



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

400282



61060

**"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RETORREGULACION DE LA
BIOSINTESIS DE PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA POR CEPAS
DE ALTA Y BAJA EFICIENCIA RELATIVA (PRODUCCION EN
SOLIDO / PRODUCCION EN LIQUIDO) DE**

Penicillium chrysogenum"

201165/95
Ej. 1

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:

MARIA VERONICA FLORES ARCOS



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

A la memoria de mi padre, José Luis Flores, quien siempre ha estado conmigo.

A mi madre, Genoveva Arcos, por todo lo que significa para mí.

A mis hermanas, Andrea, Margarita y Noemí, por ser junto con mis padres la base de mi ser.

Al nuevo rayito de luz, Marisol, y a los que vendrán.

A toda mi familia tanto paterna como materna.

A mi nueva familia Bernal.

A mis amigos y vecinos.

A mi esposo, Jorge Gabriel Bernal López, por ser mi esencia.

A mis compañeros y profesores de la ENEP-I, por los inolvidables momentos compartidos durante la carrera.

A mis por siempre recordados compañeros del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biotecnología del IIBM-UNAM. Rosalba, Bertha, Norma, Consuelo, Ricardo y Alejandro.

A mis compañeros del Laboratorio de Metabolitos Secundarios de la UAM-Iztapalapa, por su invaluable apoyo, y de manera muy especial a Claudia González Perea, por su incondicional asistencia técnica y anímica durante la elaboración de este trabajo.

La realización de este trabajo se llevó al cabo en el Laboratorio de Metabolitos Secundarios 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 Alvarez, a quienes agradezco su asesoría.

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

INDICE GENERAL.	i
INDICE DE TABLAS.	iii
INDICE DE FIGURAS.	iv
I.- INTRODUCCION.	1
II.- GENERALIDADES.	4
II.1.- Metabolismo Secundario.	4
II.2.- Penicilina.	6
II.2.1.- Biosíntesis.	7
II.3.- Producción de Penicilina.	9
II.3.1.- Por Fermentación Líquida.	9
II.3.2.- Por Fermentación Sólida	12
II.3.3.- Comparación entre Fermentación Sólida y Líquida.	16
III.- ANTECEDENTES.	20
III.1.- Regulación.	20
III 1.1.- Regulación por Nitrógeno.	22
III.1.1.1.- En fermentación líquida.	22
III.1.1.2.- En fermentación sólida.	23
III.1.2.- Regulación por Glucosa.	24
III.1.2.1.- En fermentación líquida.	24
III.1.2.2.- En fermentación sólida.	25
III.1.3.- Regulación por Lisina.	26
III.1.3.1.- En fermentación líquida.	26
III.1.4.- Regulación por Penicilina.	27
III.1.4.1.- En fermentación líquida.	27
IV.- OBJETIVOS.	29
V.- MATERIAL Y METODOS.	30
V.1.- Microorganismos y conservación.	30
V.2.- Medios de Cultivo.	30
Medio para Bioensayo.	
Medio de esporulación para <i>B. subtilis</i> .	
Medio de esporulación para <i>P. chrysogenum</i> .	
Medio para fermentación sólida.	
Medio de producción de composición definida.	
V.3.- Obtención de la suspensión de esporas.	32

V.4.- Fermentación sólida.	33
a) Tratamiento del soporte.	
b) Preparación del medio de cultivo.	
c) Condiciones del cultivo.	
V.5.- Bioensayo.	34
V.6.- Producción en cilindros de agar.	34
V.7.- Determinación de la posible transacilación de penicilina V a G, ó de G a V, en fermentación sólida.	35
V.7.1.- Obtención de mutantes no productoras de penicilina.	35
V.7.2.- Fermentación sólida con mutantes no productoras de penicilina.	35
V.8.- Métodos analíticos.	36
V.8.1.- Cuantificación e identificación de las penicilinas en cilindros de agar y muestras de fermentación sólida.	36
a) Extracción de Penicilina y Azúcares.	
b) Cuantificación e identificación de penicilina.	
V.2.- Cuantificación de azúcares.	36
V.3.- Cuantificación de Biomasa.	37
V.4.- Determinación de humedad.	37
V.5.- Determinación de pH.	37
V.6.- Cuantificación de la esporulación.	37
VI.- RESULTADOS.	38
VI.1.- Efecto de la penicilina exógena sobre la germinación y producción de penicilina G en cilindros de agar.	38
VI.1.1.- Efecto sobre germinación.	38
VI.1.2.- Efecto sobre la producción.	39
VI.2.- Efecto de la penicilina exógena en la producción de la penicilina G en fermentación sólida.	40
VI.2.1.- Cepa P2-2 (prototipo de bajo ps/pl).	40
VI.2.2.- Cepa P2-4 (prototipo de alto ps/pl).	47
VI.3.- Determinación de la posible transacilación de penicilina V a G, ó de G a V.	51
VI.3.1.- Obtención de mutantes.	51
VI.3.2.- Determinación de la presencia de transacilación.	51
VII.- DISCUSION.	53
VII.1.- Efecto de la penicilina V sobre la biosíntesis de penicilina G en cilindros de agar con la cepa <i>P. chrysogenum</i> P2-2.	53
VII.2.- Efecto de la penicilina exógena sobre la biosíntesis de penicilina G en FS por la cepa <i>P. chrysogenum</i> P2-2.	55
VII.3.- Efecto de la penicilina exógena sobre la biosíntesis de la penicilina G en FS con la cepa <i>P. chrysogenum</i> P2-4.	55
VIII.- CONCLUSIONES.	60
IX.- NOMENCLATURA.	61
X.- BIBLIOGRAFIA.	62

