

244
res



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LOS CONSTITUYENTES (SOPORTE,
NUTRIENTES Y AGUA) SOBRE LA PRODUCCION DE
PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MONICA ISABEL DOMINGUEZ LAGUNA



MEXICO, D. F.



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

1995

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Mónica Isabel Domínguez Laguna

con número de cuenta 8415309-4 con el Título: Efecto de los constituyentes (soporte, nutrientes y agua) sobre la producción de penicilina en fermentación sólida.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Doctor	Javier	Barrios González	
Director de Tesis M. en C.	José Adelfo	Escalante Lozada	
M. en C.	Armando	Mejía Alvarez	
Biólogo	Rosalinda	Tapia López	
Suplente O.T.B.	Maura	Cárdenas García	
Suplente			

**A mis padres, Araceli Laguna y José Domínguez
por todo su amor, apoyo y comprensión**

**A mi hermano José Antonio
por apoyarme siempre en mis estudios y consentirme tanto**

A toda mi familia de Tabasco

**A mis amigos, Adriana, América, Ivette, Marisa y José Luis
por todas las alegrías**

**A mi mejor amigo, Adrián, y a Lety
por haber compartido conmigo momentos maravillosos
y viajes por siempre inolvidables**

**A mis compañeros de laboratorio, Vero, Claudia, Susana, Juvenal y Tere
por su valiosa ayuda y su sincera amistad**

**A la memoria de mi abuelita Santa,
de mi entrañable tío Federico
y de Mariano**

A Luis Nava

Adradezco al Dr. Javier Barrios González y al M. en C. Armando Mejía Álvarez por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y por todas sus valiosas enseñanzas.

Además, especialmente le agradezco al Dr. Javier Barrios González su gran ayuda en la revisión, análisis y discusión de este trabajo.

También quiero agradecerles a la Bio. Rosalinda López, a la Q.F.B. Maura Cárdenas y al M. en C. Adelfo Escalante, por haber aceptado formar parte de la Comisión Dictaminadora y por sus preciados comentarios y recomendaciones acerca de este trabajo.

A Luis Nava le agradezco enormemente el que haya desarrollado el programa TRIANGULO que sirvió especialmente para la culminación de mi trabajo y por su ayuda en la elaboración de la misma.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolismo Secundario del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Javier Barrios González y del M. en C. Armando Mejía Álvarez.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	4
2.1. Fases de Crecimiento en los Hongos	4
2.2. Metabolismo Primario y Secundario	5
2.3. Importancia de los Metabolitos Secundarios	7
2.4. Antibióticos	9
2.5. Penicilina	10
2.5.1. Estructura Química	11
2.5.2. Biosíntesis	13
2.5.3. Mecanismos de Regulación en la Biosíntesis de Penicilina	14
2.6. Fermentación Sólida.	16
2.6.1. Microorganismos utilizados en FS	18
2.6.2. Sustratos utilizados en FS	19
2.6.3. Diferencias entre la FS y la FL	19
2.6.3.1. Desventajas de la Fermentación Líquida	20
2.6.3.2. Ventajas de la Fermentación Sólida	20
2.6.3.3. Limitantes de la Fermentación Sólida	21
III. ANTECEDENTES	22
IV. OBJETIVOS	24
V. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1. Microorganismos	25
5.2. Medios de Cultivo	25
5.2.1. Medio para Bioensayos	25
5.2.2. Medios de Esporulación	25

6.2.3. Medio para Fermentación Sólida	27
5.3. Reactivos	27
5.3.1. Buffer de Fosfatos para Extracción de Penicilina	27
5.3.2. Reactivo DNS para la Determinación Azúcares Reductores	27
5.4. Conservación de la Cepa	28
5.5. Fermentación Sólida	28
5.5.1. Pruebas de pH	30
5.5.2. Producción de esporas para la obtención del inóculo	30
5.5.3. Pretratamiento del soporte	30
5.5.4. Preparación del medio de fermentación sólida	31
5.5.5. Condiciones del Cultivo	31
5.5.6. Desarrollo de los Métodos Analíticos	31
6.5.6.1. Actividad de agua.	32
5.5.6.2. Humedad	32
5.5.6.3. pH	32
5.5.6.4. Biomasa	32
5.5.6.4. Cuantificación de penicilina	33
5.5.6.6. Cuantificación de Azúcares Reductores	34
5.5.6.7. Respirometría por Cromatografía de gases	34
5.5.6.8. Cinética de Esporulación	34
VI. RESULTADOS.	35
6.1. Determinación de las cantidades máximas y mínimas de cada uno de los constituyentes (bagacillo/nutrientes/agua) de la fermentación sólida en las diferentes combinaciones	35
6.2. Efecto de la concentración del medio complejo de producción, manteniendo constante la relación bagacillo/agua (serie I)	38
6.2.1. pH	39
6.2.2. Humedad	39
6.2.3. Consumo de azúcares reductores	40
6.2.4. Producción de penicilina	41
6.2.5. Esporulación	44
6.2.6. Respiración	44

6.3. Efecto la contenido de agua, manteniendo constante la relación bagacillo/nutrientes (serie 2)	50
6.3.1. pH	50
6.3.2. Humedad	51
6.3.3. Consumo de azúcares reductores	52
6.3.4. Producción de penicilina	53
6.3.5. Esporulación	54
6.3.6. Respiración	54
6.4. Efecto de la contenido de bagacillo, manteniendo constante la relación nutrientes/agua (serie 3)	59
6.4.1. pH	59
6.4.2. Humedad	60
6.4.3. Consumo de azúcares reductores	60
6.4.4. Producción de penicilina	61
6.4.5. Esporulación	62
6.4.6. Respiración	64
6.5. Efecto de los constituyentes (bagacillo/nutrientes/agua) de la Fermentación Sólida sobre la producción de penicilina y el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i>	68
VII. DISCUSIÓN	74
7.1. Efecto de la Proporción de los Constituyentes en la Producción de Penicilina	75
7.2. Efecto de la Proporción de los Constituyentes en la Respiración	76
7.2.1. Medición de la Respiración	76
7.2.2. Rel. entre el Contenido de Soporte, Producción y Tasa de Respiración	78
7.2.3. Rel. de la tasa de Respiración con el Consumo de Azúcares Reductores	79
7.2.4. Rel. entre la Actividad de Agua y la Respiración	82
7.2.5. Rel. entre la Esporulación y la Tasa de Respiración.	82
7.3. Condiciones de Máxima Producción	83
VIII. CONCLUSIONES	85
IX. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	86

INDICE DE TABLAS

Tabla

1. Diferentes condiciones de cultivo para el sistema de Fermentación Sólida cuyos constituyentes son: bagacillo de caña (b), nutrientes (medio Somerson modificado) (n) y agua (a). Condiciones estándar (*). En la sección 5.5.1 se hace referencia a los valores de pH mostrados en las últimas dos columnas. 29
2. Efecto de la concentración de nutrientes (n) sobre la Producción de Penicilina y el Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en Fermentación Sólida cuando la relación bagacillo/agua (b/a) es constante. 49
3. Efecto del contenido de agua (a) sobre la Producción de Penicilina y el Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en Fermentación Sólida cuando la relación bagacillo/nutrientes (b/n) es constante. 58
4. Efecto de la cantidad de bagacillo (b) sobre la Producción de Penicilina y el Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en Fermentación Sólida cuando la relación nutrientes/agua (n/a) es constante. 67
5. Tasas de respiración durante la idiofase (Q_{CO_2-2}) en condiciones control y en condiciones de alta y baja producción de penicilina de cada serie experimental. 73

INDICE DE FIGURAS

Figura.

1. Estructura básica de la penicilina (β -lactama-tiazolidina).	11
2. Intermediarios metabólicos de la vía de biosíntesis de L-lisina y de la penicilina G. Regulación por L-lisina.	14
3. Efecto de la concentración de nutrientes en las cinéticas de pH (a) y Humedad (b) durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (bagacillo y agua) se mantuvieron en una relación constante (serie 1).	40
4. Efecto de la concentración de nutrientes en el Consumo de azúcares (a), Producción de Penicilina (b) y Esporulación (c) durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (bagacillo y agua) se mantuvieron en una relación constante (serie 1).	43
5. Efecto de la concentración de nutrientes en el Consumo de oxígeno (a), Velocidad de producción de CO ₂ (b) y Producción de CO ₂ total por columna durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (bagacillo y agua) se mantuvieron en una relación constante (serie 1).	48
6. Efecto del contenido de agua inicial en las cinéticas de pH (a) y Humedad (b) durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (soporte y nutrientes) se mantuvieron en una relación constante (serie 2).	52
7. Efecto del contenido de agua inicial en el Consumo de azúcares (a), Producción de Penicilina (b) y Esporulación (c) en las cinéticas de pH (a) y humedad (b) durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (soporte y nutrientes), se mantuvieron en una relación constante (serie 2).	56
8. Efecto del contenido de agua inicial en el Consumo de oxígeno (a), Velocidad de producción de CO ₂ (b) y Producción de CO ₂ total por columna durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (soporte y nutrientes) se mantuvieron en una relación constante (serie 2).	57
9. Efecto del contenido de soporte en las cinéticas de pH(a) y humedad (b) durante el crecimiento de <i>Penicillium chrysogenum</i> en FS. La concentración nutrientes/agua (los otros dos constituyentes del medio sólido) se mantuvo constante (serie 3).	61

- 10. Efecto del contenido de soporte en el Consumo de azúcares (a), Producción de Penicilina (b) y Esporulación (c) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. La concentración nutrientes/agua (los otros dos constituyentes del medio sólido) se mantuvo constante (serie 3).** 63
- 11. Efecto del contenido de soporte en el Consumo de oxígeno (a), Velocidad de Formación de CO₂ (b) y Producción de CO_{2total} por columna (c) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. La concentración nutrientes/agua (los otros dos constituyentes del medio sólido) se mantuvo constante (serie 3).** 65
- 12. Producción (máxima de penicilina) en cultivos con diferentes relaciones agua/soporte y nutrientes soporte (combinaciones soporte, nutrientes y agua).** 69
- 13. Picos de Producción Máxima de Penicilina en FS, cuando el incremento en el contenido de nutrientes fue compensando por 3 caminos diferentes.** 70
- 14. Picos de Producción Máxima de Penicilina en FS, cuando el incremento en la humedad inicial fue compensando por 3 caminos diferentes.** 71
- 15. Combinaciones de los constituyentes del medio sólido (soporte, nutrientes y agua). La zona punteada representa las combinaciones experimentalmente probadas en que se estudió la producción de penicilina.** 72
- 16. Producción total de CO₂ de cultivos con diferentes relaciones agua/soporte y nutrientes soporte (combinaciones soporte, nutrientes y agua).** 73
- 17. Relación de la Tasa de Respiración con el Consumo de Azúcares Reductores.** 79

I. INTRODUCCION

La fermentación sobre sustratos sólidos es uno de los muchos fenómenos naturales que ha despertado el interés del hombre desde la antigüedad. Tradicionalmente y por milenios, su aplicación ha tenido lugar en el Oriente, donde los eventos religiosos y los distintivos sabores de los alimentos fermentados jugaron un papel importante en su establecimiento (Cannel y Moo-Young, 1980). Otros alimentos fermentados como lo son la elaboración de pan y quesos madurados, la preservación de una gran variedad de alimentos de origen animal y la producción de ácido gálico y vinagre, constituyen sistemas de fermentación sólida que han existido por cientos y miles de años; algunos conocidos desde entonces, en muchas otras partes del mundo (Aido, *et al.*, 1982).

En la actualidad, tanto en el Oriente como en el Occidente han surgido y evolucionado diferentes tipos de fermentación sólida que han sido modernizados y revalorizados en nuevas aplicaciones para la obtención de productos de interés, principalmente de tipo alimenticio, farmacéutico y químico. Estos procesos de fermentación sólida son utilizados en la obtención de importantes productos microbianos algunos de los cuales incluyen la producción de enzimas, como poligalacturonasas, D-xilanasas y β -galacturonasas (Grajek, 1987), ácidos orgánicos como el ácido cítrico (Hang y Woodams, 1987), metabolitos secundarios del tipo micotoxinas (Hesseltine 1972) y antibióticos (Barrios-González, *et al.*, 1988a; Ohno, *et al.*, 1992), enriquecimiento protéico de alimentos (Mitchell, *et al.*, 1988) y bioconversión de desechos agrícolas, animales y domésticos en productos útiles, entre otros. En comparación con la tecnología convencional, muchas de las nuevas aplicaciones en sistemas de fermentación sólida han presentado mayores ventajas, debido principalmente a las condiciones ambientales que pueden ser cercanamente parecidas a las de la naturaleza de muchos microorganismos de interés, como los hongos.

En el Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa se conformó un grupo de investigadores franco-mexicano que desarrolló procesos de fermentación sólida. Estos procesos han sido utilizados en el enriquecimiento proteínico de la yuca (Raimbault, *et al.*, 1985), en la producción de enzimas como celulasas (Roussos, 1985) y pectinasas (Trejo, 1985) y en la producción de metabolitos secundarios como las aflatoxinas (Barrios-González, *et al.*, 1990). Recientemente este mismo grupo de investigadores desarrolló un nuevo sistema de fermentación sólida que incluye el uso de soportes inertes con gran capacidad de retención de agua (*i.e.* bagacillo de caña) los cuales son impregnados con medios de cultivo líquido. Dicho sistema fue patentado por Barrios-González, *et al.*, (1988b) y caracterizado por Oriol, *et al.*, (1988a). Como era de esperarse, la actividad de agua fue estimada como un factor crítico en el crecimiento de los hongos filamentosos. La disponibilidad de los carbohidratos monoméricos se hizo mayor al separar el sustrato y el soporte además de asegurar las condiciones geométricas constantes durante el crecimiento (Oriol, *et al.*, 1988b).

Con base en estos primeros estudios, Barrios-González y colaboradores evaluaron la posibilidad de utilizar este sistema para producir un metabolito secundario de importancia comercial, como la penicilina (Barrios-González, *et al.*, 1988a). Ellos realizaron una comparación entre el método de fermentación líquida (FL) y este tipo de fermentación sólida (FS) utilizando *Penicillium chrysogenum* cepa Wisconsin 54-1255. Los resultados mostraron una mayor producción y un mayor rendimiento de penicilina en la FS que en la FL. Además, debido a las características propias del sistema, los costos de energía en los procesos, tales como la esterilización, la agitación y la aireación disminuyen. Experimentalmente, estas nuevas condiciones de cultivo (FS) han conferido mayores ventajas, tanto para la producción como para el aspecto económico del proceso fermentativo. Estos resultados han derivado en un mayor interés por profundizar en el

conocimiento básico fisiológico y en los factores que controlan la producción del antibiótico en este sistema.

Hasta el momento, los estudios fisiológicos han contemplado el efecto de factores físicos y ambientales como el tamaño de partícula, la densidad de empaque y el mezclado (González, 1993); así como la adición de agua y lactosa durante la FS (Durán, *et.al.* 1994). Pero en cuanto al efecto de los constituyentes (soporte, nutrientes y agua) del medio de fermentación sólida, ha sido considerado el efecto independiente de sólo uno de ellos ya sea humedad o concentración (Barrios-González *et al.*, 1988). Sin embargo, para obtener un cierto valor en uno de estos parámetros es posible hacerlo por diferentes caminos, resultando así, diferentes combinaciones entre ellos y por lo tanto, nuevas condiciones de cultivo. El efecto de las interacciones entre los constituyentes del medio de fermentación sólida en la fisiología del microorganismo y particularmente en la producción de penicilina son estudiados en este trabajo.

II. GENERALIDADES

2.1. Fases de Crecimiento en los Hongos.

El crecimiento y metabolismo de los hongos atraviesa varias fases. En 1961, Borrow, *et. al.* considero tres fases principales: fase balanceada, fase de almacenamiento y fase de mantenimiento. Durante la fase balanceada, el crecimiento ocurre exponencialmente hasta que un nutriente esencial generalmente conteniendo nitrógeno o fósforo se agotan y comprometen a la célula a la diferenciación bioquímica. Continúa la fase de almacenamiento, durante la cual, la masa celular sigue incrementándose debido a la acumulación de materiales de reserva como son ácidos grasos y carbohidratos. La producción de metabolitos secundarios empieza en esta fase. Por último, en la fase de mantenimiento, dicha masa celular permanece constante y el aumento de metabolitos secundarios continúa (Martin y Demain, 1978).

Pocos años mas tarde, en 1967, Bu'Lock introdujo los siguientes términos: trofofase, para describir las etapas del metabolismo primario, que corresponden a la fase de crecimiento balanceado e idiofase (o fase del metabolismo secundario) que corresponde a la fase de almacenamiento y fase de mantenimiento. Actualmente, estos términos son comúnmente utilizados a pesar de que los metabolitos secundarios no son justificablemente descritos como metabolitos idiosincráticos o peculiares, ya que según los conocimientos recientes sobre el origen biosintético de los metabolitos secundarios, así como, los mecanismos de regulación que operan en las rutas involucradas en su biosíntesis son muy similares a las del metabolismo primario (Bu'Lock, 1975). Por otro lado, cabe mencionar que la separación entre trofofase e idiofase no se encuentra bien delimitada, ya que en muchas fermentaciones (de microorganismos filamentosos, principalmente) éstas dos fases se traslapan (Wang *et. al.*, 1979).

Otras dos fases son consideradas por otros autores quienes describen una primer fase de adaptación o latencia también denominada Lag y una última fase de declinación en donde el número de células viables empieza a disminuir y la tasa de mortalidad aumenta progresivamente debido a una autólisis bajo la acción enzimática de las mismas células (Smith y Berry, 1974; Leveau y Bouix, 1985).

2.2. Metabolismo Primario y Secundario.

El metabolismo primario es un proceso integrado que requiere de la actividad coordinada de numerosas enzimas que regulan las diferentes rutas metabólicas. Este es un proceso conservativo, el cual bajo circunstancias normales no consume energía o carbono para elaborar compuestos ya disponibles en el medio. La coordinación de las funciones del metabolismo aseguran que en cualquier momento en particular, sólo sean elaboradas cada una de las enzimas necesarias y en la cantidad precisa. Los metabolitos primarios son productos de este metabolismo que ocurre durante la trofofase, por lo que su síntesis constituye una parte integral en el proceso normal de crecimiento, siendo elaborados durante la fase exponencial. Estos metabolitos incluyen intermediarios y productos finales del metabolismo anabólico, los cuales son normalmente utilizados por la célula como constituyentes de macromoléculas esenciales tales como DNA, RNA, proteínas, lípidos y polisacáridos o son convertidas a coenzimas (vitaminas). Otros metabolitos primarios resultan del metabolismo catabólico que permiten el crecimiento continuo, relacionado con la producción de energía y utilización del sustrato (Britz y Demain, 1985).

El metabolismo primario es esencialmente idéntico para todos los seres vivos. Sin embargo, existen ciertos grupos taxonómicos (actinomicetos y hongos filamentosos) capaces de sintetizar bajo condiciones nutricionales específicas, tipos especiales de metabolitos, utilizando las mismas enzimas del metabolismo primario ó sintetizadas especiales producidas

en células específicas. Estos metabolitos son también llamados metabolitos secundarios o idiolitos ya que son producidos durante la llamada idiofase. Estos metabolitos no son esenciales para el crecimiento ya que por el contrario, son usualmente producidos a una tasa disminuída de crecimiento específico, afectando en conjunto series de procesos biosintéticos e induciendo la formación de estructuras diferenciadas. Los metabolitos secundarios son producidos típicamente como miembros de una familia química particular y la proporción de cada componente depende de factores genéticos y ambientales, aparentemente por la baja especificidad de las enzimas involucradas. En contraste, la biosíntesis de metabolitos primarios es llevada siempre con gran especificidad, generalmente un substrato es aceptado y sólo uno es formado. Esta estricta especificidad, es debido a que la biosíntesis de componentes esenciales con errores puede ser letal para la célula, mientras que en el metabolismo secundario no son usualmente de consecuencias ya que en especial, estos metabolitos modificados retienen actividad biológica (Martin y Demain, 1980).

El crecimiento y el metabolismo secundario deben ser entendidos como procesos que compiten por intermediarios metabólicos claves, más que como un fenómeno mutuamente exclusivo (Martin y Demain, 1980). De esta manera, tenemos que los metabolitos secundarios son sintetizados por una gran variedad de rutas que divergen de rutas establecidas en el metabolismo primario; pero a pesar de esto y de que los productos finales son de una gran variedad, se originan sólo a partir de unos cuantos precursores claves (Bir'Lock, 1961 y 1965). Por otra parte, es importante tomar en cuenta que si estos dos procesos son traslapados en ocasiones y no es posible determinar el momento exacto en que termina el crecimiento y comienza el metabolismo secundario, entonces la medida de tiempo no debe ser utilizada para definir a un metabolito secundario. Un metabolito secundario, es secundario sólo porque no es necesario para el crecimiento exponencial del cultivo (Smith y Berry, 1974; Martin y Demain, 1980).

