negativos sobre la síntesis de metabolitos secundarios. En el caso de la penicilina, la glucosa deprime la síntesis del antibiótico, reprimiendo la transcripción de las enzimas de la vía: tripéptido sintetasa e isopenicilina N sintetasa.

Como se mencionó anteriormente, existe una falta de estudios básicos sobre fisiología de los microorganismos en FS y más aún de estudios más profundos como el funcionamiento de sus sistemas regulatorios en este medio. Sin embargo, estos conocimientos son

importantes no sólo por su interés básico, sino porque podrían tener aplicación a desarrollo de procesos de producción o de cepas sobreproductoras.

En un trabajo anterior sobre producción de aflatoxinas en FS de yuca (Barrios-González, *et al.*, 1990) se encontró que, al disminuir paulatinamente la concentración de amonio y fosfato del medio, la producción de la toxina se eleva proporcionalmente y de manera importante. Tomando en cuenta que las aflatoxinas están reguladas por fosfato y/o nitrógeno (Maggon *et al.*, 1977), estos resultados sugieren que la biosíntesis de este metabolito secundario se regula, en medio sólido, de manera parecida que en medio líquido.

Recientemente Ramesh & Lonsane (1991a) reportaron lo que llamaron la habilidad del sistema de FS para minimizar la represión catabólica de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. Encontraron, inicialmente que la producción de la enzima en FSm se redujo de 480 U/ml a 30 U/ml al incrementar la concentración de almidón soluble de 0.2 a 1%. En contraste, la producción de la enzima se incrementó 29 veces al aumentar la concentración de almidón soluble en FS de salvado de trigo. Posteriormente (Ramesh & Lonsane, 1991b), observaron que al adicionar 1% ó 5% de glucosa al medio en FSm, se suprimía la síntesis de la enzima, mientras que en FS de salvado de trigo con 15% de glucosa se estimulaba ligeramente la producción. Aunque los autores sugieren que el umbral regulatorio es mayor en FS, es conveniente observar algunos puntos. Al agregar 5, 10, 15 y 20% de glucosa a la FS no se da un retraso en el inicio de la producción. Sin embargo la velocidad de síntesis sufre, al inicio del cultivo (entre las 24 y 48 h), una disminución proporcional a la concentración del azúcar. Después de este período, la velocidad de síntesis sube y la producción se recupera. Es importante entonces notar que los autores no determinaron glucosa en FS, por lo que cabe la posibilidad de que el consumo del azúcar en el medio sólido sea mucho más rápido que en FSm y que a las 48 h todos los cultivos sólidos se encontraron en niveles subrepresivos de glucosa. En otras palabras, no se comprobaron diferencias en umbrales regulatorios.

Posteriormente, Solís *et al.* (1993) examinaron el efecto de la glucosa sobre la síntesis de enzimas pectinasas por *A. niger* en FSm y en FS en soporte (bagacillo de caña). En FSm una concentración inicial de 3% de glucosa o sacarosa ocasionó una fuerte disminución de la actividad enzimática (el inicio de la síntesis se desplazó de las 24 h a las 72 h). En contraste, concentraciones iniciales de glucosa de hasta 10% en FS tuvieron un efecto estimulador en la producción de las pectinasas. Aunque estos resultados también dan la impresión de un umbral regulatorio mucho mayor en FS, las cinéticas de consumo de azúcares reductores de ambos sistemas indican algo diferente. En FS, en 24 h de cultivo, se consumió el 90 % de los azúcares, mientras que, en FSm, el 90 % de los azúcares se consumieron hasta las 96 h. Estas observaciones sugieren que la diferencias en regulación que se han notado están más relacionadas con la capacidad de manejo (consumo rápido) de azúcares en medio sólido que con diferencias en umbral aparente, supuestamente causadas por los gradientes generados por el consumo local de azúcares y su lenta difusión en medio sólido.

En el trabajo aquí presentado se comparó la regulación por carbono de la síntesis de penicilina por *P. chrysogenum* P-2 en FS en soporte y FSm. La estrategia seguida fue la de lograr las condiciones más parecidas posibles en FS y FSm (eliminar posibles fuentes extrañas de variación) y determinar los umbrales regulatorios de la síntesis de penicilina.

Se utilizó un medio definido en ambos sistemas y bagacillo lavado (sin azúcares residuales) en FS. Además, se utilizó una concentración de azúcares totales (glucosa + lactosa) constante en todos los experimentos, de manera que no se alteró la relación entre soporte/agua/nutrientes, con los correspondientes cambios en capacidad de retención de agua y densidad del medio sólido. Con el fin de poder estimar, de manera aproximada, el umbral de regulación de la glucosa en el medio sólido y en el líquido, sin tener cambios importantes (entre tratamientos) en otros parámetros como pH y crecimiento (que pudieran afectar la síntesis), se estudió este fenómeno a las menores concentraciones de glucosa posibles (entre 112 y 224 mM).

En FSm, la represión catabólica se manifestó en el cultivo con 170 mM de glucosa inicial como un retraso relativo de unas 15 h en el inicio de la síntesis de penicilina, tiempo en el que la concentración del azúcar en el medio descendió a niveles no represivos. El efecto fue muy parecido cuando se utilizaron medios con una concentración global de fuente de carbono constante (C/N constante). Estos resultados fueron importantes pues estas condiciones son las que se utilizarían en los experimentos de FS. Comparando las concentraciones de glucosa de los cultivos, en los periodos de desrepresión de unos y represión de otros (concentración máxima con desrepresión y mínima con represión), se estimó el umbral de regulación, en condiciones de FSm, entre 20 y 28 g de glucosa /l. Estos niveles concuerdan con los estudios clásicos en FSm. Revilla *et al.* (1984) realizaron estudios muy precisos sobre represión catabólica de la biosíntesis de penicilina por *P. chrysogenum* ASP-78. Encontraron que, en cultivos de corta duración de células en reposo, el efecto represivo de la glucosa fue dependiente de la concentración en el rango de 28 a 140 mM (25 g/l).

En los experimentos de FS realizados inicialmente, se notó una importante variación en la relación bagacillo/nutrientes/agua, modificando las características del medio sólido en los diferentes tratamientos. Al mantener el C/N de los medios constante, la densidad y el aspecto de los diferentes cultivos fue similar. En estas condiciones, el efecto de la glucosa fue muy parecido al observado en FSm, con la diferencia que se observó un periodo con una velocidad de síntesis de la penicilina baja, seguida de uno con una alta velocidad de síntesis. Se interpretó esto como una desrepresión parcial, seguida de una total. En este sistema la producción se inició más tarde que en FSm debido a que se inoculó con esporas. El cultivo con 170 mM mostró un pequeño retraso en el inicio de la síntesis mientras que en el de 224 mM el retraso fue más notorio. Con las cinéticas de consumo de glucosa se estimó el umbral regulatorio de la síntesis entre 36 y 14 g/l.

Estos resultados demuestran que el mecanismo de represión catabólica también regula la síntesis de penicilina en FS. La coincidencia entre los umbrales estimados en uno y otro sistema sugiere que este mecanismo regulatorio funciona a umbrales similares en FS y en FSm.