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

TABLA .

I.- Producción de penicilina G en cilindros de agar inoculados con la cepa <i>P. chrysogenum</i> P2-2, conteniendo diferentes concentraciones de penicilina exógena.	39
II.- Efecto de la penicilina V sobre la producción de penicilina G en fermentación sólida con <i>P. chrysogenum</i> P2-2.	40
III.- Efecto de la penicilina añadida sobre la producción de penicilina G en fermentación sólida por <i>P. chrysogenum</i> P2-4.	47

I N D I C E D E F I G U R A S .

FIGURA.

1.- Formación de metabolitos secundarios durante la idiofase, la cual sigue de la trofofase.	5
2.- Rutas biosintéticas de L-lisina y Penicilina G en hongos (Ontiveros, 1993; Barrios, 1994).	8
3.- Producción de penicilina por fermentación líquida (Queneer y Swartz, 1979).	10
4.- Perfiles de crecimiento del clon P2-2 en cilindros de agar conteniendo diferentes concentraciones de penicilina V.	38
5.- Perfil de degradación de penicilina V en F.S.	41
6.- Comportamiento del pH en presencia de penicilina V en F.S. con el clon P2-2.	41
7.- Efecto de la penicilina V (0, 1000, 2500 y 5000 µg/ml) en el consumo de O ₂ (A), velocidad de producción de CO ₂ (B) y producción de CO ₂ total por columna (C) durante el crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> P2-2 en F.S.	43
8.- Efecto de la penicilina exógena (V), en la germinación y crecimiento del clon P2-2 en F.S.	45
9.- Perfiles del consumo de azúcares por el clon P2-2 en presencia de penicilina V en F.S.	45
10.- Evolución de la humedad en presencia de penicilina V en F.S. con el clon P2-2.	46
11.- Comportamiento del pH en presencia de penicilina V con el clon P2-4 en fermentación sólida.	48
12.- Efecto de la presencia de penicilina V (0,5000, 7500 y 10000µg/ml) en el consumo de O ₂ (A), velocidad de formación de CO ₂ (B) y producción total por columna (C) a través del crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> P2-4.	49

- 13.- Evolución de la humedad en F.S. por el clon P2-4 en presencia de penicilina V. 50
- 14.- Cinéticas del consumo de azúcares por el clon P2-4 ante diferentes concentraciones de penicilina V en F.S. 50
- 15.- Biosíntesis de penicilina G por F.S. con las cepas mutantes en presencia de penicilina V y precursor de la penicilina G. 52

I. - I N T R O D U C C I O N .

La fermentación en estado sólido (F.S.) es definida como el crecimiento de microorganismos, comunmente hongos, en materiales sólidos (Jermini and Demain, 1989).

Tradicionalmente y por muchos años, su aplicación ha tenido lugar en el Oriente, jugando un papel importante en los eventos religiosos y sabores de los alimentos fermentados (Cannel and Moo-Young, 1980). La elaboración de pan y quesos fermentados, la preservación de una gran variedad de alimentos de origen animal y la producción de ácido gálico y vinagre, han constituido sistemas de fermentación sólida que han existido por cientos y miles de años (Aidoo, *et.al*, 1982).

Actualmente, 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 alimenticio, farmacéutico y químico (Domínguez, 1995)

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 resultan ser muy parecidas al hábitat de muchos microorganismos de interés, como los hongos.