Entre otras características distintivas de los metabolitos secundarios se encuentran su estructura química rara, que involucra enlaces químicamente inusuales, tales como anillos β -lactámicos, péptidos cíclicos hechos de aminoácidos normales o modificados y enlaces insaturados característicos de diferentes tipos de antibióticos; así como dos diferentes mecanismos que regulan su síntesis:

- i) controles regulatorios, que operan en relación al crecimiento y
- ii) efectos regulatorios específicos que actúan sobre rutas individuales (inducción, regulación catabólica, regulación por producto); similares a los procesos primarios (Martin y Demain, 1980).

2.3. Importancia de los Metabolitos Secundarios.

Frecuentemente, en los cultivos de laboratorio, los metabolitos secundarios son producidos cuando las células envejecen y los nutrientes empiezan agotarse, o en cultivos sumergidos, cuando el oxígeno suministrado empieza a limitarse. Esto es considerado como una "crisis metabólica" que puede ocurrir a este tiempo induciendo el metabolismo secundario (Calam, 1982). Al respecto, consideraremos algunas explicaciones que sugieren el porqué los microorganismos sintetizan estos metabolitos secundarios y cuál es su papel en la naturaleza.

Una primera explicación sugiere que estos metabolitos secundarios constituyen una reserva de alimentos acumulados cuando el suplemento de nutrientes es abundante y que son utilizados cuando se presenta una escasez de alimento. Sin embargo, el hecho de que muchos metabolitos secundarios sean consumidos por microorganismos cuando el suplemento de carbohidratos es agotado, no explica la increíble diversidad química en los metabolitos secundarios. Por otra parte, la producción de antibióticos ha sido considerada como una arma biológica en la competencia intermicrobiana. Pero, no todos los metabolitos

secundarios tienen actividad antibiótica. Así, la explicación comúnmente favorecida por la mayoría de los fisiólogos microbianos es que el proceso de metabolismo secundario es importante para los microorganismos independientemente de la naturaleza química de los metabolitos. Brevemente, esta explicación propone que los microorganismos los cuales entran a la fase estacionaria de crecimiento y son incapaces de cortar la producción de intermediarios de bajo peso molecular requeridos durante el crecimiento para la síntesis de constituyentes celulares, convierten estos precursores en compuestos inócuos que no reprimen esta síntesis. De esta manera, los microorganismos evitan los problemas metabólicos por la acumulación intracelular de grandes concentraciones de compuestos de bajo peso molecular y al mismo tiempo continúa operando el proceso sintético durante tiempos de estrés metabólico (Rose, 1979).

Además, sin olvidar la ya mencionada función de sobrevivencia de metabolitos secundarios, como los antibióticos, los fisiólogos de plantas y animales le dan principalmente a estos metabolitos un papel en la naturaleza. Considerando al metabolismo secundario de diferente manera, esto es, como parte integrante de su ciclo de vida, ya que se piensa que pueden ser señales entre hospederos y depredadores (Calam, 1979), o bien, como lo muestran los experimentos realizados por Luxton (1972), en cuanto a la producción de penicilina, en donde organismos depredadores seleccionan su alimento (su presa, en este caso un hongo productor), al parecer, por el olor y sabor que desprenden estos metabolitos. Así, la eliminación de un hongo en particular en el medio, permite el advenimiento del próximo sucesor de la cadena (Calam, 1982). Particularmente, en las plantas, se pensó inicialmente que estos compuestos no debían ser otra cosa que sustancias de desecho del metabolismo. Sin embargo, se ha descubierto, por una parte, que algunos son sintetizados activamente por la planta y por otra, se ha sugerido que algunos otros están involucrados en diversas actividades que incluyen, por ejemplo, la protección contra las radiaciones ultravioleta, la desecación o la detoxificación de venenos ambientales (Dirzo, 1985).

2.4. Antibióticos.

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que tiene el poder de inhibir el crecimiento de otros microorganismos o destruirlos. Su interés económico deriva principalmente de la utilización médica para luchar contra las enfermedades infecciosas. Son sustancias específicas que no tienen una distribución generalizada entre los microorganismos y son producidas por un número limitado de especies. El género *Streptomyces* agrupa a una gran parte de microorganismos productores de antibióticos (Arnaud y Guirard, 1985). Al igual que otros metabolitos secundarios, sólo se producen cuando el crecimiento decrece bajo ciertos niveles y pueden ser efectores de diferenciación en la formación de esporas o establecer el tiempo en la germinación de éstas. Las especies productoras son sensibles durante el crecimiento al antibiótico que produce y durante la fase de producción resisten debido a mecanismos que incluyen:

- i) modificación del antibiótico por enzimas sintetizadas por el mismo microorganismo productor (destoxificación);
- ii) alteración del antibiótico "blanco" en la célula productora; y
- iii) una disminución en la permeabilidad interior al antibiótico, después de excretarlo (Martin y Demain, 1980).

Se distinguen según su vía de síntesis y su estructura química varios grupos de antibióticos como son: β -lactámicos, polipeptídicos, aminoglucosídicos, "macrolídicos" (o antibióticos cíclicos) y tetraciclina; así como algunos otros cuya estructura difiere de los grupos precedentes (Arnaud y Guirard, 1985). El grupo de antibióticos β -lactámicos es de gran importancia clínica y comprende dos tipos principales: las penicilinas y las cefalosporinas; ambas empleados como agentes terapéuticos. Estos antibióticos generalmente ejercen su efecto biológico interfiriendo en la síntesis de forma irreversible, de compuestos

estructurales de la pared bacteriana. Siendo considerados como antibióticos altamente efectivos y de baja toxicidad (Kirk y Othmer, 1984).

Una principal característica de la investigación de antibióticos naturales es la producción de antibióticos semisintéticos en los cuales un producto microbiano es modificado químicamente para dar lugar a un antibiótico final. Pocos antibióticos comerciales son producidos únicamente por síntesis química, un ejemplo es el chloramfenicol, debido a que su estructura química es relativamente simple (Rose, 1979).

2.5. Penicilina.

La penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en 1929. Fue utilizado por primera vez, como droga para el control de infecciones durante la Segunda Guerra Mundial, donde se realizó un intento inmediato por producir este antibiótico a gran escala. Resultados de muchas investigaciones realizadas en ambos lados del Atlántico estuvieron en secreto hasta después de la guerra, cuando la relación cronológica y los detalles de los estudios químicos fueron publicados en 1949 (Kirk y Othmer, 1984).

Aún en nuestros días, el interés central para la industria es conferido a las técnicas de selección especial para la obtención de cepas superproductoras. Una compañía, Panlabs Inc. en 1973, empleando técnicas especiales de selección empezó ofreciendo cepas de *Penicillium chrysogenum* a clientes productores de penicilina. Estas cepas productoras de penicilina G y V fueron llamadas P-1 y P-2 y fueron derivadas de las últimas cepas de la serie Wisconsin. Cada una ha sido desarrollada independientemente por compañías comerciales. La genealogía de cepas de *P. chrysogenum*, desarrolladas principalmente en la Universidad de Wisconsin ha sido descrita por Elander (1979). La manipulación genética de cepas ha consistido principalmente en el uso de agentes físicos causantes de mutaciones, como rayos UV, rayos X, bombardeo de neutrones y calor; así como agentes químicos, como nitrógeno mostaza y *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (Rose, 1979).

Las diversas penicilinas poseen esta estructura pero varían en el radical (R) de la cadena lateral. Solamente dos penicilinas biosintetizadas se han considerado importantes terapéuticamente, la penicilina G y la penicilina V, las cuales tienen como radical respectivamente (Queener y Swartz, 1979; Arnaud y Guirard, 1985).



Las penicilinas inhiben la síntesis de la pared bacteriana, inactivando las enzimas cuya función es entrecruzar las hebras del péptido glucano de la pared, lo que da lugar a una estructura sensible a los cambios osmóticos. Actúan sobre las bacterias grampositivas (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, etc.) y algunas bacterias gramnegativas (*Neisseria*) y sobre *Treponema*, agente de la sífilis. La mayor parte de las penicilinas pueden ser descompuestas por diversos microorganismos (*E. coli*, *Bacillus*) dotados de una β -lactamasa que cataliza la hidrólisis del grupo amino del anillo β -lactámico para dar lugar al ácido peniciloico inactivo. Diversos ácidos sirven como precursores de la cadena lateral, de la cual depende la actividad biológica y su sensibilidad a la acción de β -lactamasas (Sánchez, *et al.*, 1984; Arnaud y Guirard, 1985).

Entre las propiedades y especificaciones principales se incluyen, su punto de fusión (209-210 °C), es un polvo blanco que debe ser perfectamente estéril y es soluble en soluciones salinas. Su potencia se mide en los términos de Unidades Internacionales (U.I.), y para efectos de venta se utilizan las siglas BOU, (Billion of Units). Un mg. de penicilina G sódica equivale a 1595 U.I. (The Merck Index, 1989).

2.5.2 Biosíntesis.

La penicilina es sintetizada a través de una serie de pasos metabólicos que se inician con el ácido α -aminoadipídico, compuesto que a su vez es precursor de la vía de biosíntesis de la *L*-lisina. El primer paso en la biosíntesis de la penicilina es el catalizado por la enzima δ (*L*-aminoadipil)-*L*-cisteína sintetasa, que lleva a cabo la unión de α -aminoadipídico con el aminoácido *L*-cisteína, para formar el primer intermediario de la vía. Este intermediario se condensa con el aminoácido *L*-valina, para dar origen al tripéptido α -aminoadipil-cisteinil-valina. Este tripéptido se encuentra estructurado, según Andriens, *et al.* (1975), como *L*- α -aminoadipil-*L*-cisteinil-*D*-valina, arreglo molecular que coincide con el descrito para el mismo intermediario en la síntesis del antibiótico cefalosporina por *Cephalosporium acremonium*. Aún no está definido si el aminoácido valina se incorpora en su forma *D*, o bien si lo hace como *L*-valina que después es isomerizada. Los eventos finales en la biosíntesis del antibiótico implican la formación de los anillos β -lactámico y tiazolidínico. Recientemente se ha establecido, que el tripéptido es convertido en isopenicilina N a través de un intermediario β -lactámico monocíclico. La isopenicilina N es un compuesto inestable con actividad antibiótica que posee α -aminoadipídico en su cadena lateral. Dicho intermediario, debido a la acción de una acil transferasa, intercambia el α -aminoadipato en su cadena lateral por ácido fenilacético y da origen a la penicilina G o bencil-penicilina, producto final de la vía (Figura 2)(Sánchez, *et al.*, 1984).

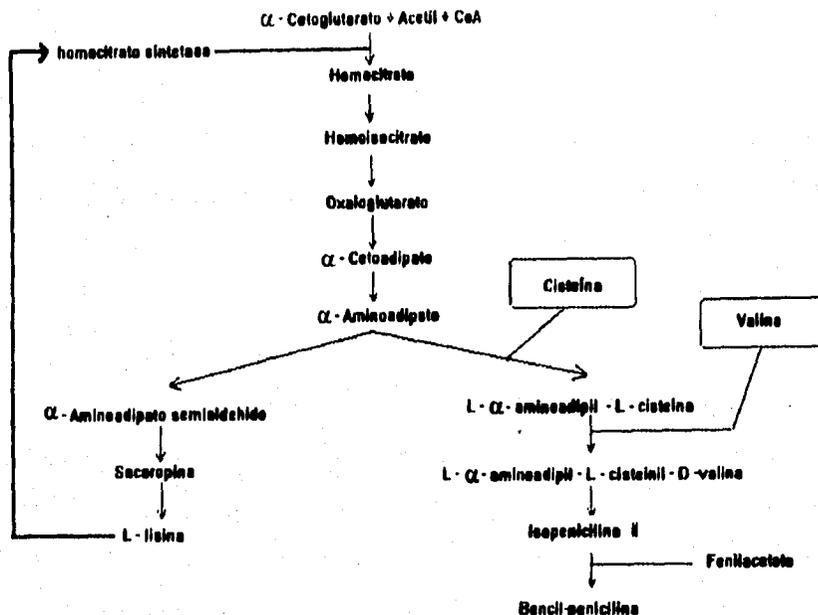


Figura 2. Intermediarios metabólicos de la vía de biosíntesis de L-lisina y de la penicilina G. Regulación por L-lisina (—)

2.5.3. Mecanismos de Regulación en la Biosíntesis de Penicilina.

a) Control en la iniciación de la síntesis de penicilina.

Dentro de los genes que contienen la información para la síntesis de antibióticos hay: cromosomales y extracromosomales. Frecuentemente, los genes estructurales son los cromosomales, mientras que los genes reguladores que controlan la expresión de la información genética, se encuentran en los plásmidos extracromosomales (Hopwood, 1978). Esta expresión del código genético, usualmente ocurre a una tasa de crecimiento baja, lo cual sugiere que durante el crecimiento rápido, la síntesis no se realiza y si se realiza, su actividad es inhibida (Martin y Demain, 1980). A nivel de iniciación, esta síntesis es controlada por inhibición al inicio de la ruta biosintética, la cual, es compartida, por un lado, para la síntesis de un metabolito primario y por otra, para la síntesis de un metabolito

secundario. Esta inhibición ocurre por retroalimentación del producto primario final. En particular, en la biosíntesis de penicilina, este metabolito primario lo constituye la *L*-lisina, que actúa sobre la homocitrato-sintetasa, la primer enzima de la ruta (ver Figura 2) (Luengo, *et al.*, 1980).

b) Efectores intracelulares y mecanismos que controlan al inicio de la síntesis de penicilina.

Varios mecanismos parecen estar involucrados en el control de la síntesis de los antibióticos. En un modelo, una pequeña molécula actúa como corepresor o inhibidor, reprimiendo la formación o inhibiendo la acción de la antibiótico sintetasa. Lo que significa, que el corepresor o inhibidor debe agotarse antes de que la síntesis ocurra (Martin y Demain, 1980). Este modelo ajusta algunos de los datos experimentales para la regulación de la biosíntesis de penicilina, los cuales se incluyen:

- i) **Regulación por carbono.** La *D*-glucosa reprime a la *L*- α -aminoadipil-*L*-cisteinil-*D*-valina sintetasa en la formación del tripéptido en la biosíntesis de penicilina, impidiendo así, la incorporación de la valina (Revilla, *et al.*, 1984).
- ii) **Regulación por nitrógeno.** El ión amonio, constituye un efector negativo para las enzimas responsables de la síntesis de glutamina, la cual da lugar a la formación de los aminoácidos precursores de la penicilina, como donador de grupos α -amino (Sánchez, *et al.*, 1980).

En un segundo modelo de regulación, un inductor o activador debe ser sintetizado en el cultivo fermentativo o adicionado al cultivo de acuerdo a la etapa de biosíntesis (Martin y Demain, 1980). Datos experimentales que se ajustan a este segundo modelo en cuanto a la producción de penicilina, es la inducción por *L*-glutamato. Este aminoácido estimula la formación de penicilina a través de inducir el aumento en la concentración de δ (*L*-aminoadipil)-*L*-cisteina sintetasa (Lara, *et al.*, 1982).

e) Etapas Finales de la biosíntesis de penicilina.

La duración de la producción de antibiótico difiere en cuanto a las cepas productoras que son genéticamente distintas y también dependiendo de las condiciones ambientales. En algunos cultivos para la producción de antibióticos, la fase activa de síntesis es más bien corta, de 4 a 20 horas. Sin embargo, en actinomicetos y hongos productores de antibióticos, la idiofase es más larga que la trofofase y puede ser prolongada por lote alimentado (Martin y Demain, 1980). En cuanto al cese en la producción de penicilina, éste está dado por la retroregulación por producto. Es decir, la acumulación de penicilina que ocurre tardíamente en la fermentación, inhibe la nueva producción del antibiótico. Así mismo, la penicilina exógena limita su subsecuente acumulación, siendo necesario que el nivel de penicilina para inhibir la síntesis de una cepa particular sea similar al nivel de producción de la cepa. En este caso, es posible que se este inhibiendo alguna enzima como la aciltransferasa (Gordec y Day, 1972).

2.6. Fermentación Sólida.

La fermentación en sustratos sólidos (FS) es generalmente definida como el crecimiento de microorganismos sobre materiales sólidos en ausencia de agua libre. El sustrato, sin embargo, debe contener suficiente humedad, la cual existe en estado de absorción dentro de la matriz sólida (Pandey, 1992). Así, los sustratos pueden ser vistos como una mezcla de gas-líquido-sólido en la cual la fase acuosa está íntimamente asociada con la superficie sólida en varios estados de sorción y está en contacto con la fase gaseosa continuamente. La interface gas-líquido provee una zona de intercambio oxígeno-dióxido de carbono y de transferencia de calor. En tanto que la fase sólida (excepto cuando el soporte es inerte) provee un rico y complejo recurso de nutrientes que puede ser completo e incompleto según los requerimientos del cultivo (Mudgett, 1986). En relación a esta fase sólida y de acuerdo

a la localización del sustrato en el soporte, Ralph en 1976, ha considerado dos tipos de fermentación sólida, en donde:

- i) el material sólido sirve como el principal recurso de nutrientes para el microorganismo que está íntimamente asociado con la superficie de intersticios del material.
- ii) el soporte sólido es nutricionalmente inerte, por lo cual provee algunas ventajas al microorganismo con respecto al acceso de nutrientes.

Sin embargo, según Ralph (1976), estas dos categorías generalmente no son bien definidas en la práctica ya que la mayoría de los materiales sólidos involucrados en interacciones con microorganismos son una mezcla compleja de componentes inertes y nutricionales y en consecuencia, sus funciones son traslapadas (Aidoo, *et al.*, 1982).

En cuanto a la dinámica del proceso, la FS posee siempre una distribución heterogénea tanto de sustratos como productos dentro de la masa sólida, que son acompañados por grandes variaciones en temperatura, pH y oxígeno disuelto (Viniestra-González, 1993). Cambios físico-químicos como el hinchamiento del sustrato, la adhesión microbiana a sustratos, el crecimiento microbiano y digestión y/o fermentación del sustrato también preceden o acompañan el desarrollo de la FS. Parámetros específicos que describen a la FS como son: la textura y composición del sustrato, la concentración de biomasa microbiana y cantidad de producto metabólico afectan también el desarrollo del proceso. Por ejemplo, la relación entre el contenido de humedad inicial y la capacidad de retención de agua es afectada por la textura del sustrato y del grado de anaerobiosis dentro de éste. Así mismo, la transferencia de calor y masa dentro del sistema son grandemente afectados durante el proceso, debido a estos parámetros descriptivos de la FS. En lo futuro, la importancia en el progreso de los

métodos analíticos en el monitoreo de los procesos principalmente, estará aunada a mejorar la utilización de la FS (Wang, 1993).

2.6.1. Microorganismos utilizados en FS.

Recientemente, Pandey (1992), considero a varios grupos de microorganismos que pueden crecer sobre sustratos sólidos. Sin embargo, de estos grupos microbianos (que incluyen diversos hongos y bacterias), los hongos filamentosos son los que tienen la mejor capacidad para crecer en ausencia de agua libre. En la práctica, los tipos de microorganismos que pueden crecer en sistemas de FS, son determinados por el factor de actividad de agua (a_w). La actividad de agua es definida como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el sustrato y nos expresa en este caso, el requerimiento de agua para la actividad microbiana. El agua pura tiene $a_w=1$, y con la adición de solutos este valor decrece. En este sentido, los microorganismos que pueden crecer y son capaces de llevar a cabo sus actividades metabólicas a bajos valores de a_w son adecuados para los procesos de FS. A diferencia de las bacterias que crecen principalmente a valores de a_w cercanos a uno, los hongos filamentosos y algunas levaduras (que viven en sustratos sólidos naturales como pedazos de madera, hojas, raíces, etc.) pueden crecer a valores de actividad de agua menores, entre 0.6 y 0.7. Comúnmente las tres clases de hongos filamentosos que son utilizados en FS son: Phicomycetes (*Mucor* y *Rhizopus*), Ascomycetes (*Aspergillus* y *Penicillium*) y Basidiomicetes (*Polyporus*).

De acuerdo a los microorganismos utilizados, los procesos de FS pueden ser clasificados en dos grupos principales: FS natural, como el ensilaje y el composteo que utilizan microflora natural y FS de cultivo puro, los cuales son generalmente utilizados en la industria para mejorar el control en la utilización del sustrato y la formación del producto final (Pandey, 1992).

2.6.2. Substratos utilizados en FS.

En cuanto a los substratos que se utilizan para procesos de FS éstos pueden ser naturales o sintéticos. La mayoría de los substratos naturales (utilizados en ocasiones como fuente de carbono) están constituidos por materiales orgánicos de estructura polimérica, como polisacáridos, proteínas y ligninas. El substrato sólido debe estar en tal forma que permita la libre circulación del aire y en consecuencia, la cantidad de agua debe mantenerse en un nivel relativamente bajo (Hesseltine, 1972). El crecimiento sobre estos substratos puede ser sobre la superficie como lo hacen las bacterias y levaduras o bien, penetrando dentro de las partículas del substrato como lo hacen las hifas de hongos filamentosos.