La principal diferencia entre estos resultados y los de Solís *et al* (1993) y Ramesh & Lonsane (1991) es que no se observó que la FS soportara mayores concentraciones de glucosa sin afectar el inicio de la producción. Parece ser que esto no refleja diferencias en regulación, sino a que, *A.niger* consumió la glucosa mucho más rápidamente en FS que en FSm. En los experimentos presentados en esta tesis, las diferencias de consumo en FS y FSm no fueron tan drásticas. Se observó también que en FS la velocidad de consumo de glucosa (Q_s) fue más alta en los cultivos con mayor concentración inicial del azúcar. Sin

embargo se vio el mismo efecto, aunque menos pronunciado, en FSm. En medio sólido, una vez iniciado el crecimiento, la glucosa fue consumida en 20 h en todas las condiciones. En FSm estas concentraciones de glucosa se consumieron en aproximadamente 30 h. En realidad parece que *P. chrysogenum* fue rápido para consumir la glucosa en FSm, en relación a *A. niger*, el cual consumió el 90% de la glucosa en 96 h de cultivo sumergido. Resulta conveniente recordar que se usó una cepa muy modificada genéticamente en comparación con la de *A. niger* y que es muy probable que estas modificaciones lo hayan hecho más eficiente para consumir la glucosa en medio líquido.

Otros Mecanismos Regulatorios.
Estudios iniciales sobre retroregulación de la síntesis de penicilina por ella misma, indicaron que este mecanismo está también activo en medio sólido, encontrándose un umbral regulatorio de 5,000 µg de penicilina V/ml en el medio sólido, para la cepa P2-2. Estudios preliminares sobre regulación por amonio mostraron un comportamiento similar en FS que en FSm. Todo esto sugiere fuertemente que todos los mecanismos que regulan la biosíntesis de penicilina en medio líquido también lo hacen en medio sólido.

Estos resultados, junto con los de las secciones 3.2.1.1 y .2, indica que las leyes que rigen la fisiología del metabolismo secundario no son tan diferentes en medio sólido. Debe haber algunos aspectos de la fisiología que sí son diferentes en medio sólido; aunque no han podido ser identificados por falta de estudios sobre este tema. Es posible que el manejo de los azúcares (un consumo más rápido seguido de una completa desrepresión) puedan ser una diferencia. Por otro lado, estos resultados sobre regulación complementan y ayudan a comprender mejor la sección sobre las cepas y el nivel de producción (Barrios-González et al., 1993b).

2) Nutriente Limitante

En cultivo líquido, el metabolismo secundario comienza cuando el crecimiento se limita al agotarse un nutriente clave, entrando el cultivo en una fase estacionaria o de crecimiento lento. De esta manera, la síntesis de ácido giberélico comienza al agotarse la fuente de nitrógeno y la de alcaloides al acabarse el fosfato. La síntesis de penicilina se inicia cuando se agota la glucosa (fuente de carbono de rápida utilización) y se empieza a utilizar la lactosa. La síntesis de aflatoxinas se dispara al agotarse la fuente de nitrógeno o de fósforo. Los estudios de regulación de penicilina arriba descritos, junto con las observaciones sobre los trabajos de aflatoxinas, sugieren que el metabolismo secundario se desencadena por circunstancias similares a las ya observadas en FSm.

En 1992, Trejo realizó una cuidadosa optimización estadística de los factores nutricionales que afectan la producción de alcaloides por *Claviceps fusiformis* en FS sobre soporte impregnado. La sacarosa y el triptofano (precursor) resultaron los factores que más impacto tuvieron sobre la producción, seguidos del fosfato (nutriente limitante) y la aireación. Además, se muestra una cinética en la que es posible observar que el fosfato se consume rápidamente en las primeras 70 horas de cultivo. A las 120 h la concentración de fosfato es relativamente baja y es cuando se dispara la producción de alcaloides y la velocidad de crecimiento empieza a disminuir. Es interesante notar que en FSm el fosfato se agota hasta las 240 h.

Estos resultados sugieren que el metabolismo secundario se activa, en FS, con los mismos estímulos que en medio líquido y que la velocidad de consumo del sustrato limitante es mucho mayor en FS..

3) Efecto del Precursor

En la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios en cultivo líquido se ha observado que al agregar un precursor (intermediario de la ruta biosintética) que es limitante, no sólo se obtiene una mayor producción, sino que se "dirige" ésta hacia la síntesis preferencial de uno de los metabolitos de la familia.

En FS no existen estudios específicos al respecto, sin embargo, el efecto del triptofano sobre la síntesis de alcaloides arriba mencionado, así como el incremento en la producción de tetraciclina por la adición de glutamato sugieren fuertemente que también en este medio se produce el efecto.

En esta tesis, se utilizó ácido fenilacético como precursor de la penicilina G. Los análisis por HPLC de la penicilina producida en FS no han mostrado evidencia de que se formen otras penicilina. Toda esta evidencia sugiere que el efecto del precursor se está manifestando también en FS. Lo anterior puede tener importancia práctica en un proceso comercial, pues es negativo para su economía la formación de otras penicilinas o de varios compuestos relacionados en general.

2.3.3 La Cepa y el Nivel de Producción

En cualquier proceso microbiano, y sobre todo cuando se producen metabolitos, el nivel de producción de la cepa determina la viabilidad económica del proceso.

Se ha dicho que uno de los principales aspectos positivos de la FS es que los metabolitos se producen, generalmente, en mucho mayor cantidad que en FSm (Shankaranand *et al.*, 1992). En realidad no hay muchos estudios comparativos y menos sobre producción de metabolitos secundarios. Estos estudios se han realizado con cepas de baja producción, que son más parecidas a las cepas silvestres que a las hiperproductoras que se usan en la industria moderna.

En un trabajo reciente Shankaranand *et al.* (1992) observaron discrepancias en el nivel de producción de enzimas de *Bacillus* en FS y en FSm. Los autores concluyen que no se puede depender o confiar en que una cepa de alta producción en medio líquido vaya a tener un buen desempeño en un proceso de FS e indican la necesidad de extensos programas de selección de cultivos potentes, mejor adaptados al medio sólido. De hecho, la falta de estas cepas y de metodología para generarlas limita el desarrollo de esta técnica de cultivo.

Uno de los problemas es que no existen estudios sobre la capacidad de diferentes microorganismos para crecer y producir en uno y otro sistema de cultivo.

Definición de Parámetros para Evaluar las Cepas

En el artículo C, que constituye esta tesis (Barrios-González *et al.*, 1993b), se definieron parámetros que permiten evaluar, de un modo cuantitativo, la efectividad de diferentes cepas para producir en FS, en relación a la que muestran para producir en FSm. Se definió la producción relativa como el cociente de producción en sólido entre producción en líquido. Este parámetro puede ser interpretado como el número de veces que la producción

en sólido es mayor que la producción en líquido. De manera similar se definió la productividad relativa (productividad en sólido ($\mu\text{g/g}\cdot\text{h}$)/ productividad en líquido ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$) y tiempo relativo (tiempo en el que se alcanzó la máxima producción en sólido / tiempo en el que se alcanzó la máxima producción en líquido. El conjunto de estos parámetros constituyen lo que se llamó el desempeño relativo ("relative performance"). Se consideró el potencial de producción de una cepa como su límite de producción teórico en FS. Este valor es desconocido, pero está relacionado con el nivel de producción que muestra en FS_m. Obviamente, este potencial de producción es varias veces mayor que la producción en líquido y sería el producto de multiplicar la producción pico de la cepa en FS_m por una producción relativa teórica, también se desconoce este último parámetro, pero sería mayor de 16.7 (que fue el mayor determinado en este trabajo).

Evaluación de Cepas de Diferente Nivel de Producción

En este trabajo se estudiaron 5 cepas con diferente nivel de producción, desde la Wisconsin 54-1255, de baja producción, hasta una cepa industrial (CIBIOSA), pasando por cepas intermedias como P2, ASP-78 y R8 (Barrios-González *et al.*, 1993c).