Ante tales posibilidades de explotación de la fermentación sólida, en el Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa, se integró un grupo de investigadores franco-mexicano que desarrolló procesos de fermentación sólida. Obteniéndose a través de ésta metabolitos primarios como: celulasas (Roussos, 1985), pectinasas (Trejo, 1986) y metabolitos secundarios como: aflatoxinas (Barrios-González, *et.al.*, 1986).

Recientemente este mismo grupo de investigadores desarrolló un nuevo sistema de fermentación sólida que incluye el uso de soportes inertes, los cuales son impregandos con un medio líquido. Dicho sistema fué patentado por Barrios-González, *et.al.*, (1988b) y caracterizado por Oriol, *et.al.*, (1988a).

En base a estos primeros estudios, Barrios-González y colaboradores evaluaron la posibilidad de utilizar este sistema para producir un metabolito secundario de importancia comercial, pensando que la penicilina es un modelo muy apropiado como un metabolito secundario y debido a su importancia económica y a lo bien estudiado que esta su fisiología, bioquímica y genética, decidieron estudiar la síntesis de penicilina por FS.

De esta manera Barrios-González, *et.al.*, (1988b) encontraron en estudios realizados sobre la producción de penicilina en fermentación sólida, que la obtención del antibiótico, utilizando bagacillo de caña impregnado de medio líquido, se realizó bajo condiciones no estériles, sin problemas de contaminación ó de degradación del producto. Observando además que la producción de penicilina por fermentación sólida comparada con la fermentación líquida, es más alta, lográndose en menor tiempo.

Esto junto con los bajos costos de energía del proceso (esterilización, aereación y agitación), y la solución a problemas ocasionados por el acúmulo de desechos agroindustriales (Jermini, 1989), sugirieron un importante potencial. Sin embargo la explotación de este potencial está limitado por la carencia de conocimientos sobre la fisiología de *Penicillium chrysogenum*, en fermentación sólida.

Los trabajos realizados por Barrios-González, *et.al.*, (1993) señalan que *Penicillium chrysogenum* presenta una fisiología en F.S. diferente a la observada en F.L. ya que se produce más penicilina en F.S., usando medios más concentrados. Esto puede deberse a que los mecanismos regulatorios conocidos en fermentación líquida no operan de la misma forma en fermentación sólida. Es también probable que los umbrales de regulación en medio sólido sean diferentes en cada cepa, y que esto contribuya a que ciertas cepas producen más eficientemente en F.S. Por lo que en este trabajo se pretende observar si el efecto de retroregulación también esta presente en este sistema.

II.- G E N E R A L I D A D E S .

II.1.- Metabolismo Secundario.

El metabolismo secundario procede de rutas que incluyen enzimas que no son utilizadas para el crecimiento, e inicia después de que el crecimiento ha cesado. Constituyendo un amplio grupo de productos naturales producidos por ciertos grupos taxonómicos, que son capaces de sintetizar tipos especiales de metabolitos por el uso de alguna enzima utilizada en el metabolismo primario o sintetisas especiales producidas bajo ciertas condiciones nutricionales (Martin and Demain, *et.al.*, 1980). Presentando una estructura química característica (Bennet, *et.al.*, 1992.). Los metabolitos secundarios que han tenido mayor impacto se encuentran en la medicina, en la industria y la agricultura, actuando como: antibióticos, toxinas, drogas anticarcinógenas, pigmentos, promotores del crecimiento, alucinógenos, e inmunodepresores, entre otros (Rose, 1979).

Una característica del metabolismo secundario es que los metabolitos no son producidos durante la fase de rápido crecimiento (trofofase), pero son formados durante un estado subsecuente de producción (idiofase), como se muestra en la Figura 1, de ahí que los productos sintetizados durante esta fase se les refiera como idiolitos.

Al inicio de la trofofase muchos microorganismos son sensibles a su propia biosíntesis. Y es sólo durante la idiofase cuando ellos desarrollan una resistencia fisiológica al antibiótico producido (Wang, *et.al.*, 1979).

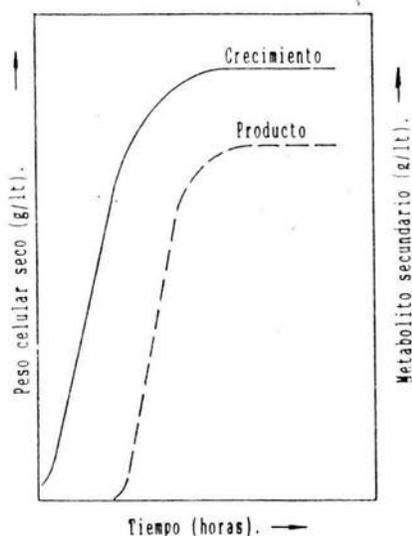


Fig 1.- Formación de metabolitos secundarios durante la idiofase, la cual sigue de la trofofase, (Wang, 1979).