2.6.3. Diferencias entre la FS y la FL.

Actualmente, las fermentaciones industriales para la producción de biomasa, enzimas y metabolitos, utilizan cultivos líquidos sumergidos (FL). Este tipo de proceso fue desarrollado para disminuir el tiempo en la producción en el proceso de fermentación superficial (Viniestra-González, 1989). Procesos de control superior, el ambiente homogéneo de producción en bioreactores, fácil operación para esterilizar a gran escala y menos requerimientos de manejo fueron las fuerzas impulsoras para proponer los cultivos sumergidos. Sin embargo, la producción comercial de tales productos, primeramente, dependieron de la fermentación sólida, tecnología desarrollada en China y Japón (Chisti, 1993).

Recientemente se ha manifestado que las respuestas bioquímicas y fisiológicas de ciertos microorganismos en FS además de diferir grandemente de aquellas en FL, pueden permitir una reducción en o total pérdida de productividad del metabolito o enzima deseada. Con este conocimiento, combinado con los notables avances en la tecnología de la fermentación sólida, éste método alternativo esta nuevamente ganando terreno (Chisti, 1993).

De acuerdo con Viniegra-González (1989) las diferencias entre la FS y la FL serán vistas a continuación, de acuerdo a las desventajas que presenta la FL y las ventajas de carácter aún teóricas de la FS.

2.6.3.1. Desventajas de la FL:

- El medio de FL esta constituido principalmente por agua (90/95%), en la cual se encuentran los productos microbianos en concentraciones menores de 50 g/l (5%).
- El tratamiento de agua residual es tan costosa como la planta de fermentación misma.
- Para evitar la contaminación por bacterias y levaduras se requieren costosas técnicas de esterilización del equipo, del aire y del medio de cultivo. La contaminación por estos microorganismos ocurre fácilmente en cultivos de hongos productores de metabolitos de interés, que crecen lentamente en medios enriquecidos.
- Las concentraciones del producto y de los precursores son tan bajas, que los procesos de recuperación repercuten negativamente en la economía de todo el proceso.
- La solubilidad del oxígeno en el agua es muy baja, por lo que se hace necesario utilizar maquinaria compleja y costosa para los procesos de agitación y aireación forzada con un elevado costo de energía.

2.6.3.2. Ventajas de la FS:

- El medio de FS usualmente contiene menor cantidad de agua (60-80%) que la FL.
- Una gran fracción de agua residual puede ser evaporada en rotavapor, produciendo volúmenes menores para las plantas de tratamiento de desecho.

- La actividad de agua menor en la FS le proporciona ventajas ecológicas en el crecimiento lento de los hongos sobre el de bacterias y levaduras, reduciéndose así las operaciones de esterilización.
- Los hongos pueden utilizar y transformar azúcares impregnados en materiales sólidos, de concentraciones muy bajas a mayores de 50 g/l (más de 400 g/l según Oriol, 1988b) y pueden producir elevadas concentraciones de productos importantes, tales como ácido giberélico (Kumar y Lonsane, 1987), penicilina (Barrios-González, 1988a), pectinasas (Trejo, 1986). Por ello, los costos de recuperación se reducen.
- El oxígeno no es un factor limitante, debido a que se solubiliza fácilmente en el aire, el cual a su vez, es el fluido en la FS. Por lo tanto, la FS tiene menores costos de energía que la FL (Viniestra-González, 1989)

2.6.3.3. Limitantes de la FS:

- Los microorganismos aeróbicos están limitados a crecer como películas delgadas en la superficie aérea dejando aire intersticial y volumen intraparticular sin utilizar (Raimbault, 1980). Entonces, la concentración microbiana es de un nivel similar a la de la FL (cuyo ciclo de vida es más corto). Además, los cultivos en lote, que es como generalmente se realiza en FS, son menos productivos que los cultivos continuos utilizados en la FL.
- El control del proceso se dificulta en una FS debido a la calidad heterogénea del medio de fermentación, y a la ausencia o lenta agitación.
- La recuperación del producto puede ser difícil si el producto es absorbido o contaminado por residuos sólidos.
- Se tiene poca experiencia en la producción de metabolitos elaborados en FS a gran escala. Pocas compañías, como lo son las industrias de alimentos fermentados de Japón, conocen la construcción y operación de una planta de FS. (Viniestra-González, 1989).

III. ANTECEDENTES

En términos generales la fermentación sólida (FS) se distingue de los cultivos sumergidos, en que el crecimiento microbiano y la formación de productos ocurren en o cerca de la superficie de materiales sólidos con bajo contenido de agua. El contenido máximo de agua está determinado por la capacidad de retención de agua de la fase sólida y a su vez la disponibilidad de los nutrientes depende principalmente de su difusión a través del medio líquido. Por lo anterior, es necesario considerar que el sistema de FS está conformado por tres constituyentes básicos: el soporte, los nutrientes y el agua.

Hasta el momento los trabajos sobre crecimiento y/o producción en FS han contemplado de manera independiente el efecto de sólo un parámetro, ya sea humedad o concentración (Nishio *et al.*, 1979; Rimbault y Alazard, 1980; Oriol *et al.*, 1988a; Barrios, *et al.*, 1988a). Sin embargo, para alcanzar un determinado valor, de humedad, por ejemplo, puede hacerse con más de una combinación diferente entre los tres constituyentes, por lo que en realidad cada una de ellas representa diferentes condiciones de cultivo. Esto significa que los tres constituyentes que interactúan entre sí en tales combinaciones, pueden ejercer efectos indirectos y distintos sobre el desarrollo del microorganismo. Con relación en esto, se propuso que la producción obtenida en FS debe depender de la combinación de éstos que conforman el medio sólido. En el presente trabajo, se determinó bajo diferentes combinaciones el efecto de estos constituyentes de la FS sobre la producción de penicilina y el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* (cepa P-2, clon 4).

De acuerdo a nuestro sistema de estudio, hemos considerado previos trabajos realizados por Oriol *et al.* (1988a), y Barrios *et al.* (1988a), debido a que los sistemas de fermentación sólida que han utilizado, están basados en la producción de metabolitos secundarios y el uso de materiales sólidos inertes impregnados con soluciones nutritivas. Las principales aportaciones de estos estudios se refieren en general, al efecto independiente ya sea del

contenido de agua inicial, de la actividad de agua (a_w) y/o de la concentración de los nutrientes en este tipo de cultivos.

Los resultados de Oriol *et al.* (1988a), han indicado que la humedad inicial (entre 40 y 75 %) no tiene un efecto importante sobre la fase de crecimiento en *Aspergillus niger*, contrario al efecto producido por la baja actividad de agua (tonicidad) de la fase líquida, la cual incrementa drásticamente el tiempo de germinación y la tasa de crecimiento. Estos resultados, por lo tanto, demuestran que la actividad de agua controla el crecimiento, al menos en este tipo de sistema.

Por otro lado, en el trabajo de Barrios, *et al.* (1988a), los resultados indicaron que la humedad inicial tampoco afecta la fase de crecimiento de *Penicillium chrysogenum* (Wisconsin 54-1255), pero sí tiene una importante influencia sobre el nivel de producción de penicilina. Para estudiar este efecto, los autores modificaron la humedad (entre 60 y 78%) manteniendo la actividad de agua constante, de manera análoga a lo realizado por Oriol, *et al.* (1988a). Humedades iniciales entre 70 y 73% presentaron una alta tasa de producción de penicilina en la parte final del cultivo, alcanzando una producción de 800 U/ml (1, 120 $\mu\text{g/gms}$), a diferencia de los cultivos con humedades mayores y menores, en donde las producciones alcanzadas fueron del orden de 200 U/ml (280 $\mu\text{g/gms}$). Además, en este mismo trabajo se realizaron experimentos en donde se incrementó la concentración de nutrientes (disminuyendo a_w) manteniendo constante la humedad en 70%, a costa de disminuir la cantidad de bagacillo. Se encontró que la diferencia de la trofofase, el uso de medios más concentrados (2x) favorece la producción de penicilina en FS. En este caso los autores utilizaron el medio reportado por Sylvester and Coghill (1954).

Estos últimos resultados son confirmados en el presente estudio utilizando otro medio y otra cepa, mas se amplía el horizonte en este campo ya que se encontró que las conclusiones arriba mencionadas son casos de un fenómeno más general.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

- **Determinar bajo diferentes combinaciones de cultivo, el efecto de los constituyentes del medio de fermentación sólida (soporte/nutrientes/agua) sobre la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum*.**

4.2. Objetivos Particulares.

- **Establecer las cantidades máximas y mínimas de cada uno de los constituyentes del medio de fermentación sólida, en las diferentes combinaciones de acuerdo a las limitaciones propias del sistema**
- **Determinar el efecto de la concentración de nutrientes (manteniendo la relación soporte/agua constante) sobre la producción de penicilina y crecimiento de *Penicillium chrysogenum*.**
- **Determinar el efecto de la humedad (manteniendo la relación soporte/nutrientes constante) sobre la producción de penicilina y crecimiento de *Penicillium chrysogenum*.**
- **Determinar el efecto del contenido de soporte (manteniendo la relación nutrientes/agua constante) sobre la producción de penicilina y crecimiento de *Penicillium chrysogenum*.**
- **Comparar cinéticas de esporulación, pH, humedad, consumo de azúcares reductores y respiración sobre el crecimiento y la producción de penicilina, de todas las interacciones estudiadas.**

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos.

Para la producción de penicilina G se utilizó la cepa P-2-4 de *Penicillium chrysogenum*, mutante derivada de la cepa P-2 (ATCC 48271). Esta mutante, P-2-4, se caracteriza por ser sobreproductora de penicilina G en FS (Barrios-González, et al. 1993a).

Para la realización de los bioensayos de actividad antibiótica se utilizó *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), que se mantuvo en medio de esporulación a 4°C.

5.2. Medios de Cultivo.

5.2.1. Medio para Bioensayos.

Agar de Soya y Tripticaseína (TSA) (g/l)

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

5.2.2. Medios de Esporulación.

Medio de esporulación para *Bacillus subtilis* (g/l).

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

Medio power de esporulación para *Penicillium chrysogenum* (g/l)

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

**Medio power de producción para esporulación y producción utilizado
en la elaboración de cilindros de agar para *Penicillium chrysogenum* (g/l).**

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

5.2.3. Medio para Fermentación Sólida.

Medio Complejo de Fermentación Sólida (Somerson modificado) (g/l)

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

Este medio complejo fue una modificación del reportado por Somerson *et al.*, 1961 usado en fermentación líquida. Tales modificaciones son: la adición de otra fuente de carbono como es la glucosa (1.4%) y el uso de una menor concentración de ácido fenilacético (7.4mM). En adelante, los ingredientes de este medio serán considerados como los nutrientes del medio de fermentación sólida.

5.3. Reactivos.

5.3.1. Buffer de Fosfatos para Extracción de Penicilina.

Para la extracción de penicilina se preparó un amortiguador de sales de fosfato 0.1mM en agua destilada y se ajustó a un pH de 5.5.

5.3.2. Reactivo DNS para la Determinación Azúcares Reductores.

Se pesaron 7.5g de ácido 2,4-dinitro salicílico, 14 g de NaOH, 216 g de Tartrato doble de sodio y potasio, 5.6 g de fenol y 5.9 g de metabisulfito de sodio y se disolvieron en este orden en agua destilada (Miller, 1959).

5.4. Conservación de la Cepa.

Siendo necesaria la conservación de las características generales de *Penicillium chrysogenum* cepa P-2 ATCC 48271 clon 4, por su alta producción de penicilina en FS, se aplicaron dos métodos para su conservación: a) liofilización, para conservación a largo plazo y b) congelación, para conservación a mediano plazo (-20°C y -80°C con glicerol al 25%). Una suspensión de esporas congelada proveniente del mismo stock original, fue utilizada para cada experimento.

5.5. Fermentación Sólida.

El medio de fermentación sólida esta constituido por tres componentes básicos: soporte (en este caso, bagacillo de caña), nutrientes y agua. Dichos constituyentes fueron probados bajo diferentes combinaciones, para lo cual se realizaron tres series de experimentos que son mostrados en la Tabla 1. Los valores de esta tabla se obtuvieron a partir de la deducción de ecuaciones para cada serie experimental y considerando los valores de las condiciones estándar. Por ejemplo, para la primer serie, en donde la relación bagacillo/agua se mantuvo constante, fueron consideradas las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1	$b/a=0.2$ (constante) →	$b=a(0.2)$
Ecuación 2	$b+a=84.085$	
Sustituyendo 1 en 2	$a(0.2)+a=84.085$	→ $a(0.2+1)=84.085$
		→ $a=84.085/1.2$
y para calcular los nutrientes		$n=100-(a+b)$

en donde, bagacillo de caña ($b=14.085\%$), nutrientes ($n=15.911\%$) y agua ($a=70\%$), para las condiciones estándar

En cada serie experimental se mantuvo constante la relación de dos de los componentes del medio sólido, mientras que la cantidad del tercer componente fué disminuído o aumentado con respecto a las condiciones estándar y según las limitaciones físicas y fisiológicas del sistema. Estas limitaciones han sido a su vez consideradas como parte de los resultados de este trabajo (ver en resultados). Cada uno de los constituyentes de las diferentes condiciones de cultivo están dadas en porcentaje.

	% b	% a	% n	[x]	pH en líquido	pH en sólido
Serie 1	12,49	62,06	25,46	3,20	6,75	6,49
	13,02	64,71	22,28	2,80	6,70	6,44
b/a=0.212 *	14,09	70,00	15,91	2,00	6,80	6,45
	15,42	76,63	7,96	1,00	6,55	6,45
	16,084	79,939	3,98	0,50	6,80	6,52
Serie 2	19,68	58,08	22,24	2,79	7,27	6,39
	17,82	62,06	20,13	2,53	7,18	6,51
b/n=0.885	16,58	64,71	18,72	2,35	7,12	6,53
*	14,09	70,00	15,91	2,00	6,81	6,56
	10,98	76,63	12,34	1,56	7,09	6,56
Serie 3	23,91	62,00	14,09	1,77	6,8	6,44
	18,75	66,20	15,05	1,89	6,8	6,44
n/a=0.23 *	14,09	70,00	15,91	2,00	6,8	6,45
	10,35	73,05	16,60	2,09	6,8	6,50

Tabla 1. Diferentes condiciones de cultivo para el sistema de Fermentación Sólida cuyos constituyentes son: bagacillo de caña (b), nutrientes (medio Somerson modificado) (n) y agua (a). Condiciones estándar (*) en cada serie. En la sección 5.5.1. se hace referencia a los valores de pH mostrados en las últimas dos columnas.

5.5.1. Pruebas de pH.

En la elaboración del medio complejo, el cual contiene los nutrientes se realizaron pruebas para determinar el pH del medio líquido que diera un pH de 6.5 en el medio sólido. Estos valores de pH son mostrados en la Tabla 1. Para realizar estas pruebas todas las diferentes condiciones de cultivo fueron preparadas para medio de fermentación sólida (ver sección 5.6.4) y calculadas para una columna de fermentación.

5.5.2. Producción de esporas para la obtención del inóculo.

Para la realización de cada una de las series, se prepararon 3 matraces con 40 ml de medio Power (Luengo, *et al.*, 1980), se esterilizó e inculó cada uno con 0.3 ml de una de las suspensiones congeladas de la cepa P-2 ATCC 48271 clon 4 de *Penicillium chrysogenum* con concentración 1.75×10^7 esporas/ml. Después de homogeneizar el inóculo en el medio, se incubó a 25°C durante aproximadamente 7 días hasta su esporulación, la suspensión de esporas se obtuvo por agitación magnética y adición de tween al 0.05%. La cuenta de esporas se hizo en cámara de Neubauer. El inóculo se calculó en relación a 2×10^6 esporas/ml, que en las condiciones estándar (con 70% de humedad) corresponde a 1.4×10^6 esporas / 0.7ml / 0.3 gramo de sólidos / gramo húmedo de medio de fermentación sólida.

5.5.3. Pretratamiento del soporte.

Se utilizó como material de soporte bagacillo de caña de azúcar (proveniente del Ingenio azucarero de Zacatepec, Morelos, México). Este bagacillo fue tamizado en mallas del número 30 y 50, utilizándose únicamente las partículas retenidas entre estas dos mallas (tamaño: 0.297 a 0.59 mm). Al bagacillo se le adicionó la mitad del agua total considerada para todo el medio de cultivo y ambos se mezclaron. El pretratamiento se llevo a cabo en una autoclave a 3 lb/in² de presión durante 30 min. y después se procedió a esterilizar

normalmente a 15 lb/in² durante 15 min. En este caso, la finalidad del pretratamiento es aumentar la capacidad de retención del medio líquido nutritivo.

5.5.4. Preparación del medio de fermentación sólida.

Se consideraron los cálculos para el porcentaje de humedad en cada caso particular (ver Tabla 1) y en función del número de columnas necesarias para la construcción de la cinética y sus respectivos duplicados en cada tiempo. Se calculó la distribución del agua en el ajuste de pH del medio, pretratamiento del bagacillo y el agua incluida en la suspensión de esporas y en la preparación del medio. Así mismo, en cada caso se calculó la distribución de los sólidos que incluyen: el bagacillo de caña y los sólidos del medio complejo de fermentación sólida según su concentración [X] (ver Tabla 1). Antes de esterilizar el medio para cada tratamiento, éste fué ajustado en función de las pruebas de pH realizadas.

En condiciones estériles, se mezcló el bagacillo de caña pretratado y el medio complejo previamente inoculado, obteniéndose así, el medio de fermentación sólida con un pH=6.5.

5.5.5. Condiciones del Cultivo.

La fermentación se llevó a cabo en columnas (Rimbault y Alazard 1980), que contenían 12 g de medio de fermentación sólida con una densidad de empaque de 0.23 g/ml. y fueron incubadas en baño de agua a 25°C, con una aireación húmeda de $0.2 \text{ l h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, en condiciones no asépticas. El inóculo fué de 1.4×10^6 esporas por gramo húmedo de medio de fermentación sólida.

5.5.6. Desarrollo de los Métodos Analíticos.

Cada tratamiento experimental se realizó por lo menos dos veces y el muestreo en cada experimento se hizo por duplicado de columnas cada 24h durante 6 días, además del tiempo

cero, realizándose en la forma reportada por Barrios, *et al.*, (1988a). La actividad de agua se determinó solamente en el tiempo inicial en cada tratamiento, mientras que en los siguientes días cada muestreo consistió primero en pesar todo el contenido de medio para cada columna y determinar: % humedad, pH, biomasa, producción de penicilina y consumo de azúcares reductores. Además se monitoreó la producción de dióxido de carbono y consumo de oxígeno de los microorganismos durante todo el cultivo.

5.5.6.1. Actividad de agua.

Se pesó 1.2g de medio de fermentación inicial en cajitas y se determinó su actividad de agua en función de la temperatura de la muestra en un aparato marca Decagon modelo CX1.

5.5.6.2. % Humedad.

La humedad se obtuvo por gravimetría para 4 gramos de muestra y se calculó en porcentaje.

5.5.6.3. pH.

En un vaso de precipitado se pesó un gramo de medio de fermentación y se le adicionó 10 ml de agua destilada; durante 10 minutos se mantuvo en agitación magnética y después se determinó el pH con un potenciómetro.

5.5.6.4. Biomasa.

La biomasa fué calculada por peso seco, considerando 4 gramos de muestra del cultivo en el sistema de FS.

5.5.6.5. Cuantificación de penicilina.

- i) En tubos para centrifugación se pesó 0.5 g de cada muestra y se adicionó 3 ml de buffer de fosfatos (0.1mM, pH 5.5) se agitó durante un minuto y se ajustó el pH a 5.0-5.15 con HCL determinando el volumen adicionado, para considerar la dilución final de la penicilina extraída. Se centrifugó a 1700 r.p.m (570 g) durante 20 minutos y el sobrenadante extraído se congeló a -20°C .
- ii) Al descongelar las muestras de toda la fermentación, se realizaron diluciones 1:20 y 1:40 para la cuantificación de penicilina por bioensayo. Esta técnica se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento, cuyo diámetro es proporcional al logaritmo de la concentración de penicilina.

Para la realización del bioensayo se obtuvo primeramente la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC-6633 inoculando por medio de 2 asadas (procedentes de una colonia aislada en agar nutritivo) el medio de esporulación para este propósito (ver medios de cultivo). La incubación se llevó a cabo durante 24 hrs en matraces conteniendo 125 ml de medio, a una temperatura de 30°C y a 200 r.p.m. A continuación se determinó la densidad óptica (DO) de la suspensión de esporas a 540 nm. El bioensayo se realizó en cajas de acrílico de 30x30 cm conteniendo 350 ml de agar de soya y tripticaseína (TSA) al 1% inoculados previamente con *B. subtilis* (0.2 ml de suspensión de esporas con una D.O. de 1 para 100 ml de medio TSA). Una vez solidificado el medio se hicieron pozos con un sacabocados (del No. 4) y se llenaron con 60 μl de muestra o solución patrón. Las placas se guardaron durante 30 min a 4°C para permitir la difusión del antibiótico y posteriormente se incubaron a 35°C durante 16 hrs para la formación de los halos de inhibición. El estándar utilizado fue una solución de sal potásica de penicilina G.