De cada cepa (excepto la industrial) se aislaron 40 colonias, observándose variaciones importantes en nivel de producción. A estas colonias se les llamó clones, para indicar que, aunque las cepas parentales eran genéticamente heterogéneas, cada colonia estaba ya constituida de individuos idénticos. De igual manera se les pudo haber llamado cepas o mutantes desde el momento en que se determinó que eran diferentes a la original.

Los resultados mostraron que las cepas de mayor producción en FS_m también son las de mayor producción en FS. Esto indica que las mutaciones que han alterado sus controles metabólicos para sobreproducir en FS_m también son útiles para sobreproducir en FS. Este hallazgo coincide y apoya nuestros resultados sobre regulación de la síntesis de penicilina en FS y FS_m, *i.e.* los mecanismos que regulan la producción de penicilina en medio líquido tienen un papel similar en FS, y a umbrales regulatorios similares.

También se observó que diferentes cepas tienen diferente producción relativa (PS/PL), variando entre 0.08 y 16.7. Es decir, que algunas cepas poseen alguna (s) característica (s), probablemente no relacionadas con la ruta biosintética, que le permite expresar mejor su potencial de producción en FS que otras. Esas características son desconocidas, pero se manifiestan como un mayor PS/PL. Este valor fue más alto en cepas de menor producción y en clones derivados de esas cepas, lo cual sugiere que esas características se han ido perdiendo durante los programas de mejoramiento genético para FS_m.

Cepas Especiales para Medio Sólido

Encontramos que algunas de estas mutantes espontáneas o clones de cepas de alta producción tienen (han conservado o recuperado) un alto PS/PL, conjuntando un alto potencial de producción con una eficiente expresión en FS. De hecho, en este trabajo se obtuvieron cepas que producen hasta 10,500 $\mu\text{g/g}$, representando esto un incremento en la producción, en relación a la cepa parental, de entre 500 y 640%.

En términos prácticos esto quiere decir que aislar clones de cepas de alta producción y seleccionarlos (evaluarlo en cilindro de agar y los clones seleccionados en FS) de la manera realizada en este trabajo es un método eficiente y rápido para generar cepas de alta

producción de penicilina, y probablemente de otros metabolitos secundarios, especiales para FS.

Las características que permiten un alto PS/PL no parecen estar relacionadas con la biosíntesis del antibiótico pues sólo se manifiestan en FS. Tampoco parecen estar relacionadas con un crecimiento abundante y rápido pues la cepa P2-4 (el clon con mayor producción) alcanza su producción máxima a las 130 h, mientras que cepas de menor producción como la ASP-78-20 (8,750 µg/g) a las 85 h y la Wisconsin 54-1255-6 (4,531 µg/g) en 60 h, con crecimientos aparentes más abundantes.

Esto también se puede notar en un estudio reciente sobre producción de alcaloides por FS. Se evaluaron 6 cepas de *Claviceps* en FSm y se optimizó la producción en FS (soporte impregnado) de las dos mejores. La producción de *C.fusiformis* (ATCC 26019) fue más alta en ambos sistemas, a pesar de que en FS el crecimiento fue casi cuatro veces menor que el de *C.purpurea* 1029c (4.7 g de biomasa seca/l vs 17.5 g/l). Es interesante notar que esta primera cepa prácticamente no creció en FS de granos de centeno y que mostró un crecimiento apical más lento que el resto en caja de petri (Trejo, 1992).

Por otro lado, resulta sorprendente el hecho de que Ohno et al. (1992) hayan logrado producir 3,660 µg de iturina/g en 2 días en FS con salvado de trigo con una cepa silvestre de *Bacillus subtilis* aislada de una composta. Aún más sorprendente es la comparación con la producción en FSm: 150 µg/ml en cinco días (aunque ésta se realizó en un medio totalmente diferente debido a que su sistema de FS no se presta para estudios comparativos). De estos datos se puede calcular una producción relativa de 24.4. Estos resultados, apoyan nuestra conclusión de que las cepas más cercanas al tipo silvestre tienden a presentar una mayor producción relativa y también dan una idea del valor que puede tomar una producción relativa teórica.

Si se logran identificar, las características que permiten una alta producción relativa en una cepa, no sólo permitiría un conocimiento más profundo de las particularidades más importantes de la fisiología en FS, sino que se podrían hacer sistemas más directos de selección racional de mutantes e incluso clonación y transferencia de genes.

En estudios sobre producción de enzimas pectinasas en FS de pulpa o cereza de café, Antier et al. (1993) encontraron que el uso de baja actividad de agua como factor selectivo para mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa parece ayudar a seleccionar un tipo especial de mutantes que llamaron dgrAw96. Estas se caracterizan por presentar mayor producción de pectinasas en FSm y sobre todo en FS. El uso de un medio similar pero con alta Aw (0.99), selecciona mutantes con la extraña característica de mayor producción en FS y una inversamente proporcional producción en FSm. Ambos tipos de mutantes parecen estar parcialmente desreguladas para represión catabólica.

Contrasta, en este trabajo, el que las cepas altas productoras tienen un crecimiento rápido y vigoroso en su sistema de FS. Como se mencionó anteriormente, en metabolismo secundario esa característica, aunque deseable, no va forzosamente asociada a una alta producción. En estos momentos, no queda claro si esto es debido a que se trata de una enzima catabólica, o a que tiene un sistema de FS en el que el soporte y sustrato son el mismo, de modo que al avanzar la fermentación va disminuyendo rápidamente la Aw, debido a la disminución del agua disponible y a la solubilización constante de azúcares en el agua residual. En el sistema de soporte con medio absorbido este fenómeno no se

produce, de manera que las características que se necesitan pueden ser distintas en estos dos sistemas de FS.

Como resultado del presente trabajo, ahora existen clones (cepas) prototipo de alta y baja producción relativa, que deben ser genéticamente muy parecidos. Esto da la oportunidad de caracterizarlos en un futuro para tratar de identificar estas características.

Se puede especular que el microorganismo "siente" el medio sólido y reacciona produciendo enzimas más eficientes en un medio con difusión restringida. Existe la posibilidad de que haya diferencias en la membrana para adaptarse al consumo de nutrientes y excreción de productos en esas condiciones de FS. La lucha contra una presión osmótica mayor podría también generar cambios en la membrana, pero sobre todo en la acumulación intracelular de polioles para equilibrar la alta concentración de solutos. Lo anterior implica la existencia de algunos mecanismos regulatorios de genes adaptativos al medio sólido.

En los trabajos de caracterización de prototipos se deberá incluir resistencia a la presión osmótica, velocidades de consumo de azúcares y de producción de CO₂ (primarias y secundarias), umbrales regulatorios, características macroscópicas y microscópicas.