Desde la perspectiva del ser humano, las ventajas de tales compuestos como la penicilina, griseofulvina y ciclosporina origina el interés por conocer las rutas mediante las cuales se puede mejorar la producción de dichos compuestos. De ahí que se considere esencial conocer los siguientes puntos con respecto al metabolito de interés (Bennett, *et.al.*, 1992):

- 1.- El precursor primario del metabolito del cual se deriva.
- 2.- Los intermediarios a lo largo de la ruta.
- 3.- La genética y enzimología de cada reacción.
- 4.- El proceso regulatorio.

Los antibióticos son producidos por hongos y bacterias, siendo los productores bacterianos más importantes, los actinomicetos (Freeman, *et.al.*, 1986). Los hongos son productores prolíferos de idiolitos. El precursor más importante del metabolismo secundario es el acetyl-CoA, dando lugar a policétidos, terpenos, y esteroides . (Bennet, *et.al.*, 1992).

La regulación de la síntesis de metabolitos secundarios es similar al metabolismo primario, incluyendo la inducción, retroregulación y represión catabólica. Es decir que el metabolismo secundario puede ser gobernado por algún regulador global el cual opera para tales funciones de crecimiento y efectos específicos regulatorios dentro de las rutas individuales (Barrios-González, 1994).

II.2.- Penicilina.

La penicilina y sus derivados son antibacterianos con pocos efectos laterales. Actualmente, la penicilina y los demás antibióticos que la siguieron se utilizan para tratar más de 100 padecimientos humanos, y la demanda continúa incrementando para ser utilizada en enfermedades del ganado.

Más aún, el granjero utiliza sustancias que contienen antibióticos para mejorar la calidad de sus suelos y obtener un mayor rendimiento en las cosecha y mantener su ganado en óptimas condiciones.

La penicilina posee propiedades bactericidas sobre microorganismos Gram positivos y algunos Gram negativos, propiedad que consiste en bloquear la unión entre los aminoácidos D-alanina y L-alanina del peptido glucano de la pared celular, lo que provoca una estructura sensible a los cambios osmóticos. Algunos microorganismos presentan una resistencia natural a la acción de la penicilina, resistencia que resulta de la síntesis de β -lactamas, enzimas que hidrolizan el anillo β -lactámico (Sánchez, *et.al.*, 1983).

II.2.1.- Biosíntesis.

La penicilina es producto de una ruta biosintética que está relacionada con la biosíntesis de los aminoácidos valina, cisteína y ácido α -aminoadípico (Fig 2) , iniciándose esta con la formación del dipéptido δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteína (AC), siguiendo una serie de pasos que finalizan cuando la cadena lateral (ácido α -aminoadípico) de la isopenicilina N es intercambiada por ácido fenilacético (previamente activado en la forma de fenil acetil CoA) dando origen a la penicilina G. Esta reacción es catalizada por la enzima aciltransferasa.