5.5.6.6. Cuantificación de Azúcares Reductores.

- i) De las muestras para medir pH (ver inciso c) se extrajo 1 ml de sobrenadante de cada una y se congelaron a -20°C .
- ii) Descongeladas todas las muestras de la fermentación, se realizaron diluciones de mayor a menor en función del tiempo y por la técnica del Acido Dinitro-salicílico (DNS) el cual se basa en la oxidación del grupo reductor del azúcar y en la reducción del DNS para la obtención de un producto colorido característico que se cuantificó por espectrofotometría a 575 nm. (Miller, 1959) y el cual determinó el contenido de azúcares reductores para cada tiempo del cultivo. Para la realización de la curva patrón se empleó glucosa.

5.5.6.7. Respirometría por Cromatografía de gases.

Durante el cultivo se cuantificó el consumo de O_2 y la producción de CO_2 en el aire, a la salida de la columna de fermentación de cada tratamiento, mediante un sistema de muestreo automático y computarizado, el cual utiliza un cromatógrafo de gases (GOW-MAC) con detector de conductividad térmica y columna CTRI (Altech). Los datos fueron capturados y procesados con el programa Máxima de Waters. Las muestras analizadas en el cromatógrafo fueron previamente secadas haciendo pasar el aire húmedo por columnas conteniendo sílica gel con indicador de humedad.

5.5.6.8. Cinética de Esporulación.

De las muestras secas para la determinación de humedad (inciso b) se pesó un gramo en un vaso de precipitado y se diluyó en agua destilada manteniéndose en agitación magnética durante 10 minutos. Diferentes diluciones fueron realizadas después de estimar visualmente la esporulación durante el tiempo del cultivo de los distintos tratamientos. El conteo de esporas se realizó en cámara de Neubauer.

VI. RESULTADOS

De acuerdo con el propósito de este trabajo fue necesario obtener diferentes combinaciones para determinar el efecto de los constituyentes de la FS sobre la producción de penicilina y el crecimiento de *Penicillium chrysogenum*, cepa P-2 clon 4. Para ello, se llevaron a cabo tres estrategias, dentro de las tres series experimentales, cuyos resultados serán vistos a continuación. Básicamente cada estrategia consistió en mantener constante la relación de dos de los constituyentes y variar la cantidad del tercero. De estas combinaciones resultantes se obtienen diferentes caminos para alcanzar un cierto valor de humedad, de concentración de nutrientes o de contenido de soporte. En tales combinaciones existen las diferentes condiciones de interacción para cada uno de ellos lo cual, se ha supuesto, da lugar a diferentes resultados.

Primeramente se tratarán como parte de los resultados las restricciones que en la práctica limitan las combinaciones de los constituyentes del medio de FS. Después, se mostrarán las cinéticas resultantes de cada serie experimental y por último éstos resultados serán integrados.

6.1. Determinación de las cantidades máximas y mínimas de cada uno de los constituyentes (bagacillo/nutrientes/agua) de la fermentación sólida en las diferentes combinaciones.

Las diferentes combinaciones de los tres constituyentes (bagacillo/nutrientes/agua) del medio de fermentación sólida incluidas en las tres series experimentales, estuvieron limitadas por restricciones fisiológicas y físicas características del sistema de FS. Así, en la primer serie en donde se mantuvo constante la relación bagacillo/agua=0.2 y se varió la cantidad de nutrientes, se consideró el hecho de que a muy bajas concentraciones de los nutrientes los

microorganismos no crecen o crecen muy poco, mientras que a concentraciones muy altas, la tonicidad no les permite crecer. De darse esta última condición la disminución de agua afectaría el acceso a los nutrientes y le restaría espacio al soporte (ver tabla 2). Con base en estas consideraciones, se escogieron arbitrariamente y en relación al control (de 2.0 veces la concentración original usada en fermentación líquida, o sea 2X), una concentración mínima de 0.5 y una concentración máxima de 3.2 veces la concentración original. Al igual que en las otras dos series, una vez realizados los cultivos el criterio para delimitar o mantener éstas concentraciones como mínima y como máxima estuvieron de acuerdo a la definición de las cinéticas, en especial la de producción de penicilina y la de producción de CO_2 (la cual estima el crecimiento) ya que era importante que mostraran claramente los diferentes efectos. Además se consideraron las inconveniencias tanto de disminuir aún más la concentración de 0.5, debido a que el crecimiento y la producción de penicilina fueron de por sí bajos, así como de aumentar aún más la concentración de 3.2, debido a que podría retardarse significativamente el crecimiento y por ende la producción de penicilina (ver mas adelante los resultados de ésta serie). Así mismo, en la segunda serie, en donde se mantuvo constante la relación bagacillo/nutrientes=0.88 y se varió la cantidad de agua las limitaciones se basaron en lo siguiente: a muy baja humedad los microorganismos no crecen, mientras que a humedades muy altas, la porosidad y la difusión del oxígeno en el medio de fermentación disminuyen y puede favorecer la contaminación (Raimbault, M. y Alazard, D., 1980). Además, una limitación física es que mucha agua no es retenida por el soporte. Por lo tanto, fue importante delimitar la relación bagacillo/agua, *i.e.* se probaron diferentes relaciones de bagacillo/agua en donde visualmente se determinó si el sistema de FS escurría o no escurría. La mínima relación bagacillo/agua bajo la cual el bagacillo soportó mayor cantidad de agua y no escurría fue de 0.14. Tomando en cuenta los cálculos para ésta serie (ver material y métodos) y la relación constante de bagacillo/nutrientes=0.88, la humedad máxima en este caso, fue de 73%. En tanto que la cantidad mínima de agua utilizada fue determinada al probar arbitrariamente una humedad de 58 % y se decidió no disminuir más

ésta humedad debido a que el crecimiento y la producción se verían aún más retardadas ante la baja disponibilidad de agua y bajo acceso a los nutrientes en las condiciones iniciales (ver resultados de la serie 2). Por último, en la tercer serie donde se mantuvo constante la relación nutriente/agua=0.23 y se varió la cantidad de bagacillo, se consideraron las limitaciones de acuerdo a que el agua no era retenida cuando disminuía la cantidad de soporte y si era mucho soporte, tanto los nutrientes como el agua disminuían proporcionalmente y creaban condiciones inadecuadas (baja disponibilidad de agua y bajo acceso a los nutrientes) para el crecimiento. De esta manera, la cantidad mínima de soporte se determinó con base a la relación bagacillo/agua igual a 0.14 y para determinar la cantidad máxima de soporte se probó arbitrariamente un porcentaje de 24% de bagacillo y se decidió no aumentar más debido a las consideraciones anteriores. Siempre se consideró que las cantidades de soporte respectivas en todas las combinaciones de la Tebla I (ver material y métodos, sección 5.5) estuvieran distribuidas homogéneamente en la columna, en un volumen de 44.46 cm^3 , para una densidad de empaque de 0.27 g de medio de fermentación sólida/ cm^3 . Aunque esta densidad de empaque siempre fue la misma para todas las condiciones de cultivo, la porosidad si debió ser distinta entre los tratamientos, especialmente aquellos de las series 2 y 3 en donde la relación bagacillo/agua fue dferente a 0.14. Este parámetro no fue estudiado en este trabajo.

De acuerdo con las limitaciones antes descritas para el sistema de FS, la producción de penicilina se estudio en el área delimitada por 10-24% de soporte, 58-80% de agua y 4-26% de nutrientes. Esta área se encuentra localizada al interior del triángulo de la Figura 17 (ver sección 6.5).

6.2. Efecto de la concentración del medio complejo de producción, manteniendo constante la relación bagacillo/agua (serie 1).

En esta serie experimental se mantuvo constante la relación de dos de los componentes básicos del medio de fermentación sólida: bagacillo y agua. Al respecto, se consideraron los valores correspondientes a las condiciones estándar fijadas en estudios precedentes (Barrios, *et. al.*, 1988a), *i.e.*, la concentración del medio Somerson modificado [2 x] (antes x, en fermentación líquida) que constituyen los nutrientes, representan el 15.91% del medio de fermentación sólida, la humedad el 70% y el bagacillo el 14.09%. En consecuencia, la relación bagacillo/agua se fijó en 0.201 (14.09g/70 ml), y lo que se modificó fue la concentración del medio complejo de producción en un rango de 0.5x - 3.2x (Tabla 2), de tal manera que al aumentar o disminuir la cantidad de nutrientes, las cantidades tanto de bagacillo como de agua (ambos en forma proporcional), disminuyen o aumentan respectivamente. En esta serie los tratamientos con concentraciones 0.5x y 1.0x son considerados como los tratamientos diluidos mientras que los que tienen concentraciones de 2.0x (tratamiento estándar), 2.8x y 3.2x se han considerado como los tratamientos concentrados. Los tratamientos diluidos fueron probados por lo menos dos veces, mientras que los tratamientos concentrados fue necesario probarlos en cuatro ocasiones. El número de repeticiones para cada tratamiento se determinó con base a la reproducibilidad de los resultados, y siempre fueron comparados en relación a las condiciones estándar. Esto mismo es aplicado para siguientes dos series. Todos los resultados presentados a continuación corresponden a un solo experimento que incluyó los cinco tratamientos de la serie pero se consideran algunos resultados parciales de otras repeticiones que corroboran o se diferencian de éstos resultados.

Al inicio de cada fermentación se determinó la actividad de agua (Tabla 2), y durante los cultivos se determinaron parámetros de: humedad, pH, biomasa, esporulación, consumo de

azúcares, producción de penicilina y respirometría. Las cinéticas de éstas fueron graficadas y son mostradas en las Figuras 3, 4 y 5.

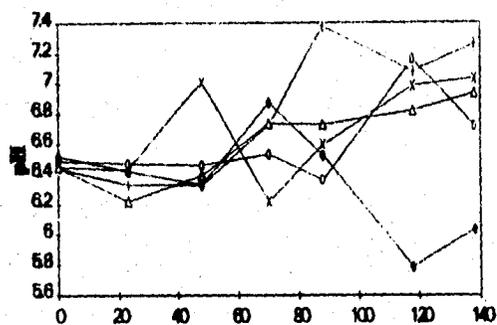
6.2.1. pH

De acuerdo a las pruebas descritas en la sección 5.5.1. (ver material y métodos), el pH inicial para los cinco tratamientos se obtuvo alrededor de 6.5. Durante el cultivo en todos los tratamientos éste pH marco la misma tendencia, ya que disminuyó ligeramente durante las primeras 48 horas y aumentó después progresivamente hasta un valor alrededor de 7.0 ± 0.2 (Figura 3a). El pH de las condiciones estándar bajó aparentemente en los dos últimos muestreos de éste experimento, sin embargo, esto no ocurrió en otras repeticiones.

6.2.2. Humedad

Hubieron pequeñas diferencias entre la humedad inicial teórica en algunos tratamientos con respecto a las obtenidas experimentalmente (ver Tablas 1 y 2). Sin embargo, estas diferencias no afectaron mucho la relación bagacillo/agua ya que se mantuvo cercana a 0.2 (Tabla 2). Durante todas las cinéticas, la humedad tendió a aumentar siempre en sus diferentes niveles pero bajo un mismo perfil con respecto a las demás (Figura 3b). El incremento de la humedad durante la fermentación es el resultado de la cantidad de agua metabólicamente producida en la bioconversión del sustrato (Rodríguez, J., *et al.*, 1986).

a)



b)

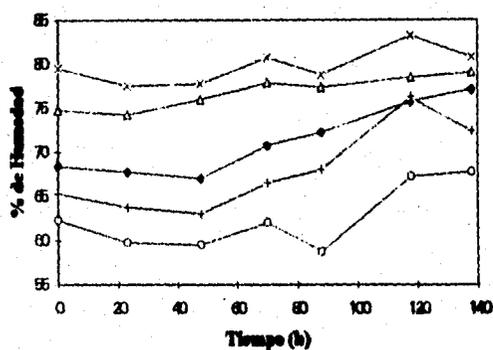


Figura 3. Efecto de la Concentración de Nutrientes: 3.2 (o), 2.8 (+), 2.0 (◊), 1.0 (Δ) y 0.5 (x) en las cinéticas de pH (a) y Humedad (b) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (bagacillo y agua) se mantuvieron en una relación constante (serie 1).

6.2.3. Consumo de azúcares reductores.

En cuanto al consumo de azúcares reductores (Figura 4a), es importante considerar desde este momento la estrecha relación que guarda con la biosíntesis de penicilina y el crecimiento. En general, en los tratamientos diluidos con concentración de 0.5x y 1.0x se observó que la velocidad de consumo de azúcares fué mayor en las primeras 23 horas y en

ocasiones extendiéndose hacia las 70h en comparación con los tratamientos más concentrados: 2.0X, 2.8X y 3.2X cuya velocidad de consumo siempre se intensificó claramente solo a partir de las 48 horas en los dos primeros y a las 70 horas en el más concentrado. Como era de esperarse, en los tratamientos que se consideran diluidos, los azúcares fueron casi completamente agotados a partir de las 70 horas, mientras que a este tiempo en los tratamientos concentrados esto no ocurrió sino hasta las 118-138h, en donde apenas comenzaron agotarse. De acuerdo a lo reportado por Barrios, *et. al.*, (1988a), las cinéticas de consumo de azúcares pueden mostrar ciertas etapas distintivas: a) incremento en la concentración de azúcares reductores; probablemente causado por la hidrólisis de sacarosa residual en el bagacillo; en este caso sólo se observó en algunos de los tratamientos concentrados; b) consumo rápido de azúcares, etapa relacionada con las primeras horas de cultivo de los tratamientos diluidos; c) consumo lento de azúcares que probablemente representa consumo de lactosa y se correlaciona con la fase de lenta producción de penicilina; en los tratamientos diluidos ésta etapa se distingue claramente, aunque el consumo de azúcares no fue siempre lento sino moderado d) consumo rápido o moderado de azúcares, en donde prácticamente se agotan y es correlacionado con una mayor velocidad de producción de penicilina; esta etapa puede ser vista en los tratamientos concentrados, en donde el consumo rápido de azúcares estuvo retrsado en comparación a los diluidos (etapa b) y relacionado además no solo con la rápida producción de penicilina sino incluso con el inicio de la producción, en cuanto a los tratamientos diluidos, es interesante notar que la mayor producción de penicilina se obtuvo cuando ya no había consumo de azúcares.

6.2.4. Producción de penicilina.

La producción de penicilina (Figura 4b) se hace presente en un nivel muy bajo a las 23h y 48h de muestreo en los tratamientos diluidos: 0.5X y 1.0X, siendo la velocidad de

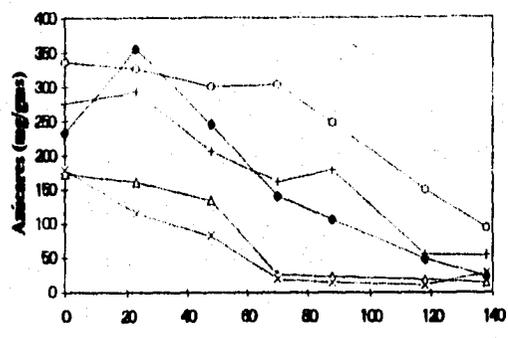
producción muy lenta, por lo menos hasta las 70 y 88 horas respectivamente, en donde aumentó la velocidad y se alcanzó la producción máxima a las 118 horas (Tabla 2).

En el tratamiento estándar (2x), la producción de penicilina (Fig. 4b) al igual que los tratamientos diluidos también se hizo presente desde las 23 horas en que se muestreo por primera vez después de haberse iniciado el cultivo, pero a diferencia de éstos, la velocidad de producción es rápida desde las 48h alcanzando su producción máxima a las 88h (Tabla 2).

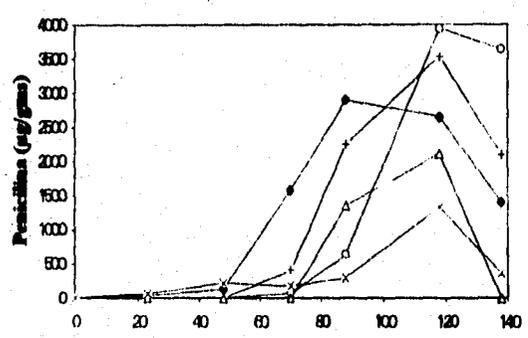
En cuanto a los tratamientos mas concentrados, que son 2.8x y 3.2x, la producción de penicilina (Fig. 4b) inicia tardíamente, hacia las 70 y 88 horas respectivamente, pero su nivel y velocidad de producción fue mayor que en los tratamientos anteriores. La producción de penicilina máxima se obtuvo al igual que en los tratamientos diluidos a las 118h pero evidentemente a un nivel superior (Tabla 2).

En la Tabla 2 se muestran las producciones máximas y los tiempos de producción máxima de los cinco diferentes tratamientos de cultivo para esta serie, así como sus productividades (producción máxima/tiempo). Sin embargo, en cuanto a los tiempos de máxima producción es preciso considerar que en otras repeticiones de los mismos tratamientos la tendencia en los medios mas diluidos fue la reducción en el tiempo para alcanzar la máxima producción; y por supuesto sus productividades siempre fueron las mas bajas en comparación a los tratamientos concentrados.

a)



b)



c)

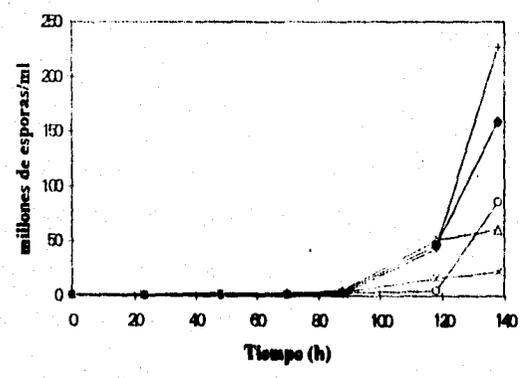


Figura 4. Efecto de la Concentración de Nutrientes: 3.2 (o), 2.8 (+), 2.0 (●), 1.0 (Δ) y 0.5 (x) en el Consumo de azúcares (a), Producción de Penicilina (b) y Esporulación (c) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (bagacillo y agua) se mantuvieron en una relación constante (serie I).

6.2.5. Esporulaci3n.

Al relacionar la diferenciaci3n celular con la producci3n de penicilina se observa que la esporulaci3n comienza cuando la producci3n alcanza el m3ximo. De acuerdo con esto, la esporulaci3n vista en forma cuantitativa (Fig. 4c), as3 como cualitativamente tambi3n inici3 tempranamente en los tratamientos diluidos y durante la fase de producci3n alcanz3 su mayor n3mero de esporas aunque bastante disminuido en comparaci3n a los tratamientos concentrados, en los cuales a p3sar de que la esporulaci3n inici3 tardamente (como la producci3n de penicilina) el n3mero de esporas alcanzado es mucho mayor (en especial en el tratamiento est3ndar y en el tratamiento con concentraci3n de 2.8x.), esto 3ltimo por supuesto tiene mucho mas que ver con el crecimiento alcanzado.

6.2.6. Respiraci3n.

La producci3n de CO₂ fue obtenida inicialmente en porcentaje y posteriormente calculada como dCO_2/dt por gramo de materia seca. Esta derivada ha sido graficada contra el tiempo de cultivo (Fig. 5b) mostr3ndo as3 los cambios de velocidad en la producci3n de CO₂. En general, 3sta cin3tica nos habla de la actividad metab3lica del cultivo. Las cin3ticas de porcentaje de ox3geno (Fig. 5a) complementan y precisan la informaci3n dada en las cin3ticas de CO₂.

En los tratamientos diluidos: 0.5x y 1.0x la producci3n de CO₂ aumenta en el intervalo de 24-48h aproximadamente, observ3ndose dos diferentes picos correspondientes a cada uno de 3stos tratamientos. Estos primeros picos nos indican muy probablemente la actividad del metabolismo primario. Para la concentraci3n 0.5x este primer pico de producci3n de CO₂ va descendiendo progresivamente en el resto de la cin3tica, mientras que para la concentraci3n 1.0x despu3s del descenso del primer pico vuelve aumentar en dos ocasiones mas, uno alrededor de las 70h y otro alrededor de las 90h, la correlaci3n aparente de estos 3ltimos picos se halla en el aumento de producci3n de penicilina, lo cual no ocurre para

0.5x, cuya producción de penicilina se mantiene baja en relación a las otras condiciones de cultivo.

Mientras tanto, en el tratamiento estándar (2x), la actividad metabólica (Fig. 5b) inicia hasta alrededor de las 40 horas a partir de las cuales se obtienen picos alrededor de las 55, 75 y 100 horas, estos dos últimos superando ligeramente (aunque en otras repeticiones superando no tan ligeramente) el nivel del primer pico de cada tratamiento diluido. Es muy probable que la actividad metabólica correspondiente a estos dos últimos picos, este relacionada con la producción máxima en este cultivo.