VII.- CONCLUSIONES

- 1) Esta tesis, junto con otros reportes recientes, confirman que es posible producir metabolitos secundarios útiles por fermentación sólida (FS). Los metabolitos no se limitan a los antibióticos sino a compuestos con muy diversa actividad biológica. De igual modo, los microorganismos productores no se limitan a los hongos.
- 2) En contraste con la fase de crecimiento, la humedad inicial afecta de manera importante la producción de penicilina (idiofase) en FS en soporte.
- 3) Para obtener altas concentraciones de penicilina en este sistema de FS es importante utilizar medios más concentrados que en FSm.
- 4) Las dos conclusiones anteriores son caso de un fenómeno más general. La idiofase en FS está regida por la relación entre el soporte y los otros dos componentes del medio sólido (nutrientes y agua). En una superficie de respuesta la mayor producción de penicilina se encuentra en la zona de bajo contenido de soporte, con máximos en el área de alta relación agua/soporte (7 g/g) junto con una relación nutrientes/soporte relativamente baja (1.1 a 1.6 g/g) y en el área de relación agua/soporte menor (5 g/g), con una mayor proporción nutrientes/soporte (2 g/g). Al parecer, esas condiciones iniciales generan fases de crecimiento diferentes, pero permiten un adecuado aporte de nutrientes en la idiofase.
- 5) El mezclado tiene un moderado efecto positivo sobre la producción de penicilina de algunas cepas y ocasiona un incremento en la actividad metabólica del cultivo.
- 6) Una alta densidad de empaque tiene un efecto positivo sobre la producción de penicilina.
- 7) La biosíntesis de penicilina es regulada en FS por represión catabólica y a umbrales similares a los observados en medio líquido. Al parecer otros mecanismos que la regulan en FSm, como la retroregulación por penicilina, también lo hacen en FS.
- 8) Estos resultados sobre regulación, junto con la estructura de los medios sólidos optimizados para producir metabolitos secundarios, indica una similitud en cuanto a puntos clave con la FSm: a) la importancia del nutriente limitante, b) el uso de precursores y c) evitar mecanismos regulatorios. Esto indica que las leyes que rigen el metabolismo secundario en medio líquido no son muy diferentes en medio sólido. Debe haber algunos aspectos de la fisiología que sí son diferentes, pero que no han sido identificado por falta de estudios. Es posible que el consumo y almacenamiento de azúcares pueda ser una diferencia (más rápido, seguido de total desrepresión en enzimas hidrolíticas).
- 9) Las cepas de mayor producción (en FSm) tienden a ser las que más producen en FS.
- 10) Sin embargo, las cepas de mayor producción (y las mutantes espontáneas derivadas) tienden a ser las menos eficientes para expresar este potencial en FS. Es decir que sus producciones relativas (PS/PL) tienden a ser menores que las cepas de baja producción.

11) Algunas de las mutantes derivadas de cepas de alta producción han conservado o readquirido una característica que les permite expresar una alta producción relativa (i.e. un buen comportamiento en FS).

12) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

13) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

14) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

15) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

16) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

17) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

18) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

19) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

20) Se encontró que el aislar y evaluar mutantes espontáneas de las cepas de más alta producción (en FSm) disponibles, es un procedimiento efectivo para seleccionar cepas hiperproductoras especiales para el medio sólido.

VIII.-RECOMENDACIONES

El Sistema de FS y el Tipo de Microorganismo.

El presente trabajo abre un horizonte amplio sobre futuras investigaciones. Sobre la parte de sistemas de FS, convendría analizar cuales principio pueden ser extrapolados a otros sistemas de FS y realizar experimentos comparativos. Resulta evidente la conveniencia de estudiar la producción de antibióticos de actinomicetos y bacterias del género *Bacillus* en FS en soporte.

Efecto de la Relación Nutriente/Agua/Soporte.

El que se necesite bajo contenido de soporte y alto de nutrientes y/o de agua para tener una alta producción se puede explicar por su efecto a dos niveles.

Desde un punto de vista interpartícula, se puede pensar que los cultivos con menor contenido de soporte (los de mayor producción) tienen una menor densidad aparente, de manera que contenido de espacios vacíos (porosidad) es menor. Esto coincide con los resultados del artículo B (Barrios-González *et al.*, 1993a) de esta tesis, en el que se demuestra que la producción de penicilina se incrementa a mayores densidades.

Se considera que las condiciones de reducido espacio vacío no son propicias para el crecimiento pues se llega más rápido a una inhibición por contacto entre micelios. Es posible entonces, que este contacto estimule la producción de penicilina en FS.

Esta hipótesis resulta difícil de demostrar, sin embargo vale la pena pensar en el uso de microscopía y de FS en soportes artificiales que permitan determinar la biomasa y así calcular la producción específica. El conocer este parámetro en condiciones de diferente porosidad puede dar evidencia que apoye la hipótesis.

Una explicación intrapartícula sería que en los reactores con menor contenido de soporte (condición de mayor producción) tienen un menor número de partículas entre las que se distribuye el agua y los nutrientes. Por lo tanto, cada partícula tiene una mayor cantidad de agua y nutrientes. Estas condiciones iniciales probablemente permiten que haya un mejor aporte de nutrientes durante la idiofase que lo mantenga en un rango de μ_2 adecuado para la producción. Lo anterior señala la importancia de aplicar técnicas de procesamiento computarizado de imágenes (microscópicas), acopladas a equipo como detectores de infrarrojo cercano, con el fin de cuantificar gradientes y concentraciones intrapartícula.

También es cierto que no toda el área que separa estos dos máximos (de 5 a 7 A/S y de 1.13 a 2 N/S) fué muestreada, por lo que cabe la posibilidad de que todavía exista un máximo igual o mayor en o alrededor de $N/S=1.5$ y $A/S=6$.

Posteriormente, se podrán optimizar los nutrientes del medio de cultivo en esa zona.

Efecto del Mezclado.

Una limitación en los estudios sobre mezclado fué que la agitación a mano propicia no sólo pérdida de humedad, sino variabilidad en los diferentes mezclados. Tampoco es posible, con esta estrategia observar el efecto de diferentes intensidades (rpm) y estrategias (intermitente vs continuo) de mezclado. Estas limitaciones se podrán eliminar en un futuro pues se está construyendo un fermentador mezclado tipo tambor rotatorio.

Forma y Tamaño de Inóculo

En los inicios de esta tesis se compararon FSs inoculadas con esporas y con micelio de *P. chrysogenum* NRRL 1951 proveniente de un cultivo líquido (Barrios-González, *et al.*, 1988a). Como los cultivos inoculados con esporas produjeron una pequeña cantidad de penicilina (7 U/ml) y los inoculados con micelio no produjeron nada, se continuaron los trabajos utilizando inóculo de esporas. Sin embargo, experimentos muy recientes con la cepa P-2 han indicado que sí es posible inocular la FS con micelio cultivado en medio líquido. Esta es una área de trabajo que promete tener importante repercusión en los niveles de producción y productividad del proceso. En el futuro se investigará el efecto del inóculo sobre el crecimiento, así como el efecto del tamaño y edad del inóculo miceliar sobre la idiofase.

Como en el caso del mezclado y las adiciones, estos resultados abren también las puertas a la realización de estudios básicos más versátiles.

Regulación de la Síntesis de Penicilina en FS.

Aunque los resultados sobre regulación por carbono de la síntesis de penicilina sugieren que no hay diferencias en los umbrales regulatorios en ambos sistemas, es muy posible que existan otras diferencias en la fisiología en estos medios que sería importante examinar en futuros trabajos. Por ejemplo, la desrepresión parcial en medio sólido, el manejo de azúcares arriba mencionado, incluyendo el consumo de la lactosa. El hecho de que en el sistema de FS, adaptado para estos estudios, la penicilina se haya destruido anormalmente rápido y justo al agotarse la glucosa podría deberse a que la lactosa fué consumida simultáneamente. También sería interesante investigar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la producción final de la fermentación; enfocando esto a la obtención de la mayor producción posible. En FS_m se sabe que una fase de crecimiento vigorosa repercute en una idiofase más productiva.