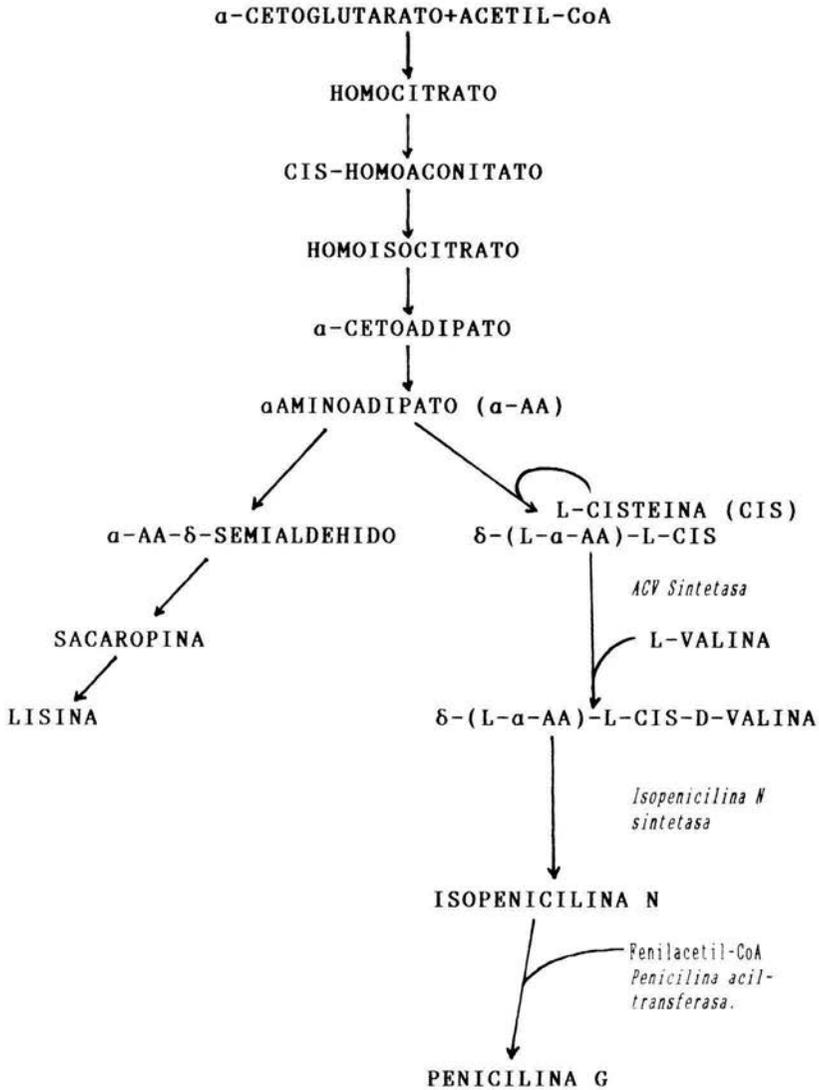


Figura 2.- Rutas biosintéticas de L-lisina y penicilina G en hongos (Ontiveros,1993; Barrios, 1994).

Cuando las penicilinas se producen en un caldo de fermentación sin suplementar con precursores de la cadena lateral reciben la denominación de penicilinas naturales. Pero si al medio de producción se le añade algún precursor de la cadena lateral, las penicilinas son llamadas semisintéticas.

Dada la relativa inespecificidad del complejo enzimático biosintético por la cadena lateral, muchas son las sustancias que pueden actuar como precursores de dicha cadena lateral, originando así una gran variedad de β -lactamas, considerando que las características del antibiótico que se va a obtener están en función del tipo de cadena lateral que lleve.

Las cadenas laterales son esenciales para que la penicilina ejerza su acción y pueda introducirse a la célula tanto biológica como químicamente.

II.3.- Producción de Penicilina.

II.3.1.- Por Fermentación Líquida.

Tradicionalmente la penicilina se ha producido por fermentación líquida (FL) (Fig 3.) en donde las esporas de *P. chrysogenum* se utilizan para inocular el medio "Primer Semilla", el cual ha sido diseñado para promover un rápido crecimiento carente de esporulación y producción de antibiótico.

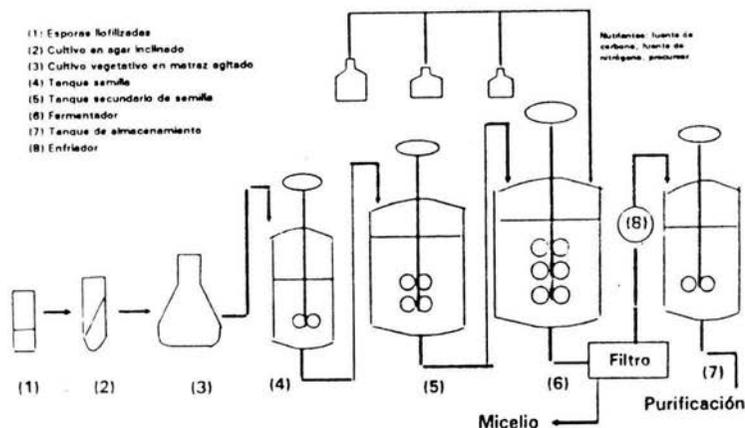


Fig 3.- Producción de penicilina por fermentación líquida, (Queener y Swartz, 1979).

Una cantidad específica de esporas por unidad de volumen debe ser inoculada, esta etapa se lleva a cabo en matraces Elenmeyer que son colocados en un cuarto con temperatura y humedad óptimas, sobre una unidad de agitación rotatoria. Después de 2-3 días de incubación en el agitador, se transfiere el contenido de los matraces a un tanque de "Segundo Semilla". El medio de esta etapa, también es diseñado para promover un rápido crecimiento y nula esporulación. El crecimiento es cuidadosamente monitoreado para asegurar que su transferencia sea en el mejor estado metabólico y tenga un óptimo desempeño en la etapa productiva final.