En cuanto a los tratamientos mas concentrados: 2.8x y 3.2x, la actividad metabólica (Fig. 5b) se notó muy disminuida en las primeras horas (debido muy probablemente a la alta tonicidad del medio) aumentando rápidamente y en mayor proporción que en las otras, hasta las 60 y 70 horas respectivamente; sin embargo, para el tratamiento mas concentrado volvió a bajar hacia las 90 horas, resultando algo muy característico en este tratamiento ya que lo mismo ocurrió en otras repeticiones del mismo. Este retardo en la producción de CO₂ también perjudico el inicio en la producción de penicilina. Cabe resaltar que la cinética de CO₂ del cultivo más productor 3.2x presenta un primer pico pronunciado seguido de una horizontal baja pero muy estable (por 45 horas).

El crecimiento (o biomasa) fue determinado tanto por gravimetría que es un método directo de medición, como por respirometría que representa un tipo de medición indirecto. Sin embargo, cabe señalar que el primer método constituye una determinación muy difícil de precisar en sistemas de FS debido principalmente a que los microorganismos se unen íntimamente a la matriz sólida y no pueden ser cuantitativamente separados; mientras que las mediciones de respiración han representado una alternativa que es extensamente utilizada debido a su precisión y a que es un método especialmente adecuado para el monitoreo y control del proceso en este tipo de sistemas. Por lo anterior, solo consideraremos por

escrito algunos datos parciales del método gravimétrico que tengan relación con las cinéticas de respiración.

La producción de CO₂ vista en forma integrada como producción total de CO₂/gramo de materia seca/columna nos indica la actividad catabólica y es, teóricamente, paralela a la curva de crecimiento (siempre y cuando el coeficiente de mantenimiento "m" sea constante)(Figura 5c). Aunque este coeficiente no se conoce, estas curvas resultan por el momento el mejor indicativo de crecimiento. Estos valores de producción de CO₂ total fueron obtenidos a partir de la siguiente fórmula:

$$\Delta t * C_i + (C_{i+1} - C_i) * \Delta t * 0.5$$

en donde,

$$\Delta t = t_{i+1} - t_i$$

$$C_i = C_{CO_2} \text{ al } t_i$$

$$C_{i+1} = C_{CO_2} \text{ al } t_{i+1}$$

Esta fórmula ha sido denominada acumulativa y fue reportada por Saucedo-Catañeda, G. en 1991. De éstas gráficas también se determinaron dos velocidades de crecimiento (en realidad de la actividad metabólica) para cada tratamiento, siendo éstas Q_{CO₂-1} y Q_{CO₂-2} (velocidades volumétricas de producción de CO₂) las cuales están relacionadas con la trofofase y la idiofase respectivamente (Tabla 2).

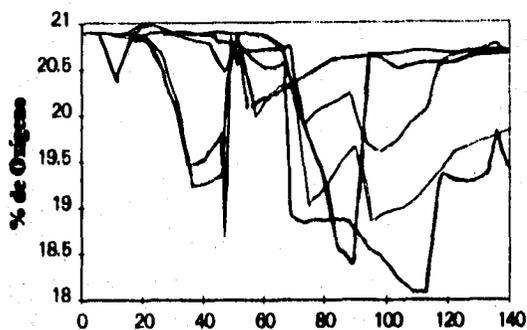
En la Tabla 2 se muestra un valor de biomasa para todo el cultivo de cada tratamiento en unidades de [litros de CO₂ total/columna]. Este valor se obtuvo a partir de la fórmula acumulativa en el último tiempo de la cinética de CO₂ que se graficó en forma integrada (Fig. 5c).

Retomando nuevamente los resultados ya mencionados para esta serie experimental, se observa en general y tomando en cuenta las repeticiones realizadas para estos mismos tratamientos, que existe una clara relación entre los tratamientos (concentrados) que alcanzaron una mayor producción de penicilina con un mayor crecimiento, caracterizado como ya se menciona arriba, por la producción de CO_2 total; sucediendo lo contrario, para los tratamientos (diluidos) que tuvieron una menor producción de penicilina y en donde el crecimiento fue considerablemente menor (Tabla 2).

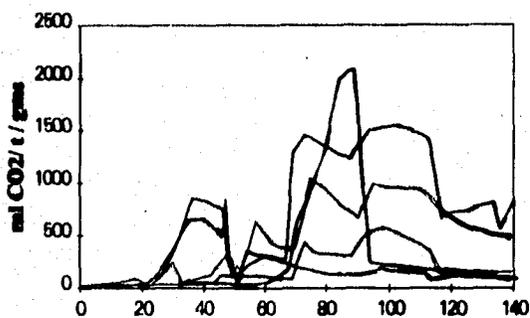
En cuanto a las velocidades volumétricas de producción de CO_2 , Q_{CO_2-1} y Q_{CO_2-2} , tendieron a ser menores en los tratamientos diluidos en comparación con los concentrados en donde los valores de estas Q_{CO_2} fueron mayores (Tabla 2).

Continuando con la descripción de la fase de crecimiento, hemos de destacar que el tiempo de germinación (vista como el inicio de la actividad metabólica) mostrado en la Tabla 2, inició tempranamente en los tratamientos diluidos, mientras que en los tratamientos concentrados la germinación fue retardada.

a)



b)



c)

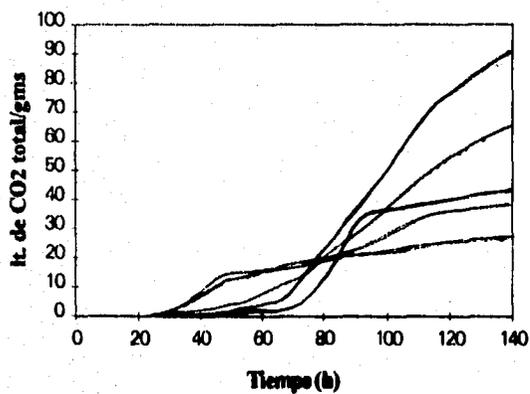


Figura 5. Efecto de la Concentración de Nutrientes: 3.2 (—), 2.8 (—), 2.0 (—), 1.0 (—) y 0.5 (—) en el Consumo de oxígeno (a), Velocidad de producción de CO_2 (b) y Producción de CO_2 total por columna durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (bagacillo y agua) se mantuvieron en una relación constante (serie 1)

SERIE 1

% b	% a	b/a	% n	[x]	a _w	Producción Máx. de Penicilina (µg/h)	Tiempo de Máx. Producción (h)	Productividad (µg/h)	Tiempo de Germinación (h)	Biomasa [litros de CO ₂ total/columna]	Q _{CO₂-1}	Q _{CO₂-2}
12,49	62,25	0.201	25,46	3.2	0.944	3,949.06	118	33.47	66	44.55	2.22	0.15
13,02	65,25	0.200	22,23	2.8	0.957	3,542.41	118	30.02	45	93.99	1.54	1.54
*14,09	68,75	0.205	15,91	2.0	0.962	2,898.77	88	30.67	47	67.41	0.44	0.86
15,42	74,75	0.206	7,96	1.00	0.979	2,117.03	118	17.94	26	38.82	0.64	0.58
16,08	79,50	0.202	3,98	0.5	0.985	1,340.77	118	11.36	25	28.12	0.8	0.14

Tabla 2. Efecto de la concentración de nutrientes (n) sobre la Producción de Penicilina y el Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en Fermentación Sólida cuando la relación bagacillo/agua (b/a) es constante. Concentración del medio Somerson modificado ([x]), actividad de agua (a_w), velocidades volumétricas de producción de CO₂ (Q_{CO₂-1} y Q_{CO₂-2}). Condiciones estándar (*).

6.3. Efecto de la humedad, manteniendo constante la relación bagacillo/nutrientes (serie 2).

En esta serie se mantuvo constante la relación de los dos constituyentes sólidos del medio de fermentación: los nutrientes y el bagacillo de caña. Esta relación fue de 0.885, en base a los valores de las condiciones estándar. El porcentaje de humedad teórico fue cambiado en un rango de 68 a 73 por ciento (Tabla 1). De esta forma se obtuvo que al aumentar o disminuir el porcentaje de humedad, las cantidades de los sólidos (ambos en la misma proporción), se disminuyeron o aumentaron respectivamente.

Los tratamientos con humedades de 57.25, 61.25 y 64.75 por ciento (según los datos experimentales obtenidos), fueron considerados los tratamientos más secos (esto en comparación a la humedad de las condiciones estándar), mientras que los tratamientos con 70 (condición estándar) y 75.5 por ciento de humedad (ambos datos experimentales), fueron considerados los tratamientos más húmedos. Cada tratamiento fue repetido dos veces, en dos diferentes experimentos.

Al inicio de cada fermentación se determinó la actividad de agua (Tabla 3) y durante los cultivos se determinaron parámetros de: pH, humedad, biomasa, esporulación, consumo de azúcares, producción de penicilina y respirometría. Las cinéticas de éstas fueron graficadas y son mostradas en las Figuras 6, 7 y 8.

6.3.1. pH

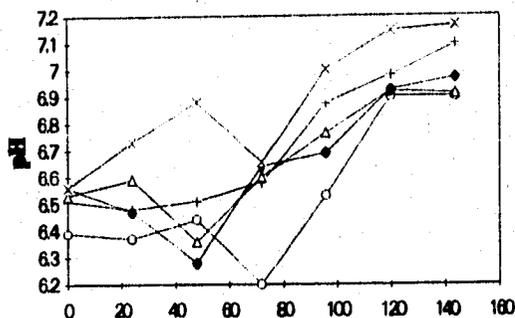
Al igual que en la serie anterior la cinética de pH para todos los tratamientos disminuye ligeramente en las primeras 48 horas y en general aumenta progresivamente hasta valores alrededor de 7.0 en la mayoría (Figura 6a). En particular, para el tratamiento de mayor humedad (75.5 %) el pH se mantuvo ligeramente superior desde las primeras 72 horas en comparación a las demás cinéticas y fue aún más característico un mayor aumento a partir de

las 96h alcanzando a las 144h, un pH=7.4. Por el contrario, para el tratamiento de menor humedad (57.25%), el pH se mantuvo siempre en un nivel ligeramente menor en relación a los demás tratamientos, pero con la misma tendencia aumentar.

6.3.2. Humedad

En todos los tratamientos, la humedad tendió a disminuir ligeramente en las primeras 48 horas y después la tendencia cambió, es decir fue en aumento siempre en sus diferentes niveles pero con un perfil similar (Figura 6b). Cabe mencionar que al inicio de los cultivos, los valores de humedad experimentales, fueron ligeramente diferentes a los valores teóricos. Para complementar y precisar esta información, se pueden observar las cinéticas de porcentaje de oxígeno esperados, esto debido especialmente al fenómeno de evaporación ya sea durante el pretratamiento del bagacillo (que incluye diferentes tiempos en la esterilización) y en la esterilización del medio de producción; así como en el tiempo de exposición del medio de cultivo sólido durante su preparación (mezclado) y llenado de las columnas (Tabla 1 y 3). Esta explicación en cuanto a la pérdida de humedad debe ser extendida para las series 1 y 3.

a)



b)

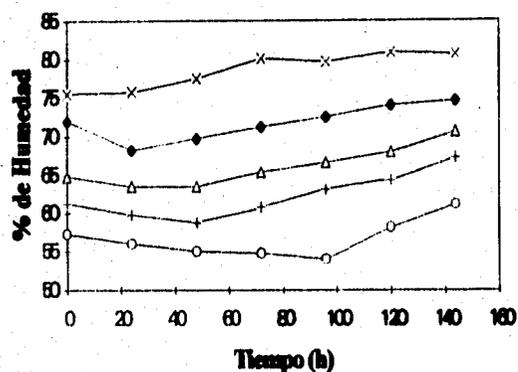


Figura 6. Efecto del contenido de agua inicial: 57.25% (o), 61.25% (+), 64.75% (Δ), 72% (◆) y 75.5% (x) en las cinéticas de pH (a) y Humedad (b) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (soporte y nutrientes) se mantuvieron en una relación constante (serie 2).

6.3.3. Consumo de Azúcares.

En los tratamientos más secos con 57.25%, 61.25% y 64.75% de humedad (*i.e.* con una mayor concentración de nutrientes por mililitro), el consumo de azúcares (Figura 7a), se notó más lento en las primeras 48 horas; aumentando después hacia las 72 horas, en donde los azúcares comenzaron a agotarse. En los otros dos tratamientos: el de las condiciones estándar y el tratamiento más húmedo, de 75.5% de humedad (*i.e.* el menos concentrado), el

consumo fue más rápido desde el inicio hasta las 72 horas, a partir de las cuales los azúcares fueron casi completamente agotados. Nótese que las cinéticas de consumo de azúcares están dadas en mg de azúcares reductores por gramo de materia seca (en donde la relación bagacillo/nutrientes es constante). Al igual que en la serie 1 (ver sección anterior), se observan las etapas distintivas en el consumo de azúcares en FS para los cinco tratamientos de esta serie, aplicándose las mismas correlaciones en cuanto a la producción de penicilina se refiere.

En general, el comportamiento de las cinéticas de azúcares de los tratamientos mas secos y de los tratamientos con mayor humedad de esta segunda serie son comparables con las cinéticas de los tratamientos concentrados y de los tratamientos diluidos de la primer serie respectivamente. Así mismo, como se verá a continuación, éstas comparaciones también pueden ser hechas en cuanto al tiempo de inicio en la producción de penicilina y producción de CO₂. Estas comparaciones resultan contrarias para el nivel de producción.

6.3.4. Producción de penicilina.

En los dos tratamientos mas secos: con 57.25% y 61.25% de humedad, la producción de penicilina (Figura 7b), inicia tardíamente, a las 72 y 96 horas respectivamente, obteniéndose por lo tanto, una menor productividad ya que las producciones obtenidas fueron las mas bajas en esta serie. Mientras tanto, en los otros tres tratamientos, con humedades de 64.75%, 72% y 75.5%, la producción de penicilina alcanzada fue mayor y la producción inició mas tempranamente, en el intervalo de 24-48 horas, aumentando así la productividad.

En la Tabla 3 se muestran las producciones máximas y los tiempos de producción máxima de los cinco diferentes tratamientos de cultivo para esta segunda serie, así como sus productividades (producción máxima/tiempo).

6.3.5. Esporulaci3n.

La esporulaci3n (de manera similar a la producci3n de penicilina), fue tardía en los tratamientos mas secos, mientras que en los dos tratamientos mas húmedos, inici3 mas temprano (Figura 7c). Considerando las repeticiones de esta serie y las observaciones cualitativas, podemos decir en general, que el nivel de esporulaci3n tendió aumentar hacia los tratamientos más húmedos al igual que lo fue la producci3n de penicilina.

6.3.6. Respiraci3n.

La formaci3n de CO_2 inici3 mas tarde en los dos tratamientos mas secos, hacia las 40h en el tratamiento de 61.25% de humedad y a las 60 horas en el tratamiento de 57.25% de humedad. A partir de estas horas el comportamiento en la velocidad de formaci3n de CO_2 fue característico en estos tratamientos (Fig. 8b). En los otros tres tratamientos con mas humedad (incluyendo al de 64.75% de humedad), ésta velocidad aumenta desde las 20-40 horas, con característicos picos y/o mesetas hasta las 100 horas, a partir de las cuales empieza a descender (Fig. 8b). Estas cinéticas se correlacionan con el consumo de oxígeno (Fig. 8a) (ver secci3n anterior).

En el cultivo mas productor de esta serie la cinética de CO_2 tuvo la siguiente forma: un pequeño primer pico seguido de una línea horizontal baja que dura 20 h, para subir y formar una meseta por 30h más, luego baja y forma otra horizontal con poca pendiente.

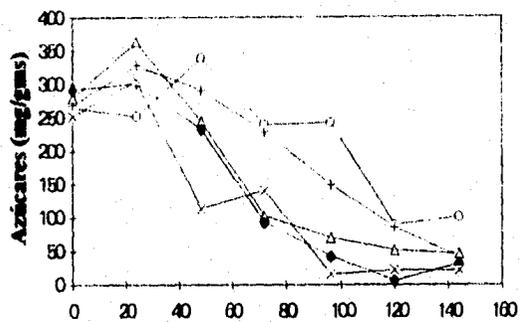
El inicio en la germinaci3n (estimado por el inicio en la producci3n de CO_2), fue mas temprana en los tratamientos diluidos (*i.e.* mayor disponibilidad de agua), y por el contrario, en los tratamientos mas secos la germinaci3n estuvo retardada (Tabla 3).

Para esta segunda serie se observ3 una relaci3n inversa entre la producci3n de penicilina y el crecimiento, contrario a lo observado en la serie anterior en donde esta relaci3n fue directa. Este crecimiento es visto especialmente por la producci3n de CO_2 en forma integrada (ver

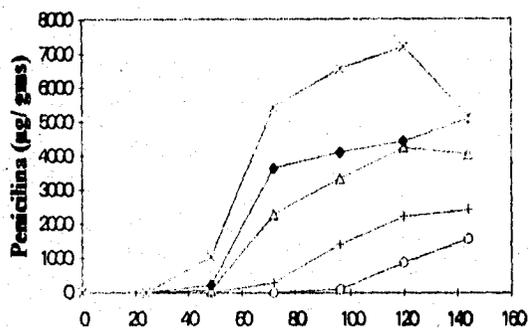
sección de resultados anterior) en donde se obtuvo un valor de biomasa para todo el cultivo y para cada tratamiento en unidades de [l de CO₂ total/columna] (Tabla 3). De esta manera, la producción de biomasa para todo el cultivo tendió a aumentar en los tratamientos más secos (y que menos producen) y a disminuir en los más diluidos (y que más producen).

Continuando con la misma caracterización del crecimiento en estos cultivos, se obtuvieron dos velocidades de crecimiento (Q_{CO_2-1} y Q_{CO_2-2}), una para la trofofase y otra para la idiofase respectivamente. Ambas Q_{CO_2} tendieron a disminuir en los tratamientos con más humedad mientras que en los tratamientos más secos aumentaron.

a)



b)



c)

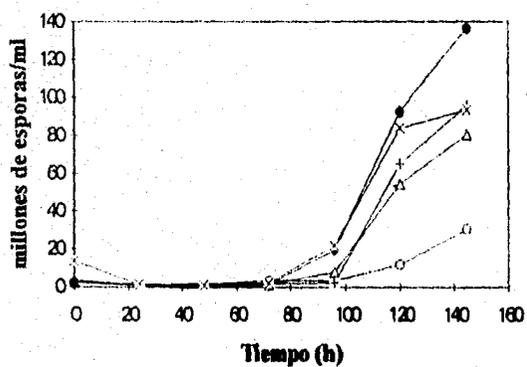
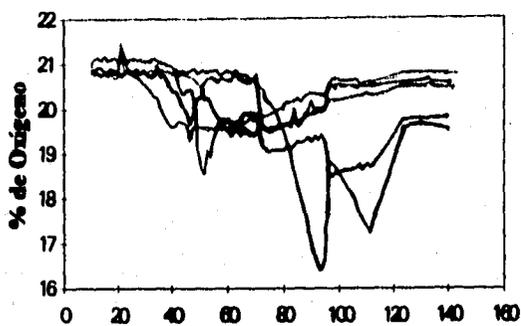
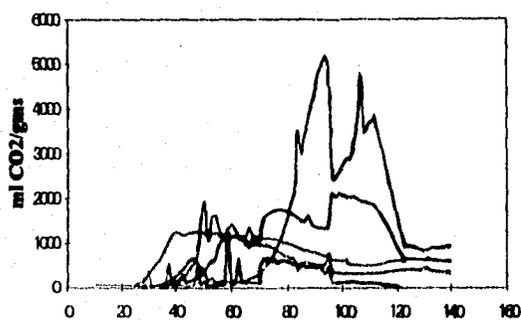


Figura 7. Efecto del contenido de agua inicial: 57.25% (o), 61.25% (+), 64.75% (Δ), 72% (◆) y 75.5% (x) en el Consumo de azúcares (a), Producción de Penicilina (b) y Esponulación (c) en las cinéticas de pH (a) y humedad (b) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (soporte y nutrientes), se mantuvieron en una relación constante (serie 2).

a)



b)



c)

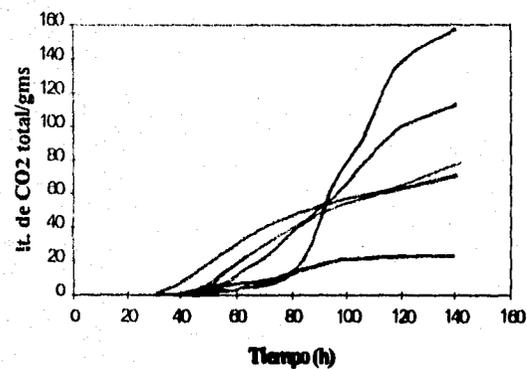


Figura 8. Efecto del contenido de agua inicial: 57.25% (—), 61.25% (—), 64.75% (—), 72% (—) y 75.5% (—) en el Consumo de oxígeno (a), Velocidad de producción de CO_2 (b) y Producción de CO_2 total por columna durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. Los otros dos constituyentes del medio sólido (soporte y nutrientes) se mantuvieron en una relación constante (serie 2).