Aunque el haber utilizado FS en soporte hizo posible utilizar los mismos medios de cultivo en ambos sistemas, hay que estar conciente de la dificultad de simular perfectamente las condiciones de un sistema en otro para evitar fuentes de variación inesperadas. Sería positivo corroborar o profundizar estos resultados abordando el problema con diferentes estrategias. Por ejemplo, inocular con micelio también la FS para observar un efecto inmediato de la concentración de glucosa sobre el micelio y eliminar la variación que pueda surgir durante la germinación y el crecimiento. Podría también utilizarse sólo glucosa para examinarse la síntesis que se produzca en el período comprendido entre que la concentración desciende por debajo del umbral regulatorio hasta que se agota en ambos medios. Lo anterior representa un sistema modelo más sencillo. Esto se podría comparar con la síntesis obtenida en un cultivo únicamente con lactosa inoculado con micelio. Se podría también medir directamente el efecto de la presencia de glucosa, en FS, sobre la síntesis de la ACV sintetasa y/o la IPN sintetasa (ciclasa) enzimas de la vía cuya síntesis se reprime con la glucosa.

La Cepas Especiales para FS.

Los resultados obtenidos en el estudio con diferentes cepas abre también un panorama amplio y prometido para la realización de futuros trabajos. El contar con prototipos de alta y baja producción relativa es una ventaja, de manera que se realizará una caracterización de

estos prototipos para tratar de encontrar diferencias en fenotipo que den información sobre el genotipo de las cepas especiales para FS. La caracterización incluirá morfología, resistencia a presión osmótica, características de consumo de azúcares y umbrales regulatorios de carbono y de retroregulación por producto.

Desde un punto de vista aplicado, se estudiará la técnica de fusión de protoplastos con el fin de determinar qué características pueden combinarse con alta producción de penicilina en FS. Es decir intentar construir cepas con un perfil de alta producción en sólido, pero con alta velocidad de crecimiento en este medio y buena capacidad de esporulación.

Evaluación del Sistema.

Este trabajo demuestra que es posible producir grandes concentraciones de metabolitos secundarios (penicilina en este caso) en este sistema de FS. Los resultados indican que esta producción puede incrementarse de forma relativamente fácil, optimizando los nutrientes individuales en la zona de nutrientes/agua/soporte de máxima producción; y siguiendo con el mejoramiento genético de la cepas. Probablemente se incrementará más si se realiza un proceso con mezclado y adiciones de agua y nutrientes.

Desde el Punto de Vista Básico

Desde este punto de vista, queda la pregunta de ¿dónde y en qué forma se encuentra esta enorme cantidad de penicilina? Es lógico pensar que el antibiótico genera un gradiente difusional opuesto al de los nutrientes, *i.e.* debe estar difundiendo del micelio hacia el agua libre del medio en la que se encuentra disuelto.

Los estudios de regulación mostraron que los principios que rigen el metabolismo secundario en medio líquido también lo hacen en medio sólido. Sin embargo, debe haber algunas particularidades que, aunque difíciles de detectar, son de capital importancia para comprender la idiofase en FS. Aparentemente, una de estas diferencias es el consumo de nutrientes (azúcares); y otra, posiblemente sea, la acumulación de polioles intracelulares (adaptación a la presión osmótica) y la forma de secreción.

Los estudios genéticos confirman que hay características que permiten una alta producción en FS, las cuales no están relacionadas con un abundante y rápido crecimiento en este medio. El encontrar cuales son estas características señala un camino diferente para descubrir estas particularidades (además de permitir el trabajar ya con los genes específicos). Gracias al presente trabajo, se cuenta ahora con cepas prototipo de alta y baja producción relativa, por lo que un camino para establecer las características es precisamente la caracterización y comparación de éstas.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

- ABRAHAM, E. P., NEWTON, G. G. F. (1961) The structure of cefalosporin C. *J. Biochim. J.* **79**, 377.
- ADRIAENS, P., MEESSCHAERT, B., VANDERHAEGHE, H., EYSSEN, H. (1976) Incorporation of double-labelled valline into δ (L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine by *P. chrysogenum*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **83**, 767.
- AHARANOWITZ, Y., DEMAÏN, A. L. (1978) Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**, 159-164.
- AIDOO, K. E., HENDRY, R., WOOD, J. B. (1982) Solid substrate fermentation, *Adv. in Applied Microbiol.* **28**, 201-237.
- ALAZARD, D., RAIMBAULT, M. (1981) Comparative study of amyolytic enzymes production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. *European J. Appl. Microbiol.* **12**, 113-117.
- ALVAREZ, E., CANTORAL, J. M., BARREDO, J. L., DÍEZ, B., MARTÍN J. F. (1987) Purification to homogeneity and characterization of acylcoenzyme A: 6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1675-1682.
- ANTIER, P., MINJARES, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. (1993) Pectinase-hiperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 254-260.
- AURIA, A., HERNANDEZ, S., RAIMBAULT, M., REVAH, S. (1990) Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Techniques* **4**, 391-396.
- AURIA, R., MORALES, M., VILLEGAS, E., REVAH, S. (1993) Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 1007-1013.
- BALDWIN, J. E., ADLINGER, R. M., MORONEY, S. E., FIELD, L. D., TING, H. H. (1984) Stepwise ring closure in penicillin biosynthesis. Initial β -lactam formation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 984.

- BALL, C. (1987) Genetics in the development of penicillin process. En: Antibiotics and other Secondary Metabolites; Biosynthesis and Production. FEMS Symp. No. 5. Eds. R. Hüter, T. Leisinger, J. Nüesch and W. Wehrli. Academic Press, London, pp. 165-176.
- BANKO, G., DEMAİN, A. L., WOLF, S. (1987) δ (L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillin and cephalosporin precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 2858-
- BARREDO, J. L., ALVAREZ, E., CANTORAL, J. M., DÍEZ, B., MARTÍN, J. F. (1988) Glucokinase-deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 1061-1067.
- BAJRACHARYA, R., MUDGETT, R. E. (1980) Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 2219-2235.
- BANKS, G. T. (1984) Scale-up of fermentation processes. *Topics Enzyme Ferment. Biotechnol.* **3**, 170-266.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., ANAYA, S. (1987) Desarrollo de un sistema para el estudio de la germinación de esporas de *Aspergillus niger*. *Rev. Mex. Mic.* **3**, 9-18.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., GUTIÉRREZ, M., VINIEGRA, G., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. (1988) Modificación al proceso de fermentación sólida para producir metabolitos secundarios microbianos. Certificado de Invención en trámite No 665. México.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., TOMASINI, A., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., LOPEZ, L. (1988) Penicillin production by solid state fermentation, *Biotechnol. Lett.* **10**, 793-798.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., MARTÍNEZ, C., AGUILERA, A., RAIMBAULT, M. (1989) Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Lett.* **11**, 551-554.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., RODRIGUEZ, G. M., TOMASINI, A. (1990) Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **70**, 329-333.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., GONZÁLEZ, H., MEJÍA, A. (1993a) Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotech. Adv.* **11**, 525-537.

- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., CASTILLO, T. E., MEJÍA, A. (1993b) Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotech. Adv.* **11**, 539-547.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., MONTENEGRO, E., MARTIN, J. F. (1993c) Penicillin production by mutants resistant to phenylacetic acid. *J. Ferment. Bioeng.* **10**, en prensa.
- BARSTOW L. M., DALE B. E., TENDERDY R. P. (1988) Evaporative temperature and moisture control in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Techniques.* **2**, 237-242.
- BORROW, A., JEFFREY, E. G., KESSEL, R. N. J., LLOYD, E. C., LLOYD F. B. AND NIXON, I. S. (1961) The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stored culture. *Canadian J. of Microbiol.* **1**, 227-276.
- BU'LOCK, J. D. (1961) Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances Appl. Microbiol.* **3**, 293-342.
- BU'LOCK, J. D. (1967) Essays in biosynthesis and microbial development. "Squibb Lectures". John Wiley and Sons, New York.
- BU'LOCK, J. D. (1974) Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. En: *The Filamentous Fungi*" 1. Industrial Mycology. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. Edward Arnold, London.
- CHAIN, E. (1948) The chemistry of penicillin. *Annu. Rev. Biochem.* **17**, 657.
- CHAIN, E., FLOREY, H. W., GARDNER, A. D., HEATHLEY, N. G., JENNINGS, M. A., EWING, J. O. M., SANDERS, A. G. (1940) Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* **2**, 226
- DEMAIN, A. L. (1957) Inhibition of penicillin biosynthesis by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.* **67**, 244-245.
- DEMAIN, A. L. (1968) Regulatory mechanisms and the industrial production of microbial metabolites. *Lloydia* **31**, 395-418.
- DEMIAN, A. L. (1972) Cellular and environmental factors affecting the synthesis of metabolites. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology* **22**, 345-362.
- DEMAIN, A. L. (1974) Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentations. *Lloydia* **37**, 147.
- DEMAIN, A. L. (1983) Biosynthesis of β -lactam antibiotics. En *Antibiotics Containing the β -lactam Structure*. Eds. A.L. Demain & N.A. Solomon. Springer Verlag, Berlin. pp. 189-228.

- DOELLE, H. W. (1985) Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. *ASEAN Food J.* **1**, 10-14.
- DUFOUR, D. (1990) Production of pectinases dans un milieu adsorbé sur bagasse, Contribution a l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. These Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, p. 262.
- ESPESO, E. A., PEÑALVA, M. A. (1992) Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 1457-1465.
- ESPESO, E. A., TILBURN, J., ARST, H. N., JR., PEÑALVA, M. A. (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**, 3947-3956.
- FAJARDO, C., BARRIOS-GONZÁLEZ, J. (1988) Producción de ácido giberélico por fermentación sólida. XIX Congreso Nacional de Microbiología 26 al 29 de abril. Monterrey, N.L., México.
- FRIEDERICH, C. G., DEMAIN, A.L. (1977) Homocitrate synthetase as the crucial site fo the lysine effect on penicillin biosynthesis. *J. Antibiot.* **30**, 760-761.
- GALLO, M., KATZ, E. (1972) Regulation of secondary metabolite biosynthesis: Catabolite repression of phenoxazinone synthetase and actinomycine formation by glucose. *J. Bacteriol.* **102**, 659-667.
- GONZÁLEZ-BLANCO, P., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. (1990) Protein enrichment of sugar cane by-products using solid-state cultures of *Aspergillus terreus*. *J. Ferment. Technol.* **70**, 351-354.
- GORDEE, E. Z., DAY, L. E. (1972) Effect of exogenous penicillin on penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**, 315-322.
- GOULDEN, S. A., CHATAWAY, F. W. (1968) Lysine control α -amino adipate and penicillin synthesis in *P. chrysogenum*. *Biochem. J.* **110**, 55P.
- GRAJEK, W. (1988) Cooling aspects of solid state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. *J. Ferment. Technol.*, **66**, 675-679.
- GRANT, G. A., HAN, Y. W., ANDERSON, A.W. (1978) Pilot-scale semisolid fermentation of straw. *Applied Environ. Microbiol.* **35**, 549-553.
- GUIRAUD, P., CAILLAUD, J. M., GALZY, P. (1982) Optimization of alcohol production from Jerusalem artichokes. *European J. Appl. Microbiol.*, **14**, 81-85.
- HANG, Y. D., LEE, C. Y., WOODAMS, E. E. (1986) Solid state fermentation of grape pomace for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **8**, 53-56.

- HANG, Y. D., WOODAMS, E. E. (1987) Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. *Biotechnol. Lett.* **9**, 183-186.
- HAYES, W. A. (1977) *Composting* (London, UK: The Mushroom Grower's Association).
- HESEL TINE, C. W. (1977) Solid state fermentation. *Process Biochem.* **12**, 24-27.
- HESEL TINE, C. W. (1977) Solid state fermentation. *Process Biochem.* **12**, 29-32.
- HESEL TINE C. W. (1972) Solid State Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 517-532.
- HESEL TINE C. W. (1977a) Solid state fermentation part 1, *Process Biochem.*, July/August, 24-27.
- HESEL TINE C. W. (1977b) Solid state fermentation part 2, *Process Biochem.*, November. 29-32.
- HESEL TINE C. W. (1987) Solid State Fermentation. An Overview. *Biodeterioration* **23**, 79-89
- JERMINI, M. F. G., DEMAIN, A. L. (1989) Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. *Experientia* **45**, 1061-1065.
- KUMAR, P., K., R., LONSANE, B. K. (1987a) Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 267-271.
- KUMAR, P., K., R., LONSANE, B. K. (1987b) Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. *Biotechnol. Lett.* **9**, 179-182.
- LUENGO, J. M., REVILLA, G., LÓPEZ, M. J., VILLANUEVA, J. R., MARTÍN, J. F. (1980) Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *P. chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **144**, 869-876.
- LUND, F., TYBRING, L. (1972) 6 β -Amidinopenicillanic acids a new group of antibiotics, *Nature (London) New Biol.* **236**, 135.
- MARTÍN, J. F., LUENGO, J. M., REVILLA, G. (1979) Biochemical genetics of β -lactam antibiotic biosynthesis. En: *Genetics of Industrial Microorganisms*. Ed. Sebek, O.J. American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp 205-209.
- MARTÍN, J. F., DEMAIN, A. L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**, 230-251.
- MARTÍN, J. F. & AHARANOWITZ, Y. (1983) Regulation of the biosynthesis of β -lactam antibiotics. En: *Antibiotics Containing β -Lactam Structure. Handbook of*

Experimental Pharmacology, Eds. A. L. Demain & N. Solomon, Vol. 67, pp 220-254, Springer Verlag, Berlin.

- MASUREKAR, P., DEMAIN, A.L. (1972) Lysine control of penicillin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1045-1048.
- MAGGON, K. K., GUPTA, S. K., VENKITASUBRAMANIAN, T. A. (1977) Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* **41**, 822-855.
- MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A. R., TENDERDY, R. P. (1983) Principles of solid sub-strate fermentation. En: *The Filamentous Fungi. Fungal Technology*. Eds. Smith J. E., Berry D. R., Kristiansen B. London, Edward Arnold Publisher. **4**, 117-144.
- MUDGETT, R. E. (1980) Controlled gas environment in industrial fermentations, *Enzyme Microbiol. Technol.* **2**, 273-279.
- MUDGETT, R. E. (1986) Solid state fermentation. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Eds. Demain A.L., Solomon N.A., Washington, American Society for Microbiology, 66-84.
- NARAHARA H., KOYAMA, Y., YOSHIDA, T., PICHANGKURA S., UEDA (1982) Growth and enzyme production in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*, *J. Ferment. Technol.*, **69**, 311-319.
- NARAHARA, H., KOYAMA, Y., YOSHIDA, T., ATHASAMPPUNNA, P., TAGUCHI, H. (1984) Control of water content in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* **62**, 453-463.
- OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. (1992) Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. *Biotechnol. Lett.* **14**, 817-822.
- ONTIVEROS, C. (1993) Molecular and functional analysis of the pcbC gene promoter. Tesis de Doctorado. Universidad Técnica de Graz, Austria.
- ORIOU, E. (1987) Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau, These de Doctorat Microbiologie, Institut National Sciences Appliquées de Toulouse, France, 133 P.
- ORIOU, E., CONTRERAS, R., RAIMBAULT, M., (1987) Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Techniques*, **1**, 79-84.
- ORIOU E., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. (1988 a) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 498-503.