Los controles que se llevan del crecimiento y actividad metabólica son viscosidad, pH y velocidad de crecimiento, observando también el posible crecimiento de microorganismos indeseables.

El fermentador de producción es cargado con un medio específico. El contenido del tanque semilla es transferido al fermentador de producción. El ciclo completo dura de 8 a 9 días, de acuerdo a la productividad del lote, durante el ciclo se hace una adición continua de nutrientes en cantidades tales que suplan los requerimientos de carbohidratos, nitrógeno y precursor. También se adiciona aceite vegetal para el control de la viscosidad del caldo, al mismo tiempo que auxilia como agente antiespumante.

Durante el ciclo completo de la fermentación, se toman muestras a intervalos de tiempo determinados, los cuales son analizados y evaluados para mantener la operación bajo control, realizándose las siguientes pruebas: pH, viscosidad y volúmen de células, potencia y residuales de azúcares, nitrógeno y precursor, y esterilidad (por cultivo y exámen al microscopio). (Cuevas, *et.al.*, 1990).

Los medios utilizados están compuestos por sales minerales, un precursor de la cadena lateral, una fuente de nitrógeno (licor de maíz) y la presencia de concentraciones limitantes de glucosa. A valores de pH que oscilan entre 5.5 6.0, *P. chrysogenum* puede producir concentraciones de antibiótico que pueden variar desde 2 unidades/ml hasta más de 50 000, dependiendo de la cepa que se trabaje. La temperatura óptima es entre 24°C y 26°C , siendo muy importante una adecuada transferencia de oxígeno.

I.3.2.- Por Fermentación Sólida.

La fermentación en estado sólido (FS) a la cual se le define como el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en la ausencia de agua libre, (Pandey, *et.al.*, 1992) es un viejo método que ha sido revalorizado y modernizado recientemente para producir enzimas, proteínas (Aidoo, *et. al.*, 1982), y micotoxinas las cuales han sido producidas en altas concentraciones (Hasseltine, *et.al.*, 1972), al igual que el ácido giberélico, (Kumar, *et.al.*, 1987).

Los datos presentados por Jermini y Demain en 1979, sugieren la posibilidad de obtener concentraciones significativas de cefalosporinas (incluyendo cefamicinas) por FS.

Más tarde esta técnica fué utilizada en el desarrollo de un proceso para enriquecimiento de remolacha de almidón por F.S., siendo aplicada también para producir: celulasas (Roussos, *et.al.*, 1985), pectinasas (Trejo, *et.al.*, 1985), y aflatoxinas (Barrios-González, *et.al.*, 1986).

En estudios pasados se exploraron diferentes sistemas de fermentación sólida, específicamente el uso de soportes inertes impregnados con medio líquido, por lo que Barrios-González, *et al.*, en 1988, se interesaron por evaluar la posibilidad de producir penicilina a través de este sistema de fermentación y determinar sus posibles ventajas, si es que las hubiera con respecto a la fermentación líquida.

Montaron fermentaciones líquidas y sólidas simultáneamente con la cepa *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 Wis. 54-1255. Determinaron la concentración de nutrientes adecuada para el sistema de fermentación sólida, que fué el duplicado de la concentración utilizada para FL. También encontraron que al inocular con esporas se lograba una producción de 6 U/ml. mientras que al inocular con micelio fué nula tal producción. Ya determinadas estas variables realizaron simultáneamente las fermentaciones sólidas y líquidas obteniendo una producción por FS 17 veces más alta que la obtenida por FL, alcanzándose ésta, en una tercera parte del tiempo requerido en fermentación líquida. Lo que les condujo a proponer a la FS como un sistema con un gran potencial para la producción de penicilina y muy probablemente otros antibióticos.

El sistema empleado en la fermentación sólida es un soporte "inerte" (bagacillo de caña) impregnado de medio líquido.

Los productos de la fermentación pueden ser recuperados por extracción con solventes o por prensado del bagacillo. Lo que permite hacer una comparación entre la fermentación líquida y sólida. Derivándose varias diferencias entre estos dos cultivos:

El proceso de fermentación sólida no es llevado en condiciones de esterilidad. Así mismo este proceso permite las condiciones ambientales idóneas ecológicamente para el desarrollo del hongo.

En un estudio realizado por Barrios-González, *et. al.*, (1993A), se trató de determinar si el mejor comportamiento observado en la producción de penicilina en FS fue debido al sistema de cultivo (FS) o a características intrínsecas de la cepa empleada.