SERIE 2

% b	% a	b/a	% n	[x]	a _w	Producción Máx. de Penicilina (µg/h)	Tiempo de Máx. Producción (h)	Productividad (µg/h)	Tiempo de Germinación (h)	Biomasa [litros de CO ₂ total/columna]	Q _{CO₂-1}	Q _{CO₂-2}
19,68	57,25	0.34	22,24	2,79	0.944	1,574.20	144	10.93	46.11	159.33	4.00	3.55
17,82	61,25	0.28	20,13	2,53	0.955	2,418.24	144	16.79	42.26	112.98	1.27	1.6
16,57	64,75	0.26	18,72	2,35	0.966	4,253.75	120	35.45	36.11	71.64	1.6	1.04
*14,09	72,00	0.20	15,91	2,00	0.968	5,100.74	144	35.42	37.26	77.94	1.12	1.08
10,95	75,50	0.143	12,398	1,56	0.974	7,197.57	120	59.98	32.26	23.37	0.5	0.13

Tabla 3. Efecto del contenido de agua (a) sobre la Producción de Penicilina y el Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en Fermentación Sólida cuando la relación bagacillo/nutrientes (b/n) es constante. Concentración del medio Somerson modificado ([x]), actividad de agua (a_w), velocidades volumétricas de producción de CO₂ (Q_{CO₂-1} y Q_{CO₂-2}). Condiciones estándar (*).

6.4. Efecto de la cantidad de bagacillo de caña, manteniendo constante la relación nutrientes/agua (serie 3).

En esta última serie se mantuvo constante la concentración del medio complejo de producción Somerson (relación nutrientes/agua constante) y se probó el efecto de la cantidad de soporte del medio de fermentación sólida. Esta concentración según las condiciones estándar fué de 0.227 gramos por mililitro, en relación a [2 x] (dos veces la concentración original). La cantidad de soporte fué cambiado en un rango de 10.35 a 23.9 gramos de bagacillo (Tabla 4).

Para esta serie, hubieron dos tratamientos de mayor cantidad de soporte, con 18.75% y 23.9% de bagacillo y dos tratamientos de menor cantidad de soporte, con 14.09% (condición estándar) y 10.35% de bagacillo. Cada uno de estos tratamientos fué realizado en dos ocasiones, sin embargo al igual que en las series anteriores se presentarán los resultados de un solo experimento.

Al inicio de cada fermentación se determinó la actividad de agua (Tabla 4) y durante los cultivos se determinaron parámetros de: humedad, pH, biomasa, esporulación, consumo de azúcares, producción de penicilina y respirometría. Las cinéticas de éstas fueron graficadas y son mostradas en las Figuras 9 10 y 11.

6.4.1. pH

Las cinéticas de pH se comportaron en forma muy similar para los cuatro tratamientos (Figura 9a). El pH inicial se obtuvo alrededor de 6.4 y éste disminuyó ligeramente hacia las 24 horas. En las siguientes 25h aumentó hacia valores de pH entre 7.2-7.4 y volvió a disminuir hacia las 72h, a partir de las cuales aumentó progresivamente hasta finalizar en valores de pH entre 7.6- 7.8. En comparación a las fermentaciones de las series 1 y 2 éstas

cinéticas fueron muy diferentes en cuanto al comportamiento y los valores de pH alcanzados.

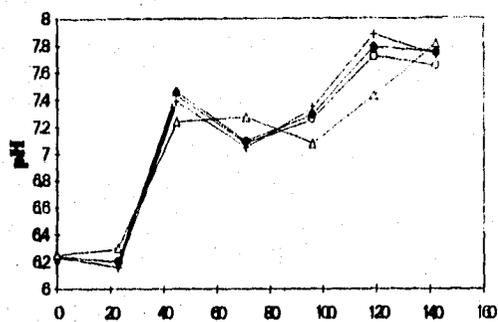
6.4.2. Humedad.

En cambio, la humedad siguió comportándose similarmente a los resultados obtenidos en las series 1 y 2. De tal forma que durante las cinéticas, la humedad tendió a aumentar bajo un mismo perfil en todos los tratamientos, pero siempre en sus diferentes niveles (Figura 9b). En este caso, la humedad de las condiciones iniciales fué diferente para cada tratamiento, debido a la cantidad de bagacillo involucrada, ya que al aumentar ésta se disminuyó la cantidad de nutrientes y agua en la misma proporción (manteniendo constante la concentración de 0.227 g/ml) (ver columna n/a en Tabla 4). Al igual que en las otras series, las humedades iniciales experimentales fueron ligeramente diferentes a las esperadas teóricamente (Tabla 1 y 4) (ver explicación en los resultados de la serie 2).

6.4.3. Consumo de azúcares

El consumo de azúcares (Figura 10a) fué mayor en las primeras 24 horas en los tratamientos con mayor contenido de soporte, 18.75% y 23.9% de bagacillo (*i.e.* con menos concentración de nutrientes por gramo de bagacillo) y posteriormente descendió casi a la misma velocidad que en los otros dos tratamientos con menos contenido de soporte 14.09% (estándar) y 10.35% de bagacillo (*i.e.* con mayor concentración de nutrientes por gramo de bagacillo), en donde la velocidad de consumo de azúcares fué menor solo en las primeras 45 horas. Hacia las 94 horas en todos los tratamientos los azúcares fueron casi completamente agotados. Las fases distintivas en el consumo de azúcares ya mencionadas en la serie 1 son asimismo aplicadas para esta serie, lo mismo que las correlaciones hechas en cuanto a la producción de penicilina. Experimentalmente, los valores iniciales de concentración de azúcares por mililitro fueron muy similares en todos los tratamientos (datos no presentados).

a)



b)

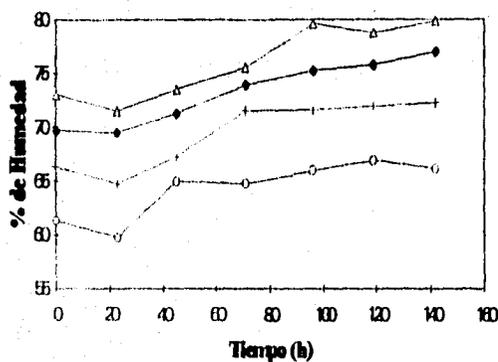


Figura 9. Efecto del contenido de soporte: 23.91 (o), 18.75 (+), 14.09 (◆) y 10.35 (Δ) en las cinéticas de pH(a) y Humedad (b) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. La concentración nutrientes/agua (los otros dos constituyentes del medio sólido) se mantuvo constante (serie 3)

6.4.4. Producción de penicilina.

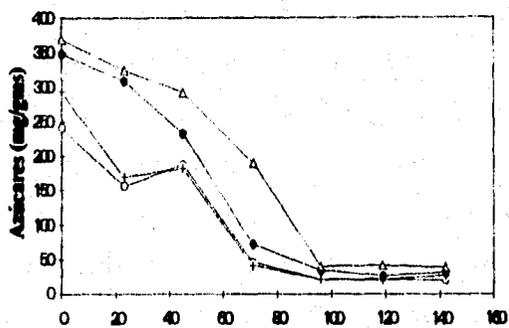
La producción de penicilina (Figura 10b) fué mayor en los tratamientos con menor cantidad de bagacillo en comparación a los tratamientos con mayor cantidad de bagacillo (Tabla 4). En todos los tratmientos la producción inicio en el intervalo de 24-48 horas, aunque no es realmente apreciable como lo es a las 71 horas. A estas horas los diferentes niveles de producción comenzaron a observarse claramente.

En la Tabla 4 se muestran las producciones máximas y los tiempos de producción máxima de los cinco diferentes tratamientos de cultivo para esta tercer serie, así como sus productividades (producción máxima/tiempo).

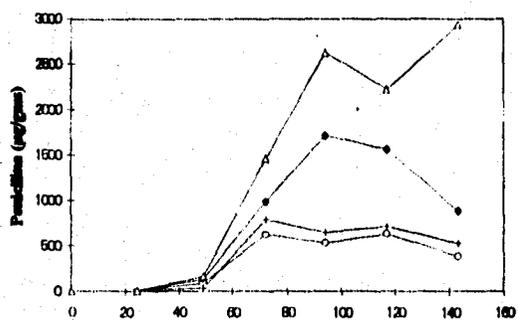
6.4.5. Esporulación.

Como era de esperarse, el inicio de la producción de esporas (Figura 11c) estuvo vinculada con el inicio en la producción de penicilina. Sin embargo, el número de esporas y el perfil de la cinética para este experimento fué muy semejante entre los tratamientos de la serie, lo cual tiene mucho mas que ver con el crecimiento. Por lo tanto, estas condiciones iguales (en cuanto a concentración de nutrientes) no afectan la esporulación, pero sí fuertemente la producción.

a)



b)



c)

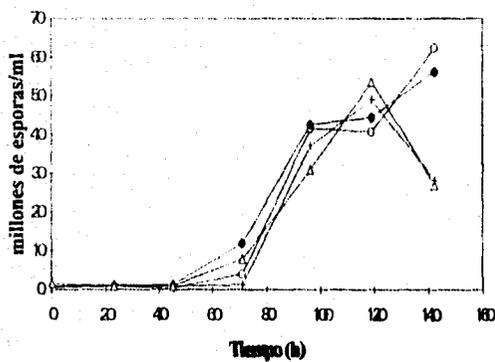


Figura 10. Efecto del contenido de soporte: 23.91 (o), 18.75 (+), 14.09 (◆) y 10.35 (Δ) en el Consumo de azúcares (a), Producción de Penicilina (b) y Esporulación (c) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. La concentración nutrientes/agua (los otros dos constituyentes del medio sólido) se mantuvo constante (serie 3).

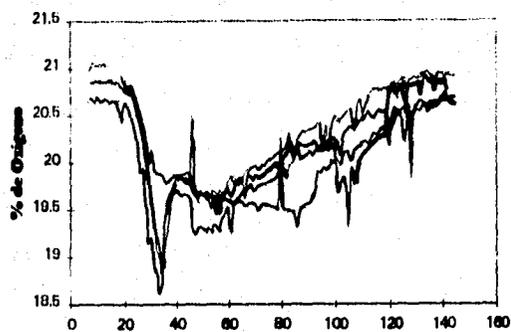
6.4.6. Respiración.

Al igual que la producción de penicilina, la formación de CO_2 inició alrededor de las 24 horas para todos los tratamientos. Durante las cinéticas, el perfil fué similar en el tratamiento estándar y en los tratamientos con mayor cantidad de bagacillo (Figura 11b). El nivel de CO_2 fué también semejante, particularmente para las condiciones estándar y para el tratamiento con 18.75% de bagacillo, mientras que para el tratamiento con 23.9% de bagacillo el nivel fué ligeramente superior. Finalmente, en el tratamiento con 10.35% de bagacillo la producción de CO_2 inició también alrededor de las 24 horas, pero el nivel de CO_2 disminuyó y el comportamiento de la cinética fué muy diferente. Obsérvase también las cinéticas de O_2 (Figura 11a).

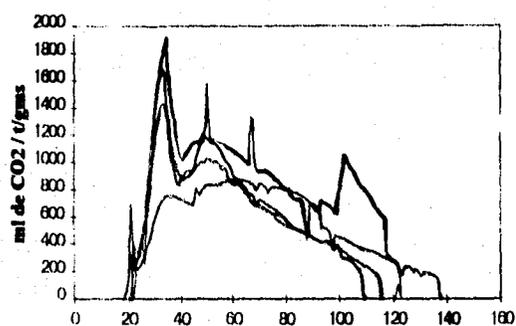
El inicio en la germinación fue igual en los tres tratamientos de menor bagacillo, mientras que en el tratamiento con mayor bagacillo, la germinación fue ligeramente más temprana (Tabla 4).

En cuanto a los valores dados para estimar la biomasa (Tabla 4) se observó que en el tratamiento con mayor cantidad de bagacillo la producción de biomasa fué mayor en comparación con los tratamientos de menor cantidad de bagacillo y el tratamiento estándar. En éstos últimos, la biomasa alcanzada fué muy semejante entre ellos.

a)



b)



c)

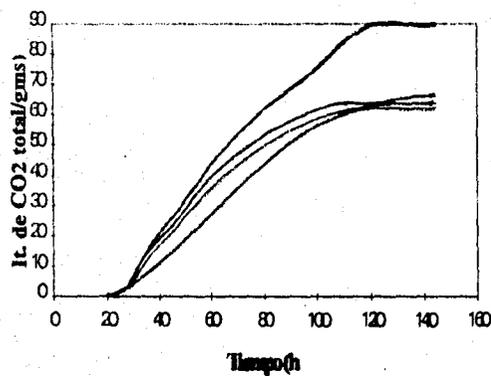


Figura 11. Efecto del contenido de soporte: 23.91(—), 18.75 (—), 14.09 (—) y 10.35 (—) en el Consumo de oxígeno (a), Velocidad de Formación de CO_2 (b) y Producción de $\text{CO}_{2\text{total}}$ por columna (c) durante el crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en FS. La concentración nutrientes/agua (los otros dos constituyentes del medio sólido) se mantuvo constante (serie 3).

Por último, consideraremos las velocidades de crecimiento (Q_{CO_2-1} y Q_{CO_2-2}). Estas velocidades fueron obtenidas de la gráfica 9c. Una apreciación cualitativa de esta gráfica nos muestra la gran semejanza en el perfil de las cinéticas y de las Q_{CO_2} . Asimismo, los valores mostrados en la Tabla 4 muestran que efectivamente no existen grandes diferencias entre éstas velocidades, aunque si hay una ligera tendencia en ambas a aumentar en los tratamientos con mayor cantidad de bagacillo.

SERIE 3

% b	% a	b/a	% n	[x]	a_w	Producción Máx. de Penicilina ($\mu\text{g/h}$)	Tiempo de Máx. Producción (h)	Productividad ($\mu\text{g/h}$)	Tiempo de Germinación (h)	Biomasa [litros de CO_2 total/columna]	Q_{CO_2-1}	Q_{CO_2-2}
23,91	61,33	14,10	1,77	0,229	0,961	630.40	117	5.39	22.48	89.92	1.58	1.03
18,75	66,33	15,05	1,89	0,227	0,969	788.45	172	10.95	22.48	63.66	1.50	1.03
*14,09	69,66	15,91	2,00	0,228	0,970	1,715.67	94	18.25	22.48	62.18	1.34	0.93
10,35	73,00	16,60	2,09	0,227	0,970	2,929.85	143	20.49	21.45	66.08	0.77	0.79

Tabla 4. Efecto de la cantidad de bagacillo (b) sobre la Producción de Penicilina y el Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en Fermentación Sólida cuando la relación nutrientes/agua (n/a) es constante. Concentración del medio Somerson modificado ([x]), actividad de agua (a_w) y velocidades volumétricas de producción de CO_2 (Q_{CO_2-1} y Q_{CO_2-2}). Condiciones estándar (*).

Efecto de los constituyentes (bagacillo/nutrientes/agua) de la fermentación sólida sobre la producción de penicilina y el crecimiento de *Penicillium chrysogenum*.

Para determinar el efecto de los constituyentes del medio de fermentación sólida en la producción de penicilina y en el crecimiento, fue necesario que los resultados de las tres series antes expuestas, fueran vistos de una forma global. Para ello, se graficó la relación entre nutrientes-soporte (N/S) y agua-soporte (A/S) (*i. e.* incluyendo los tres constituyentes del medio sólido) contra la variable de respuesta, la producción de penicilina (Figura 12). Para cada experimento, fue normalizada la producción de penicilina en función del control.

Dada la superficie de respuesta, se observó que la producción de penicilina disminuyó hacia la zona de baja relación N/S (<1g/g) y baja A/S (<4.5g/g). Es decir, en condiciones de alto contenido de bagacillo. Contrario a esto, la producción de penicilina aumentó hacia la zona de alta relación N/S (>1g/g) y alta A/S (>4.5g/g) y por consiguiente, bajo contenido de bagacillo. Si consideramos los tratamientos de máxima producción de penicilina de cada serie, el bajo contenido de bagacillo fue del orden de 10.3, 11 y 12.5%.

Junto con el bajo contenido de bagacillo, las condiciones que favorecieron la producción de penicilina fueron: la alta o baja humedad 62.2% y 73-75.5% y la utilización de medios mas concentrados (1.6 a 2.8 veces la concentración usada en fermentación líquida). Estas condiciones son vistas en las dos zonas de máximos de la misma gráfica (Figura 12). Sin embargo, aún considerando esta generalidad, es interesante ver que en las diferentes series de experimentos tanto la humedad como los nutrientes tuvieron efectos opuestos en la producción de penicilina. Estos efectos son mostrados en las Figuras 13 y 14.

En relación al estándar, las condiciones de mayor y menor producción fueron localizadas en el triángulo de la Figura 15. En donde cada lado (o eje) del triángulo representa un constituyente del medio de FS (soporte, nutrientes y agua). La forma que en que éstos

parámetros se graficaron fue extendiendo a partir de su eje una perpendicular. De esta manera, los diferentes valores porcentuales de cada constituyente son intersectados con los otros dos al interior del triángulo. Nuevamente, la ubicación de éstas condiciones nos indican hacia donde las combinaciones entre los constituyentes confieren las condiciones que mejoran o empeoran la producción de penicilina.

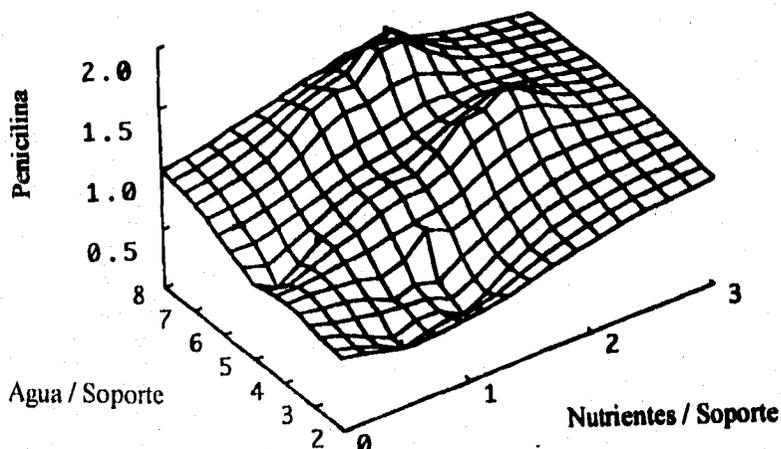


Figura 12. Producción (máxima de penicilina) en cultivos con diferentes relaciones agua/soporte y nutrientes/soporte (combinaciones soporte, nutrientes y agua).

En contraste, el crecimiento (estimado por la producción de CO_2 total) disminuyó al aumentar la humedad y disminuir los nutrientes, pero no respondió a diferentes contenidos de soporte (Figura 15). En esta gráfica sin embargo, los valores de baja relación ($N/S < 1$) pueden estar afectando el crecimiento no tanto por el alto contenido de soporte sino más bien, por los pocos nutrientes (serie 1). Por lo tanto, la respuesta del crecimiento al contenido de soporte, puede tener una correlación más bien, positiva.