- ORIOI, E., SCETTINO, B., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., RAIMBAULT, M. (1988)
 b) Solid state culture of *Aspergillus niger* on *sup pon*, *J. Ferment. Technol.*, 66,
 57-62.
- QUEENER, S., SWARTZ, R. (1979) Penicillins, biosynthetic and semisynthetic. En:
 Economic Microbiology, Vol. 3, Secondary Products of Metabolism. Ed. A. H.
 Rose. Academic Press, London, pp. 35-122.
- RAIMBAULT M. (1980) Fermentation en Milieu Solide. Croissance de champignons
 filamenteux sur substrat amylacé, These Doct. es Sci., Université Paul Sabatier,
 Toulouse, France, 291 p.
- RAIMBAULT M., ALAZARD D. (1980) Culture method to study fungal growth in
 solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol.* 9, 199-209.
- RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., BARRIOS-GONZÁLEZ, J., GUTIÉRREZ, M.,
 VINIEGRA, G. (1989) Procedé de culture de microorganismes sur un milieu
 solide constituée de d' un support solide absorbant, compressible et non
 fermentable. Patente depositada el 18 de mayo de 1989 con el No. 89 06558.
- RAIMBAULT M., GIRAUD, E., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., SOCCOL, C. R.
 (1991) Valorización de la Yuca a través de la fermentación en '*Avances sobre
 almidón de yuca*', Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali. Colombia.
- RALPH, B. J. (1976) Solid Substrate fermentations. *Food Techn. Aust.* 28, 247-251.
- RAMESH, M. V., LONSANE, B. K. (1991a) Regulation of alpha-amylase production
 in *Bacillus licheniformis* M27 by enzyme end-products in submerged
 fermentation and its overcoming in solid state system. *Biotechnol. Lett.* 11, 649-
 652.
- RAMESH, M. V., LONSANE, B. K. (1991b) Ability of a solid state fermentation
 technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production
 by *Bacillus licheniformis* M27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- RAMOS, F. R., LÓPEZ-NIETO, M. J., MARTÍN, J. F. (1985) Isopenicillin N
 synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts δ -(L- α -
 aminoacidipyl)-L-cysteiny-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents
 Chemother.* 27, 380-387.
- REVILLA, G., LUENGO, J. M., MARTÍN, J. F. (1978) End-product regulation of
 penicillin biosynthesis. Abstr.First Eur. Cong. Biotechnol., p.3/51-3/52.
 Interlaken, Switzerland.

- REVILLA, G., LÓPEZ-NIETO, M. J., LUENGO, J. M., MARTÍN, J. F. (1984) Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *P.chrysogenum*. *J. Antibiot.* 37, 27-35.
- REVILLA, G., RAMOS, F. R., LÓPEZ-NIETO, J. M., ALVAREZ, E., MARTÍN, J. F. (1986) Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N synthetase but not of penicillin acyltransferase in *P.chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 168, 947-952.
- ROSE, A. H. (1979) Production and industrial importance of secondary products of metabolism. En: Economic Microbiology. Secondary Products of Metabolism. Ed. A. H. Rose. Academic Press. pp. 2-32.
- ROUSSOS S. (1982) Mise au point d'une méthode pour l'étude des caractères morphologiques biochimiques et nutritionnels des champignons imparfaits, *Cah. O.R.S.T.O.M. sér. Biol.*, 45, 25-34.
- ROUSSOS S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases, These Doct. es Sci., Université de Provence, France, 193 p.
- ROUSSOS S., OLMOS A., RAIMBAULT, M., SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B.K. (1991) Strategies for large scale inoculum for SSF system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*, *Biotechnol. Techniques.* 5, 415-420.
- RYOO D., MURPHY V. G., KARIM M. N., TENDERDY R. P. (1991) Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. *Biotechnol. Techniques.* 5, 19-24.
- SÁNCHEZ, S., PANIAGUA, L., MATEOS, R. C., LARA, F., MORA, J. (1981) Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *P. chrysogenum*. En: Advances in Biotechnology, Vol. 3, pp 147-154. Eds. Vezina, C. and Singh, K. Toronto, Pergamon Press.
- SÁNCHEZ, S., FLORES, M. E., DEMAIN, A. L. (1988) Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations. En: Nitrogen Sources Control of Microbial Processes, pp 121-136. Ed. S. Sanchez. Boca Ratón, Florida. CRC Press.
- SANKARAN, L. & POGELL, B.M. (1975) Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger*: Regulation and properties of O-demethyl O-methyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 721-732.

- SHANKARANANDA, V. S., RAMESH, M. V., LONSANE, B.K (1992) Idiosyncrasies of solid-state fermentation system in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem.* 27, 33-36.
- SATO K., NAGATANI M., SATO S. (1982) A method of supplying moisture to the medium in a Solid State Culture with forced aeration. *J. Ferment. Technol.* 60, 607-610.
- SATO, K., NAGATANI, M., NAKAMURA, K., SATO, S. (1983) Growth estimation of *Candida Lipolydca* from oxygen uptake in a solid state fermentation with forced aeration. *J. Ferment. Technol.* 61, 623-629.
- SATO, K., NAKAMURA, K., SATO, S. (1985) Solid state ethanol fermentation by means of inert gas circulation. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 1312-1319.
- SATO K., YOSHIZAWA K. (1988) Growth and growth estimation of *Saccharomyces cerevisiae* in solid state ethanol fermentation, *J. Ferment. Technol.* 66, 667-673.
- SATO K., MIYAZAKI S. L., MATSUMOTO N., YOSHIZAWA K., NAKAMURA K. L. (1988) Pilot Scale Solid state ethanol fermentation by inert gas recirculation using moderately thermophilic yeast, *J. Ferment. Technol.* 66, 173-180.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. (1987) Contribución al estudio de la fermentación sólida: Enriquecimiento proteico y conservación por ensilaje, Tesis Maestría en Ciencias Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 169 p.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA J. G., GONZÁLEZ, P., REVAH, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., RAIMBAULT, M. (1990a) Effect of lactobacilli inoculation on Cassava (*Manihot esculenta*) Silage: fermentation pattern and kinetic analysis. *J. Sci. Food Agric.* 50, 467-477.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., GUTERREZ-ROJAS M., BACQUET G., RAIMBAULT M., VINIEGRA-GONZÁLEZ G. (1990b) Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35, 802-808
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., RAIMBAULT, M., VINEGRA-GONZÁLEZ, G. (1990c) Energy of activation in cassava silages., *J. Sci. Food Agric.* 53, 559-562.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., DUFOUR, D., TREJO, M., SOCCOL, R. C., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. (1991a) On line gaz analysis in Solid State Fermentation at *Fenabio Biolatina* 91, Sao Paulo, Brazil, 6-10 July.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA G., LONSANE B. K., KRISHNAIAH M. M., NAVARRO J. M. ROUSSOS S., RAIMBAULT M. (1991b) Maintenance of heat and water