Para ello determinaron la producción y productividad relativa de varias cepas de *P. chrysogenum* (AS-P-78, P-2 ATCC 48271, R-8, V-12, y Wisconsin ATCC 54-1255). A partir de estas cepas aislaron clones de cada una y les evaluaron sus producciones y sus productividades relativas. Caracterizando los clones de mayor productividad relativa en cuanto a sus cinéticas de esporulación, crecimiento, pH, producción, humedad, utilización de azúcares reductores, y respiración.

Las cepas presentaron diferentes producciones relativas (desde 1.4 a 2.5). Encontrando un rango muy amplio de producciones relativas (0.6 a 16.7) dentro de los clones. Por otro lado las cepas de más alta producción en FL lo fueron también en FS.

Lo que indica que el potencial de producción de una cepa es un factor importante en su nivel de producción en FS. Más aún, los clones hiperproductores de penicilina (9,500 a 10,500µg de penicilina G/gmsf.) generados de cepas de alta producción (en FL) mostraron una eficiencia relativa más baja, sugiriendo que las cepas de producción más alta tienden a expresar menos eficientemente su potencial en FS.

En este estudio se obtuvieron varios clones sobreproductores particularmente situados para FS. Incrementando la producción de 500 a 600 % en este sistema de cultivo.

Finalmente concluyeron que las diferentes cepas de *P. chrysogenum* tienen diferente capacidad para producir penicilina en fermentación sólida en relación a la que presentan en fermentación líquida. Es decir que algunas cepas expresan mejor que otras su potencial de producción (indicado por su producción en líquido). Por lo tanto el potencial de producción de una cepa es un factor importante en la cantidad de penicilina que se puede producir en fermentación sólida. Además las cepas menos desarrolladas para fermentación líquida presentan una mayor productividad relativa en medio sólido. De la misma manera las cepas de mayor producción (desarrolladas para fermentación líquida), tienen una tendencia a no expresar todo su potencial de producción en fermentación sólida.

Sin embargo ciertos clones derivados de ellos aún mantienen o han recuperado ciertas características que les permiten desarrollarse bien en fermentación sólida.

Por otro lado también se estudió el posible efecto del tamaño de partícula, densidad de empaque y agitación en la producción de penicilina por FS (Barrios-González, *et.al.*, 1993B). Encontrando que el uso de una partícula más grande (14 mm.) incrementa la producción de penicilina en FS en un 37%, lo que quizá se deba a que la concentración de azúcares es más alta conforme el tamaño de partícula. Mientras que la densidad de empaque al ser reducida aumentó un 20% la producción, por su parte la agitación al parecer no manifestó ningún efecto negativo en la producción de la penicilina.

II.3.3.- Comparación entre Fermentación Sólida y Líquida.

La fermentación sólida es un proceso que se maneja por lote, y gran parte de la investigación más reciente se realiza como una posible alternativa sobre los cultivos sumergidos convencionales. Encontrando las siguientes ventajas de la fermentación sólida con respecto a la fermentación líquida (Aidoo, *et.al.*, 1982, Viniegra-González, *et.al.*, 1993).

- El medio es relativamente simple.
- El espacio requerido por el equipo de fermentación es relativamente pequeño.
- El inóculo de esporas es adicionado directamente a la fermentación.
- Las condiciones bajo las que crece el hongo son muy semejantes a su hábitat natural.
- La aireación es fácilmente obtenida debido a los espacios interparticulares del sustrato, Por lo que el oxígeno no es un factor limitante significativo, debido a que es completamente soluble en el aire, el cual es fluído en la FS. Por lo tanto este sistema tiene menores consumos de energía que la FL.
- Según las características del producto deseado, en ocasiones puede ser fácilmente extraído por algún solvente puesto directamente.

- El sistema de fermentación contiene menos agua que la FL.

- Los hongos pueden utilizar y transformar azúcares impregnados en materiales sólidos a bajas concentraciones y producir elevadas concentraciones de productos. Por ello los costos de recuperación pueden ser reducidos .

Las ventajas, y las características generales de la fermentación sólida, abren las puertas para la aplicación de la fermentación en estado sólido en la producción industrial de bioquímicos y otros productos. Aún cuando también existen algunas limitaciones por parte de la FS, las cuales Hesseltine (1992) enuncia de la siguiente manera.

- El tipo de organismos que pudiera crecer bajo este sistema, es limitado, encontrando que los hongos son los más usuales, pueden crecer algunas levaduras, y algunas bacterias y estreptomicetos.

- La temperatura empieza a ser un problema cuando se manejan grandes cantidades.