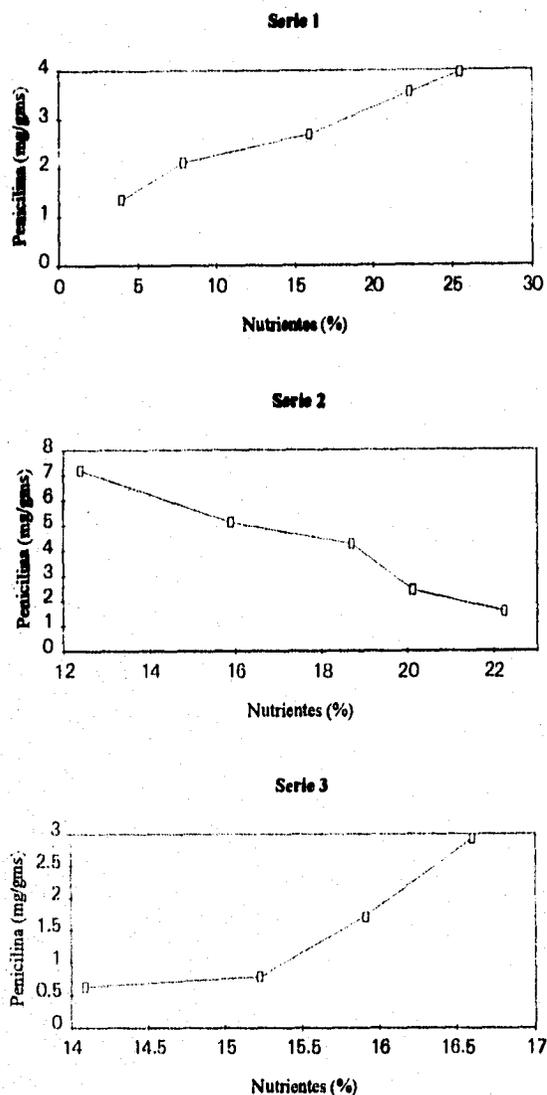


Fig 13. Picos de Producción Máxima de Penicilina en FS, cuando el incremento en el contenido de nutrientes fue compensando por:

- a) disminución en los otros dos constituyentes (soporte y agua)
- b) aumento en el contenido de soporte y disminución en el contenido de nutrientes
- c) disminución en el contenido de soporte y aumento en el contenido de agua

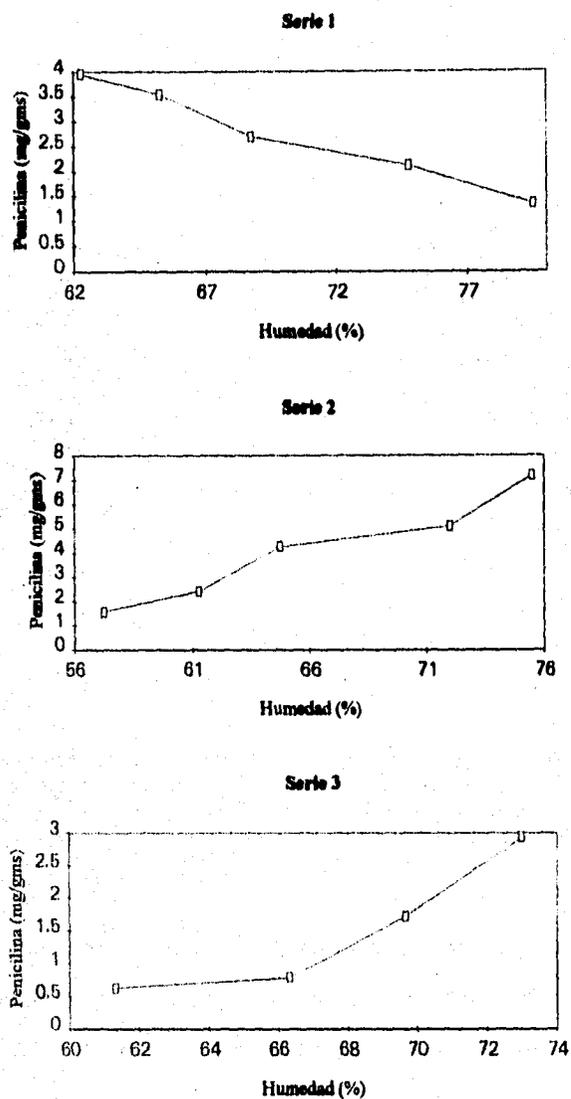


Fig 14. Picos de Producción Máxima de Penicilina en FS, cuando el incremento en la humedad inicial fue compensando por:

- a) aumento en la contenido de soporte y disminución en el contenido de nutrientes
- b) disminución en los otros dos constituyentes (soporte y nutrientes)
- c) disminución en el contenido de soporte y aumento en el contenido de nutrientes

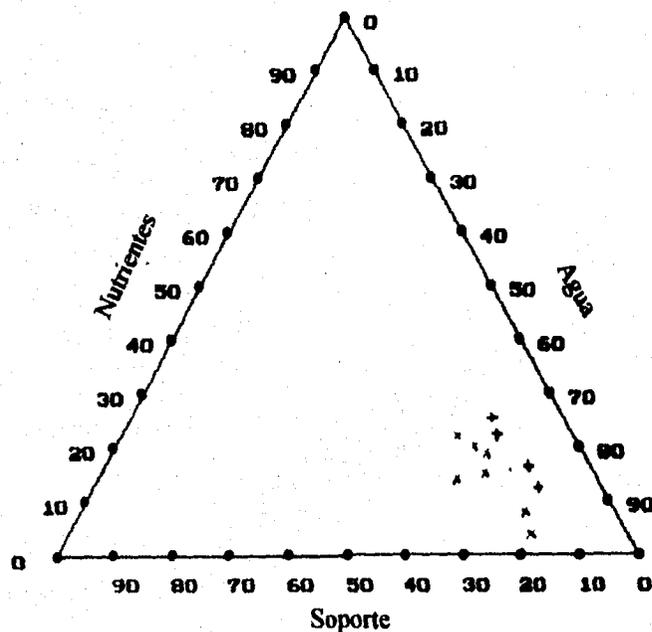


Figura 15. Combinaciones de los constituyentes del medio sólido (soporte, nutrientes y agua). La zona punteada representa las condiciones en las que se estudió la producción de penicilina. En relación a las condiciones estándar (*), se localizan a la derecha, las condiciones de mayor producción de penicilina (+) y a la izquierda, las condiciones de menor producción de penicilina (x).

En contraste, el crecimiento (estimado por la producción de CO_2 total) disminuyó al aumentar la humedad y disminuir los nutrientes, pero no respondió a diferentes contenidos de soporte (Figura 15). En esta gráfica sin embargo, los valores de baja relación ($N/S < 1$) pueden estar afectando el crecimiento no tanto por el alto contenido de soporte sino más bien, por los pocos nutrientes (serie 1). Por lo tanto, la respuesta del crecimiento al contenido de soporte, puede tener una correlación más bien, positiva.

No se determinó un valor de Q_{CO_2-2} típico para alta producción de penicilina. No obstante, los valores de Q_{CO_2-2} para alta producción siempre fueron mucho más bajos que

los del control o los de mala producción de su serie (entre 15 y 96 %) (Tabla 5). Los valores de Q_{CO_2-2} en la serie 3 fueron 15% menores que los del control y 23% menores que los de mala producción. En la serie 2, 88% menor que que las condiciones control y 96% menor que las condiciones de mala producción. En la serie 1, 82% menor que en las condiciones control, pero parecido a las condiciones de mala producción.

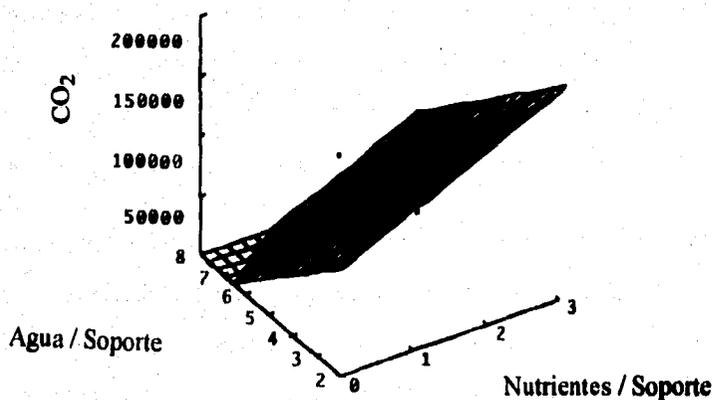


Figura 16. Producción total de CO_2 de cultivos con diferentes relaciones agua/soporte y nutrientes/soporte (combinaciones soporte, nutrientes y agua).

Serie	Q_{CO_2-2} de Alta Producción de Penicilina	Q_{CO_2-2} de condiciones Control	Q_{CO_2-2} de Baja Producción de Penicilina	Relación en % de Q_{CO_2-2} Alta vs. Control	Relación en % de Q_{CO_2-2} Alta vs. Baja
1	0.15	0.86	0.14	82.56	-7.14
2	0.13	1.08	3.55	87.96	96.35
3	0.79	0.93	1.03	15.05	23.30

Tabla 5. Tasas de respiración durante la idiofase (Q_{CO_2-2}) en condiciones control y en condiciones de alta y baja producción de penicilina de cada serie experimental. Las relaciones de tasas de respiración contra las de alta producción están dadas en porcentaje. El por ciento significa las diferencias entre los valores de las tasas que se comparan (ver texto).

VII. DISCUSIÓN

El desarrollo de esta investigación ha sido encaminada a establecer el efecto de los tres constituyentes básicos del medio sólido (bagacillo/nutrientes/agua), sobre el desarrollo del microorganismo, particularmente en la idiofase. Se consideró importante no solo ver el efecto independiente de cada uno de los constituyentes, sino el efecto de éstos cuando interaccionan de forma distinta. De esta manera, se planteó la hipótesis de que la producción de penicilina y en general el desarrollo del microorganismo depende de las combinaciones de los tres constituyentes principales del medio sólido.

Para lograr éstas distintas combinaciones se llevaron a cabo tres estrategias que fueron incluidas en las tres series experimentales descritas en el capítulo de resultados. Dentro de éstas estrategias podemos darnos cuenta de que existen varias maneras para llegar a un cierto valor de cualesquiera de los constituyentes del medio de FS. Por ejemplo, se pudo incrementar la concentración de nutrientes por tres caminos diferentes:

- 1) a costa de disminuir los otros factores (soporte y agua);
- 2) a costa de disminuir la humedad e incrementar el contenido de soporte y
- 3) a costa de disminuir el contenido de soporte e incrementar la humedad solo lo suficiente para mantener una concentración constante en el medio líquido

Estos tres caminos se hallan representados en las series experimentales 1, 2 y 3 respectivamente. Desde esta perspectiva, se puede ver claramente que las condiciones alrededor de un solo constituyente son diferentes según cambian las proporciones de los otros dos. Ahora bien, si de esta misma forma analizamos a cada uno de los constituyentes del medio de FS dentro de las diferentes condiciones de cultivo de las series experimentales, es posible que podamos determinar la importancia que tiene cada uno en el proceso de fermentación.

7.1. Efecto de la Proporción de los Constituyentes en la Producción de Penicilina.

Los resultados demuestran que el efecto de los parámetros clásicos como son la humedad y la concentración del medio (actividad de agua) sobre la producción de penicilina no es absoluto, sino relativo. Es decir, depende en realidad de la proporción de los constituyentes principales del medio de FS. Por lo tanto, los resultados de Barrios, *et al.*, (1988a), en donde se determinó el efecto independiente de la humedad y de la concentración de los nutrientes (actividad de agua) sobre la producción de penicilina, aunque son confirmados en este trabajo (a pesar de la cepa y el medio nutritivo), deben ser considerados como casos de un fenómeno más general.

Los resultados indicaron que aún las tendencias en la producción de penicilina, al incrementar la humedad o los nutrientes pueden ser opuestas dependiendo de cómo se compense dicho incremento con los otros dos constituyentes del medio de FS. Por ejemplo, en un primer caso, al incrementar la humedad, la producción disminuye siempre y cuando se aumente también la cantidad de bagacillo y se disminuyan los nutrientes; pero por el contrario, en un segundo y tercer caso, el incremento de la humedad favorece la producción, siempre que los otros dos constituyentes disminuyan ó si el bagacillo disminuye y los nutrientes aumentan (ver Figuras 13 y 14). Esto nos indica nuevamente que ver el efecto de estos parámetros en forma aislada nos da una visión muy estrecha o limitada puesto que los efectos pueden ser muy diferentes cuando las relaciones entre los tres constituyentes del medio cambian.

En contraste, el efecto del contenido de soporte en la idiofase sí fue absoluto, ya que al disminuir el contenido de soporte siempre subió la producción de penicilina independientemente de cómo se combinaran los otros dos (agua y nutrientes).

En la Figura 12 se confirmó que la producción mas alta se encuentra en la zona de bajo soporte (10.3 a 12.5%), en donde existen dos máximos ubicados en alta humedad (73-75%) y mediana concentración de nutrientes (12.3-16.3%) y otra en baja humedad (62.2%) y alta concentración de nutrientes (25.5%). En la Figura 15, éstas condiciones de máxima producción de penicilina son localizadas entre todas las condiciones probadas.

Por otro lado, los resultados indican que el inicio de la producción se retrasa al incrementar la concentración de nutrientes (disminuyendo a_w) y no es afectado por la humedad. Mientras que la velocidad de producción y el tiempo de producción suben aparentemente, cuando la humedad inicial incrementa (manteniendo constante o disminuyendo a_w).

7.2. Efecto de la Proporción de los Constituyentes en la Respiración.

7.2.1. Medición de la Respiración.

En general la producción de CO_2 puede ser vista como un indicador de la actividad metabólica del cultivo, pero también hay que tomar en cuenta la secuencia de reacciones implicadas en el intercambio CO_2 y O_2 . Considerando el caso del CO_2 , éste reacciona con el agua para formar H_2CO_3 (ácido carbónico), un ácido débil que se disocia formando iones bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}). La proporción del CO_2 y cada uno de éstos iones en disolución, depende del pH, la temperatura y la fuerza iónica de la solución (Eckert, R. 1990). Por lo tanto, considerando que en un sistema de FS los cambios en estos parámetros pueden ser apreciables, es difícil asegurar que en todo momento la producción de CO_2 refleje con exactitud la actividad metabólica y por ende la tasa de crecimiento durante la fermentación. Pero por otro lado, éstas cinéticas de producción de CO_2 al ser comparadas con las cinéticas de consumo de Oxígeno (dadas en % vs tiempo), muestran que los cambios de concentración de CO_2 se deben a actividad respiratoria de los cultivos. De

esta manera, por facilidad se trabajó con las cinéticas de CO_2 ocupándose las de O_2 únicamente para corroborar la forma y los cambios en secciones dudosas.

La derivada ($\text{ml CO}_2/\text{g min vs. tiempo}$) muestra los cambios en la velocidad de producción de CO_2 durante el cultivo, mientras que la forma integral o acumulativa ($\text{ml CO}_2 \text{ total/g}$) muestra una curva con la que se puede estimar el comportamiento del crecimiento.

A partir de la variedad de condiciones probadas se estableció para este sistema de cultivo, las formas típicas en las cinéticas de respiración. De esta manera, la cinética de velocidad de formación (derivada) de CO_2 , es una subida que forma un primer pico. Justo al caer este pico comienza la producción de penicilina (se observo en todos los casos). Luego, se forma un segundo pico que es mas bajo y ancho después del cual continúa descendiendo hasta llegar casi a cero al final del cultivo. La producción de penicilina continúa en este segundo pico y parte de la línea descendente (según las condiciones). Asimismo, en una forma integrada típica, se observo un corto período de pendiente relativamente alta, seguida por una segunda pendiente mas lenta (es en este cambio en el que comienza la producción de penicilina). Esta pendiente permanece estable por un cierto período y después comienza a bajar suavemente.

7.2.2. Relación entre el Contenido de Soporte, Producción y Tasa de Respiración

En la estrategia seguida en la serie 3 para lograr nuevas combinaciones, se varió el contenido de bagacillo y se mantuvo constante la relación nutrientes/agua. El hecho de haber mantenido ésta relación constante dio como resultado que los tiempos de germinación y de inicio de producción fueran muy parecidos, lo mismo que el crecimiento (CO_2 total) y las cinéticas de pH. Esto produjo resultados muy limpios y comparables, en los que fue posible ver efectos que quizás se enmascaran bajo condiciones experimentales más complicadas. En particular, ésta serie nos facilita ver el efecto del contenido de soporte tanto en la actividad respiratoria como en la producción de penicilina.

Como se menciona antes, al disminuir el contenido de soporte del medio sólido se incrementa la producción de penicilina. Considerando este efecto, se encontró por lo menos en esta tercer serie, que al incrementar la humedad bajando el contenido de soporte, disminuye proporcionalmente, la altura del primer pico en la cinética de respiración. También de manera proporcional, disminuye la altura del segundo pico y, al parecer, disminuye la pendiente con la que baja la formación de CO_2 , tomando la cinética una forma de meseta. Esta tendencia en la forma de la cinética caracterizaría entonces a los cultivos más productores. Sin embargo, en las series 1 y 2 estos cultivos productores (con bajo contenido de bagacillo), además de que no presentan esta forma en las cinéticas, tampoco tienen tendencias tan claras. Pero en común con la serie 3, presentan unas largas líneas horizontales (actividad respiratoria estable).

Ahora bien, al calcular las tasas de respiración Q_{CO_2-1} (trofofase) y Q_{CO_2-2} (idiofase) se encontró que al disminuir el contenido de soporte ocasiona una disminución de las tasas de respiración. Esto sugiere que el efecto benéfico sobre la producción se debe a que bajas tasas de respiración (probablemente de crecimiento) son más convenientes para la alta producción de penicilina.

7.2.3. Relación de la Tasa de Respiración con el Consumo de Azúcares Reductores

En realidad, la forma de las cinéticas de consumo de azúcares reductores (ARs) varía poco con diferentes condiciones, por lo que se podría hablar de una forma típica. El control de la serie 3 (Figura 17) sería una especie de forma típica, en donde hay una parte estable (fase 1) (a veces sube abruptamente o va descendiendo un poco) seguida de una primer pendiente fuerte (fase dos), continúa con una segunda pendiente más suave (fase 3) para llegar a una fase nivelada (fase 4) donde ya no baja más la concentración de ARs

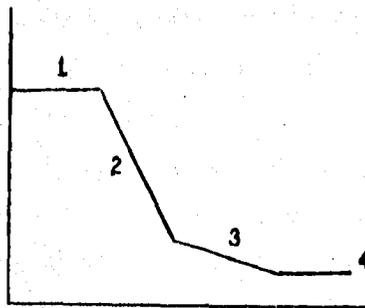


Figura 17. Relación de la Tasa de Respiración con el Consumo de Azúcares Reductores.

Si se compara la cinética de consumo de azúcares con la respiración (derivada), en la serie 3, se observa que el primer pico de CO_2 coincide con la primera parte de la cinética de azúcares (en la que se mantiene estable o baja ligeramente). Es probable que corresponda al consumo de glucosa ya que es la trofofase. Así, el segundo pico de CO_2 (bajo y ancho) coincide con el descenso rápido de azúcares (fase 2); quizás consumo de lactosa ya que es la idiofase. La última parte de respiración se correlaciona con la tercera sección de azúcares (que baja ligeramente), la cual también forma parte de la idiofase. Estas mismas fases en la

cinética de azúcares ya han sido descritas por Barrios-González, *et al.* (1988a), en donde sólo fue posible correlacionarlas con las fases de crecimiento (trofofase e idiofase) vistas a través de las cinéticas de producción de penicilina. En este estudio, el perfil de la cinética de ARs es reproducible (incluso para nuevas condiciones de cultivo) y muestra una clara correlación con cinéticas de respiración y producción de penicilina.

Ahora bien, en condiciones de bajo contenido de bagacillo (en donde se aumenta la producción de penicilina), una menor tasa de respiración, debería estar asociada a un diferente patrón de consumo de azúcares. En la tercer serie se ve muy claro que al incrementar la humedad (y disminuir el soporte), disminuye, proporcionalmente, la velocidad de consumo de ARs. Es decir, que los azúcares se consumen a menor velocidad, por lo que duran más y llegan a la última fase con una tasa de consumo todavía alta, lo que, presumiblemente permite un Q_{CO_2-2} menor pero más constante. Por lo tanto, se puede interpretar que las condiciones de bajo soporte, no permiten un alto consumo y quizás ello permita la dosificación de los azúcares, *i. e.* ocasionando que estos duren más. En lo que sería la dinámica del proceso, la transportación de nutrientes (por capilaridad) a través de una menor cantidad de fibras a lo largo del cultivo sería más lenta generando como ya se mencionó, mejores condiciones metabólicas para la producción del antibiótico. Esto mismo es sugerido en trabajos de FS donde la idiofase es favorecida por un tamaño de partícula mayor, en tal caso la difusión de los nutrientes (dentro de la partícula) dosificaría también el aporte de nutrientes en la fase de producción (Barrios-González, *et al.* 1993). Dicho efecto no se observó en la serie 2, aunque sí en la serie 1.

En la serie 2 se observaron tiempos de inicio diferentes y formas de derivadas (respiración) también muy diferentes y enormes diferencias en crecimiento (CO_2 total) por lo que una interpretación muy directa es más difícil. En este caso las velocidades de consumo parecen ser más altas en condiciones de bajo bagacillo y alta humedad. Llama la atención que las

condiciones de más alta producción (75.5 % de humedad), hay una enorme coincidencia entre el consumo de azúcares y derivada en lo que parece una curva diáxica sobre la transición en la utilización de glucosa y lactosa. Esta curva diáxica tiene un periodo intermedio en donde posiblemente se da la inducción lactasa.

En la serie I es el mismo problema de diferentes inicios, tamaños y formas, sin embargo, las más productoras presentaron una menor Q_{CO_2} -I (quizás sólo por concentradas). Hay que recordar que en este caso el cultivo más productor dio una cinética derivada totalmente típica (con un pico mas agudo y producción en una horizontal baja). También que hay dos cultivos con derivada mas o menos diáxica y que son las que menos producen (húmedas y muy diluidas).

Por el contrario, cuando hay un alto contenido de soporte la velocidad de consumo de ARs y la tasa de respiración aumentan. Esto parece indicar que el incremento de soporte mejora la transferencia de masas (*i.e.* el crecimiento), lo cual es inconveniente para la producción. De las combinaciones probadas, un mayor crecimiento (CO_2 total) fue observado en las condiciones de mayor contenido de soporte (excepto en la serie I, en donde los nutrientes fueron pocos). Al aumentar la cantidad de soporte aumenta el área superficial en relación al volumen, proporcionando un mayor soporte al hongo que mejora el desarrollo del micelio. En un sistema de FS con soporte impregnado, un mayor contacto micelio-partícula es particularmente importante porque los nutrientes se encuentran intraparticulamente difundiendo del centro a la superficie, en donde finalmente se hacen disponibles al microorganismo. Esto también se explica en trabajos de FS donde un tamaño de partícula menor da lugar a un mayor crecimiento (Mudgett, 1986).