- balances as a scale up criterion for production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in solid state fermentation system. *Process Biochem.* En prensa.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B. K., NAVARRO, J. M., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. (1991e) Critical importance of medium pH in solid state fermentation system for growth of *Schwanniomyces castellii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Soumis.
- SHEN, Y.-Q., HEIM, SOLOMON, N. A., WOLFE, S., DEMAINE, A. L. (1984) Repression of β -lactame production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37, 503.
- SILMAN, R. W., CONWAY, H. F., ANDERSON, R. A., BAGLEY, E. B. (1979) Production of aflatoxin in corn by a large scale solid substrate fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1799-1808.
- SILMAN, R. W. (1980) Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 411-420.
- SMITH, A. (1985) Cephalosporins. En: *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Eds. Blanch, H. W., Drew, S., Wang, D. I. C., Pergamon Press, London. pp 163
- SMITH, J. E. & BERRY, D.R. (1976) *Biochemistry of Fungal Development*. Academic Press, London, New York.
- SOLIS-PEREIRA, S., FAVELA-TORRES, E., VINIEGRA-GONZALEZ, G., GUTIERREZ-ROJAS, M. (1993) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 36-41.
- SOLTERO, F. V., JOHNSON, M. J. (1953) Effect of carbohydrate nutrition on penicillin production by *P. chrysogenum* Q-176. *Appl. Microbiol.* 1, 52-57.
- SOLTERO, F. V., JOHNSON, M. J. (1954) Continuous additions of glucose for evaluation of penicillin-producing cultures. *Appl. Microbiol.* 2, 41-44.
- SOMERSON, N. L., DEMAINE, A. L., NUNHEIMER, T. D.: Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α -amino adipic acid. *Arch. Biochem.*, 93, 238-241 (1961).
- TREJO, M. R. (1992) *These de Doctorat Biologie Cellulaire-Microbiologie*, Université de Provence, Aix-Marseille I, France.
- ULMER, D. C., TENDERDY, R. P., MURPHY, V. G. (1981) Solid state fermentation of steam treated feedlot waste fibers with *Chaetomium cellulolyticum*. *Biotechnol. Bioeng., Symp.* 11, 449-461.
- UNDERKOFER, L. A., SEVERSON, G. M., GOERING, K. J., CHRISTENSEN, L. M. (1947) Commercial production and use of mold bran. *Cereal Chem.* 24, 1-22.

- VIESTURS, U. E., STRIKAUSDA, S. V., LEITE, M. P., BERZINS, A. J., TENDERDY R. P. (1987) Combined submerged and solid substrate fermentation for the bioconversion of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 282-288.
- WANG, H. L., SWAIN, E. W., HESSELTINE, C. W. (1975) Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *J. Food Sci.* 40, 168.
- WANG, D. I. C., COONEY, C. L., DEMAINE A. L., DUNNILL P., HUMPHREY A. E., LILLY M. D. (1989) *Fermentation and Enzyme Technology*, New York USA: John Wiley and Sons.
- YANG, S. S. (1988) Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 886-890.
- YANG, S. S., LING, M. Y. (1989) Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* 33, 1021-1028.
- ZAIRE, R., MOULIN G., GALZY P. (1988) Fermentation of wheat grain by *Schwanniomyces castellii*, *Biomass* 15, 175-185.
- ZAIRE, R. (1986) Essais de fermentation alcoolique direct de farines et de grains broyés de blé par *Schwanniomyces castellii*, Diplôme d'Etudes Approfondies, Sciences des Aliments, Nutrition et Fermentation, Université Montpellier II Sciences Techniques du Languedoc, 49 p.
- ZADRAZIL, F. (1975) Influence of CO₂ concentration the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1, 327-335.
- ZANCA, D. M., MARTÍN, J. F. (1983) Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiotics* 36, 700-708.
- ZANGH, J. Y., WOLOFE, S., DEMAINE, A. L. (1987) Effect of ammonium as nitrogen source on production of ACV synthetase by *Cephalosporium acremonium* C-10. *J. Antibiot.* 40, 1746.

X.-INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

Esquema 1. Estructura química de las penicilinas	17
Esquema 2. Rutas biosintéticas de L-lisina, penicilina G y cefalosporina en hongos.	18
Tabla 1 Campos de aplicación de la FS.	27
Tabla 2. Efecto de la relación de los componentes del medio sólido sobre la producción de penicilina y el crecimiento de <i>P.chrysogenum</i> P-2.	60
Tabla 3. Velocidades específicas de formación de CO ₂ en las condiciones de máxima producciones de penicilina en FS. <i>a</i> Tasa específica de formación de CO ₂ .	61
Tabla 4. Cálculo aproximado de las tasas de consumo de glucosa en FSM y FS con diferentes concentraciones iniciales del azúcar.	84
Tabla 5. Producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios por fermentación sólida	106
Fig. 1 Combinaciones teóricas de los componentes del medio sólido (nutrientes/ agua/ bagacillo). Marcada en negro la zona en la que se estudió la producción de penicilina.	54
Fig. 2 Producciones máximas de penicilina obtenidas en cultivos sólidos con humedades crecientes, contenidos de bagacillo decrecientes y concentraciones de nutrientes crecientes.	55
Fig. 3 Producciones (máximas) de penicilina obtenidas en cultivos sólidos con humedades crecientes, contenidos de bagacillo y concentraciones de nutrientes decrecientes. Relación bagacillo/nutrientes constante.	55
Fig. 4 Producciones (máximas) de penicilina obtenidas en cultivos sólidos con humedades crecientes, contenidos de bagacillo crecientes y concentraciones de nutrientes decrecientes. Relación bagacillo/agua constante.	56
Fig. 5a Superficie de respuesta de la producción de penicilina en cultivos sólidos con diferentes relaciones agua/soporte (AGUABAG) y nutrientes/soporte (NUTRBAG). La concentración de penicilina obtenida fue normalizada en relación a la producción de las condiciones control.	57
Fig. 5b Actividad de agua (Aw) inicial de cultivos con diferentes relaciones agua/soporte (AGUABAG) y nutrientes/soporte (NUTRBAG).	57
Fig. 5c Producción total de CO ₂ (ml totales/columna) de cultivos sólidos con diferentes relaciones agua/soporte (AGUABAG) y nutrientes/soporte (NUTRBAG).	58
Fig. 5d Producción de penicilina en cultivos sólidos con diferentes relaciones agua/soporte (A/B) y nutrientes/soporte (N/B). Recuadro en zona de máximos	58
Fig 6 Efecto del mezclado sobre la producción de penicilina por <i>P.chrysogenum</i> P-2 en FS.	75

Fig 7 Efecto del mezclado sobre la respiración (producción de CO₂ total/g de materia seca de <i>P.chrysogenum</i> P-2.	75
Fig. 8 Producción de penicilina (a) y consumo de azúcares reductores (b) durante el crecimiento de <i>P.chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.	77
Fig. 9 Producción de penicilina (a) y consumo de glucosa (b) de <i>P.chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.	79
Fig. 9 Crecimiento (c) y variación de pH (d) durante el cultivo de <i>P.chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sumergidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.	80
Fig. 10 Producción de penicilina (a) y consumo de glucosa (b) durante el crecimiento de <i>P.chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante). La concentración de glucosa se da en g/l, ya que se considera que este efector se encuentra disuelto en el agua absorbida en el medio sólido.	82
Fig. 11 Cinéticas de pH (a), humedad (b) y concentración de biomasa (c) (método gravimétrico) durante la producción de penicilina en FS.	83
Fig. 12 Producción de penicilina G pr <i>P.chrysogenum</i> P-2, en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de penicilina V. La concentración de penicilina V se da en µg/ml por considerarse que este efector se encuentra disuelto en el agua absorbida en el medio sólido.	85
Fig. 13 Estabilidad de la penicilina V (exógena) durante el cultivo de <i>P.chrysogenum</i> P-2 en FS.	85