7.2.4. Relación entre la Actividad de Agua y la Respiración

De acuerdo con Oriol *et al.* (1988a), los resultados de las tres series de experimentos muestran que la baja a_w (tonicidad) aunque incrementa drásticamente el tiempo de germinación (inicio en la producción de CO_2), también genera un aumento en el crecimiento al final del cultivo (CO_2 total), esto debido a que los medios están más concentrados. Si embargo, a diferencia de estos autores, la actividad de agua tuvo un efecto inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento (teóricamente correlacionada con Q_{CO_2}). Por lo tanto, valores de a_w pueden no ser tan determinantes en la tasa de crecimiento, como posiblemente sí lo sean, el tipo y concentración de solutos en el medio (Brown, A., 1978).

7.2.5. Relación entre la Esporulación y la Tasa de Respiración

Específicamente la esporulación fue determinada por el crecimiento del microorganismo y probablemente por las condiciones medio ambientales que limitaron el crecimiento desde el inicio. Una mayor producción de CO_2 (crecimiento) en la trofofase generó una mayor producción de esporas en la idiofase. En tal caso, la tasa de respiración Q_{CO_2-1} fue siempre mayor que Q_{CO_2-2} (serie 3). En un segundo caso, la producción de esporas fue reducida, en condiciones de muy pocos nutrientes (serie 1) y en aquellas que propiciaron un considerable retraso en la germinación (46-66 h), aún cuando al final del cultivo (tiempo de idiofase para otras condiciones), el crecimiento haya aumentado (serie 1 y 2). Por último, debemos considerar que en la serie 2, la alta humedad (con bajo contenido de nutrientes y de soporte) en donde se favoreció el inicio de la idiofase, también aumentó la esporulación a pesar del poco crecimiento (baja producción de CO_2).

7.3. Condiciones de Máxima Producción

Las tendencias en superficie para una mayor producción de penicilina fueron localizadas en la zona de bajo contenido de bagacillo (10.3-11% y 12.5%), en condiciones de alta o baja humedad (73-75.5% y 62.2%) y en medios más concentrados (1.6 a 2.8-3.2 veces la concentración usada en fermentación líquida). Es de importancia clave la localización de esta zona de máxima producción de penicilina pues ello facilitará en un futuro la optimización de nutrientes individuales.

El que se necesite bajo contenido de soporte y alto contenido de nutrientes y/o agua para obtener una alta producción de penicilina, se puede explicar a dos niveles. Desde el punto de vista interparticular se puede pensar que los cultivos con menor contenido de soporte tienen menor porosidad (menos espacios vacíos). En general, estas condiciones no son propicias para el crecimiento pues llega más rápido a una inhibición por contacto entre micelios. Es posible entonces, que dicho contacto estimule la producción de penicilina en FS, lo cual explicaría el que se obtenga una mayor producción en cultivos con menos bagacillo como en este caso y en cultivos más empacados como ha sido reportado por Barrios, *et al.*, 1993.

Una explicación intraparticular sería que en los reactores con menor contenido de soporte, cada partícula tiene una mayor cantidad de agua y nutrientes ya que estos componentes se distribuyen en un menor número de partículas. Estas condiciones iniciales probablemente permiten que haya un mejor aporte de nutrientes durante la idiofase que los mantenga en un rango de Q_{CO_2-2} adecuado para la producción. Aunque en este trabajo no fue posible determinar un valor de Q_{CO_2-2} típico para alta producción, sabemos que estos valores siempre fueron mucho más bajos que los del control o los de mala producción de su serie (entre 15 y 96 %).

Es probable, que al igual que las tasas de respiración (Q_{CO_2}), las velocidades específicas de crecimiento (μ_1 y μ_2) también disminuyan cuando hay un menor contenido de bagacillo. Si esto fuera así, bajos valores de μ_s podrían estar relacionados con la alta producción de penicilina en FS (i.e. correlación negativa). Estos resultados difieren en relación a estudios en medio líquido (cultivo continuo) en donde interesantemente se observa un comportamiento bifásico, en el cual la producción tiene primero, una correlación positiva con μ y después se vuelve constante e independiente de ésta (Pirt y Righelato, 1967). Existen, sin embargo, reportes de correlaciones negativas entre la tasa de crecimiento y la producción de metabolitos secundarios en otros microorganismos. Se dice por ello que no hay una regla general que gobierne esta relación y que los diferentes comportamientos son el resultado de diferencias en la cepa y/o el medio de cultivo empleado (Trilli, A. 1990).

CONCLUSIONES

- 1) La fase de producción de penicilina está regida por la relación entre el soporte y los otros dos componentes del medio sólido (nutrientes y agua).
- 2) El contenido de soporte en relación a los otros dos componentes de medio, tiene un efecto absoluto en la idiofase. Entre 10.3-12.5% de contenido de bagacillo en el medio de fermentación sólida permite una alta producción de penicilina.
- 3) Aunque el efecto de la humedad y de la concentración de los nutrientes en la producción de penicilina fué relativo, se observó que el uso de medios más concentrados (1.5 a 2.8 veces la concentración usada en fermentación líquida) y la alta humedad (alrededor de 70%) también favorecen la síntesis del antibiótico.
- 4) Bajas tasas de respiración y de consumo de azúcares son características en condiciones de bajo contenido de soporte y de alta producción de penicilina.
- 5) En contraste, se observó un efecto negativo sobre el crecimiento, al incrementar la humedad y disminuir los nutrientes ó el contenido de soporte.
- 6) Bajos valores de actividad de agua (0.96-0.94) aunque incrementan el tiempo de germinación favorecen el crecimiento de *P. chrysogenum* (aumentan la tasa de respiración y la producción de CO_{2total}).
- 7) La actividad de agua tiene un efecto preponderante sobre el metabolismo primario y no así sobre el secundario.

VIII. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo, K.E., Hendry, R. and Wood, B.J.B. (1982). SOLID SUBSTRATE FERMENTATIONS. *Adv. Appl. Microbiol.* **28**: 201-212.
- Arnaud, A. y Guiraud, J. P. (1985). BIOQUÍMICA MICROBIANA. En: Scriban, R. BIOTECNOLOGIA. *El Manual Moderno*. pp. 114.
- Andriaens, P., Messchaert, B., Wuyts, W. Vanderhaeghe, H. and Eyseen, H. (1975). PRESENCE OF δ (L-AMINOADYPIL)-L-CYSTEINYL-D-VALINE IN FERMENTATIONS OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **8**: 638-642.
- Barrios-González, J., Tomasini, A. and Viniestra-González, G. López, J. (1988a). PENICILLIN PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION. *Biotech. Letter.* **10** (11): 793-798.
- Barrios-González, J. Viniestra-González, Gutiérrez, M., Roussos, S. y Rimbault, M. (1988b). CERTIFICADO DE INVENCIÓN No. 17184 en trámite, México, D. F.
- Barrios-González, J., Rodríguez, G.M. and Tomasini, A. (1990). ENVIRONMENTAL AND NUTRITIONAL FACTORS CONTROLLING AFLATOXIN PRODUCTION IN CASSAVA SOLID STATE FERMENTATION. *J. Ferment. Bioeng.* **70** (5): 329-333.
- Barrios-González, J., Castillo, T. and Mejía, A. (1993a). DEVELOPMENTAL OF HIGH PENICILLIN PRODUCING STRAINS FOR SOLID STATE FERMENTATION. En: Moo-Young, M., Glick, B. R., Chisti, Y. y Bols, N. (Editors). BIOTECHNOLOGY ADVANCES. *Pergamon Press.* **11**(3):525-537.
- Barrios-González, J., González, H. and Mejía, A. (1993b). EFFECT OF PARTICLE SIZE, PACKING DENSITY AND AGITATION ON PENICILLIN PRODUCTION IN SOLID STATE FERMENTATION. En: Moo-Young, M., Glick, B. R., Chisti, Y. y Bols, N. (Editors). BIOTECHNOLOGY ADVANCES. *Pergamon Press.* **11**(3):539-547.

- Borrow, A., Jeffreys, E. G., Kessel, R. H. J., Lloyd, P. B. and Nixon I.S. (1961). THE METABOLISM OF *GIBERELLA FUJIKUROI* IN STIRRED CULTURE. *Can. J. Microb.* **7**: 227-276.
- Britz, M. L. and Demain, A. L. (1985). REGULATION OF METABOLITE SYNTHESIS. En: Dalton, H. (Editor). *COMPREHENSIVE BIOTECHNOLOGY. Volumen 1. Pergamon Press.* pp. 617-136.
- Brown, A.D., (1978). COMPATIBLE SOLUTES AND EXTREME WATER STRESS IN EUKARYOTIC MICRO-ORGANISMS. En: *Advances in Microbial Physiology*. **17**, 181-242.
- Bu'Lock, J.D. (1961). INTERMEDIARY METABOLISM AND ANTIBIOTIC SYNTHESIS. *Advances in Applied Microbiol.* **3**, 293-342.
- Bu'Lock, J.D. (1965). THE BIOSYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS. *McGraw Hill*. London.
- Bu'Lock, J.D. (1967). ESSAYS IN BIOSYNTHESIS AND MICROBIAL DEVELOPMENT. *Jhon Wiley & Sons*. London.
- Bu'Lock, J.D. (1975). SECONDARY METABOLISM IN FUNGI AND ITS RELATIONSHIP TO GROWTH AND DEVELOPMENT. En: Smith, J.E. and Berry, D.E. (Editors). THE FILAMENTOUS FUNGI. *Volumen 1. Industrial Micology. Edward Arnold*. London. pp.33-58
- Calam, C. T. (1982). FACTORS GOVERNING THE PRODUCTION OF PENICILLIN BY *PENICILLIUM CHIRYSOGENUM*. En: Krumphanz, V. Sikyta B. y Vanék Z. (Editors). OVERPRODUCTION OF MICROBIAL PRODUCTS. *Academic Press. FEMS. Symposium XIII.* pp. 89-95.
- Calam, C. T. (1979). SECONDARY METABOLISM AS AN EXPRESSION OF MICROBIAL GROWTH AND. *Folia Microbiol.* **24**. 276-285.

- Cannel, E. and Moo-Young, M. (1980) SOLID STATE FERMENTATION SYSTEM. *Process Biochem.* 15:2-7.
- Chisti, Y. (1993). PROTEIN ENHANCEMENT OF FOODS. En: Moo-Young, M., Glick, B. R., Chisti, Y. y Bols, N. (Editors). BIOTECHNOLOGY ADVANCES. *Pergamon Press.* 11(3): 467.
- Dirzo, R. (1985). METABOLITOS SECUNDARIOS EN LAS PLANTAS. *Ciencia.* 36: 137-145.
- Durán, R.J. (1994). EFECTO DE LA ADICION DE AGUA Y LACTOSA EN LA IDIOFASE DE PRODUCCION DE PENICILINA POR *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* EN FERMENTACION SOLIDA. Tesis de maestría (en proceso). Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.
- Eckert, R., Randall, D. y Augustine, D. (1988). FISIOLOGIA ANIMAL. *McCraw-Hill - Interamericana de España.* pp. 474-483.
- Elander, R. P. (1979). MUTATIONS AFFECTING ANTIBIOTIC SYNTHESIS IN FUNGI PRODUCING β -LACTAM ANTIBIOTICS. En: Seb. K & Laskins, A.I. (Editors). GENETICS OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS. *American Soc. of Microb.* Washington, D.C. pp. 21-35.
- Gordec, E.Z. and Day, L.E. (1972). EFFECT OF EXOGENOUS PENICILLIN ON PENICILLIN BIOSYNTHESIS. *Antimicrob. Ag. Chemoter.* 1: 315-321.
- Grajek, W. (1987). INFLUENCE OF WATER ACTIVITY ON THE ENZYME BIOSYNTHESIS AND ENZYME ACTIVITIES PRODUCED BY *TRICHODERMA VIRIDE* TS IN SOLID STATE FERMENTATION. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 658-662.
- Hang, Y.D. and E.E. Woodams. (1987). EFFECT OF SUBSTRATE CONTENT ON FUNGAL PRODUCTION OF CITRIC ACID IN A SOLID STATE FERMENTATION SYSTEM. *Biotechnol. Lett.* 9(3):183-186.
- Hesseltine, C.W. (1972) BIOTECHNOLOGY REPORT. SOLID STATE FERMENTATIONS. En: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. *John Wiley & Sons, Inc.* 14: 517-532.

- Hopwood, D.A. (1978). EXTRACHROMOSOMALLY DETERMINED ANTIBIOTIC PRODUCTION. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 373-392.
- Kirk and Othmer (1984). ENCYCLOPEDIA OF CHEMICAL TECHNOLOGY INTERSCIENCE: ANTIBIOTICS (β -LACTAMS). Volumen 2. New York.
- Kumar, P.K.R. and Lonsane, B.K. (1987). GIBBERELIC ACID BY SOLID STATE FERMENTATION: CONSISTENT AND IMPROVED YIELDS. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 267-271.
- Lara, F., Mateos, R.C., Vazquez, G. and Sánchez, S. (1982). INDUCTION OF PENICILLIN BIOSYNTHESIS BY L-GLUTAMATE IN *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **105** (1): 172-178.
- Leveau, J.Y. y Bouix, M. (1985). CINETICAS MICROBIANAS. En: Scriban, R. (Editor). BIOTECNOLOGIA. *El Manual Moderno*. México, D.F. pp. 669.
- Luengo, J.M., Revilla, G., López, M.J., Villanueva, J.R. and Martín, J.F. (1980). INHIBITION AND REPRESSION OF HOMOCITRATE SYNTHASA BY LYSINE IN *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *J. Bacteriol.* **144** (3): 869-876.
- Luxton, M. (1972). STUDIES ON THE ORBATID MITES OF A DANISH BEECH WOOD SOIL. *Pedobiologia.* **12** 434-463.
- Martín, J.F. and Demain, A.L. (1978). FUNGAL DEVELOPMENT AND METABOLITE FORMATION. En: Smith, J.E. y D. R. Berry. THE FILAMENTOUS FUNGI: DEVELOPMENT MYCOLOGY. Volumen 3.
- Martín, J.F. and Demain, A.L. (1980). CONTROL OF ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS. *Microbiol. Rev.* **44** (2): 230-251.

- Mitchell, D.A., Doelle, H.W. and Greenfield, P.F. (1988). IMPROVEMENT OF GROWTH OF *RHIZOPUS OLIGOSPORUS* ON A MODEL SOLID SUBSTRATE. *Biotechnol. Lett.* **10** (7):497-502.
- Miller, G.L.(1959) USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGARS. *Anal. Chem.*, **31**: 426-428.
- Mudget, R.E. (1986). SOLID STATE FERMENTATIONS. En: A.L. Demain y N.A. Solomon (Editors) MANUAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. *American Society for Microbiology*. Washington, D.C. pp. 66-83.
- Nishio, N., Tai, K. and Nagai, S. (1979) HIDROLASE PRODUCTION BY *ASPERGILLUS NIGER* IN SOLID STATE CULTIVATION. *Eur. J. Appl. Microbial. Biotech.* **27**: 498-503.
- Ohno, A. and Shoda, M.(1992). PRODUCTION OF ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC, ITURIN IN A SOLID STATE FERMENTATION BY *BACILLUS SUBTILIS* N822 USING WHEAT BRAN AS A SUBSTRATE. *Biotech. Lett.* **14** (9):817-822.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniegra González, G. and Raimbault, M. (1988a). SOLID-STATE CULTURE OF *ASPERGILLUS NIGER* ON SUPPORT. *J. Ferment. Technol.* **66** (1): 57-62.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S. and Viniegra-González, G. (1988b). WATER AND WATER ACTIVITY IN THE SOLID STATE FERMENTATION CASSAVA STARCH BY *ASPERGILLUS NIGER*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 498-503.
- Pandey, A. (1992). RECENT PROCESS DEVELOPMENTS IN SOLID-STATE FERMENTATION. *Process Biochem.* **27**: 109-117.
- Pirt, S. J. and Righelato, R.J. (1967). EFFECT OF GROWTH RATE ON THE SYNTHESIS OF PENICILLIN BY *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* IN BATCH AND CHEMOSTAT CULTURE. *Appl. Microbiol.* **15**: 1284-1290.

- Queener, S. and Swartz, R. (1979). PENICILLINS: BIOSYNTHETIC AND SEMISYNTHETIC. En: Rose, A. H. ECONOMIC MICROBIOLOGY. SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. *Academic Press*. 3: 35-122.
- Raimbault, M. (1981). FERMENTATION EN MILEU SOLIDE CROISSANCE DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX SUR SUBSTRAT AMYLACÉ. Tesis de Doctorado. U.P.S. Toulouse. 291 pp.
- Raimbault, M., Rehva, S., Piña, F. and Villalobos, P. (1985). PROTEIN ENRICHMENT OF CASSAVA BY SOLID SUBSTRATE FERMENTATION USING MOLDS ISLOATED FROM TRADITIONAL FOODS. *J. Ferment. Technol.*, 63 (4): 395-399.
- Revilla, G. López Nieto M.J., Luengo, J.M. and Martín, J.F. (1984). CARBON CATABOLITE REPRESSION OF PENICILLIN BIOSYNTHESIS BY *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*. *J. Antibiot.* 37: 27-35.
- Rodríguez, J.A., Bechsted, W., Echevarria, J., Sierra, N., Delgado, G., Daniel, A. and Martínez, O. (1986). OPTIMIZATION OF SOLID STATE FERMENTATION OF CITRUS DRIED PEEL BY *ASPERGILLUS NIGER* IN A PACKED BED COLUMN. *Acta Biotech.* 6 (3):253-258. *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*.
- Rose, A. (1979). PRODUCTION AND INDUSTRIAL IMPORTANCE OF SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. En: Rose, A. H. ECONOMIC MICROBIOLOGY. SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. *Academic Press*. 3: 2-33.
- Roussos, S. (1985) CROISSANCE DE *TRICHODERMA HARZIANUM* PAR FERMENTATION EN MILEU SOLIDE: PHYSIOLOGIE, SPORULTATION ET PRODUCTION DE CELLULASES. These d'Etat. Université d'Aix. Marseille I. 161 pp.
- Sánchez, S., Flores, M. y Mateos, R. (1984). ASPECTOS BIOQUIMICOS Y REGULATORIOS DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA. En: Martuscelli, J. Palacios de la Lama, R. y A. G. Soberón A. G. (Editores). CAMINOS EN LA BIOLOGIA FUNDAMENTAL. *U.N.A.M.*

- Sánchez, S., Paniagua, L., Mateos, R., Lara, F. and Mora J. (1980). NITROGEN REGULATION OF PENICILLIN G BIOSYNTHESIS *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* NRRL-1951. En: Vézina, C. and Singh K. (Editors). ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY. Pergamon Press. Toronto, Canada. Volumen 3. 147-154.
- Saucedo-Castañeda. G. (1991). CONTROLE DU METABOLISM DE *SCHWANNIOMYCES CASTELII* CULTIVÉ SUR SUPPORT SÓLIDE. Tesis de Doctorado. Université Montpellier. 68 pp.
- Smith, J.E. and Berry, D.E. (1974). DIFFERENTIATION SECONDARY METABOLISM AND INDUSTRIAL MYCOLOGY. AN INTRODUCTION TO BIOCHEMISTRY OF FUNGAL DEVELOPMENTS. Academic Press. Gran Bretaña.
- Somerson, N.L., Demain, A.L. and Nunheimer, T.D. (1961). REVERSAL OF LYSINE INHIBITION OF PENICILLIN PRODUCTION BY α -AMINOADIPIC ACID. *Arch. Biochem.* 93: 238-241.
- Sylvester, J.C. and Coghill, R.D. (1954). En: Underkofler, L.A. y IMCcky R.J. (Editors). INDUSTRIAL FERMENTATIONS. Chemical Publishing. New York. Volumen 2. 219-263 pp.
- The Merck Index. (1989). Merck & Co., Inc. 11th Edition. Rahway, New Jersey, U.S.A.
- Trejo, M.R. (1986). PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS POR FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Trilli, A. (1990). KINETICS OF SECONDARY METABOLITE PRODUCTION En: Poole, R., Bazin, M. y Keevil, W.(Editors). MICROBIAL GROWTH DYNAMICS. Irl Press. Volumen 28. London.

- Viniegra-González, G. (1989).** PERSPECTIVES AND LIMITATIONS OF SOLID FERMENTATION IN MEXICO. En: **M. Rimbault (Editor).** SOLID STATE FERMENTATION IN BIOCONVERSION OF AGROINDUSTRIAL RAW MATERIALS. *ORSTOM*, Montpellier, Francia. pp. 67-72.
- Viniegra-González, G. (1993).** FOREWORD. En: **Moo-Young, M., Glick, B. R, Chisti, Y. y Bols, N. (Editors).** BIOTECHNOLOGY ADVANCES. *Pergamon Press*. 11(3).
- Wang, D., Cooney, Ch.L., Demain, A.L., Dunnill, T. and Humphrey, A.E. (1979).** FERMENTATION AND ENZYME TECHNOLOGY. *John Wiley & Sons, Inc.* New York. pp. 26-36.
- Wang, H., (1993).** ANALYTICAL ASPECTS OF SOLID SUBSTRATE FERMENTATIONS. En: **Moo-Young, M., Glick, B. R, Chisti, Y. y Bols, N. (Editors).** BIOTECHNOLOGY ADVANCES. *Pergamon Press*. 11(3):663.