- El muestreo puede resultar un tanto difícil.

- El sustrato puede requerir de algún pretratamiento térmico, rompimiento o quebrado antes de ser utilizado.

- Uno de los mayores problemas es la dificultad de la estimación de la biomasa micelial. En varios estudios (Arima *et.al.*, 1967) se han utilizado métodos químicos para la estimación de la biomasa micelial en fermentación en estado sólido por la medición de los niveles de glucosamina (Quitina).

- El control del proceso se dificulta en una FS debido a la calidad heterogénea del material de fermentación, además de que el mezclado en la mayoría de las ocasiones es nulo o mínimo.

- La recuperación del producto puede ser difícil, dadas las características de este..

- Aún existe poca experiencia sobre el uso de la FS en producciones a gran escala. Únicamente se utiliza en Japón para la producción industrial de alimentos fermentados. (Viniestra-González, *et. al.*,1989).

Por su parte la FL también presenta algunas desventajas.

- La solubilidad del oxígeno en agua es muy baja, por lo cual se hace necesario utilizar maquinaria compleja y de elevado costo para los procesos de agitación y aireación forzada con un elevado consumo de energía.

- El medio de FL contiene una gran cantidad de agua que tendrá que ser separada de las pequeñas cantidades de productos microbianos, los cuales por lo general se encuentran en concentraciones menores al 5%.

- El agua residual debe ser tratada en ocasiones por la misma planta de fermentación.

- La cantidad de agua residual que se produce por FL, es considerablemente más elevada que la que se produce por FS.

- La contaminación por bacterias y levaduras debe ser evitada mediante técnicas de esterilización del equipo, del aire y del medio, ya que muchos metabolitos importantes como los antibióticos, se producen mediante hongos que crecen lentamente en medios líquidos ricos, que pueden ser utilizados rápidamente por microorganismos contaminantes.

- Las concentraciones de producto y precursores son muy bajas, lo cual provoca procesos de recuperación de elevado costo y son un factor clave en la economía del proceso (Viniegra-González, *et al.*, 1989).

III.- ANTECEDENTES.

III.1.- Regulación.

Varios mecanismos parecen estar involucrados en el control de la iniciación de la biosíntesis de antibióticos. Un modelo propone que una molécula pequeña actúa como correpresor o inhibidor, reprimiendo la formación o inhibición de la actividad de las sintetasas. Por lo tanto el hipotético correpresor o inhibidor debe de agotarse para que la síntesis del antibiótico pueda ocurrir. Un segundo modelo propone la síntesis de un activador o inductor de las enzimas por el cultivo para poder iniciar la síntesis del antibiótico, (Barrios-González, *et.al.*,1994).

La modificación de los mecanismos de regulación son un procedimiento para obtener cepas sobreproductoras. Y esto hace posible diseñar caminos para seleccionar mutantes desreguladas modificadas en algún mecanismo regulatorio bien conocido. Varias técnicas incluyendo la resistencia a análogos del producto final, la supresión de mutantes auxótrofas, y la reversión de mutantes no productoras han sido utilizadas para tal objetivo.

El conocimiento detallado de los mecanismos regulatorios que controlan la síntesis de antibióticos es esencial para entender y modificar tales mecanismos que ejercen un control de la síntesis del antibiótico. Los procedimientos anteriormente descritos pueden ser utilizados para la selección de mutantes modificadas en sus mecanismos de retroregulación para la síntesis de antibióticos.

En los casos en donde se cuenta con la evidencia de que la biosíntesis de un metabolito particular esta bajo control del inductor, las mutaciones pueden ser diseñadas exclusivamente para incrementar la síntesis del inductor. Siendo frecuente que los inductores del metabolismo secundario sean metabolitos primarios (Martín, *et.al.*, 1988).

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

En este sentido es importante recalcar que en FS, existen pocos estudios al respecto. Sin embargo, los que existen parecen indicar que los efectos regulatorios son minimizados en una fermentación sólida. Pues al estudiar la producción de alfa-amilasa, (Ramesh, *et.al.*, 1991) por *Bacillus subtilis* M27, se encontró que esta fué reducida de 480 a 30 unidades/ml. cuando la concentración de almidón se incrementó de 1 a 2%. En contraste, la producción de la enzima se incrementó 29 veces con el incremento de 42 veces la concentración de los azúcares solubles y otros sustratos carbohidratados en el sistema de fermentación sólida.

Los datos establecieron una regulación por producto final en la formación de la enzima, en fermentación sumergida y la habilidad de la fermentación en estado sólido para minimizar este efecto significativamente. Lo que coincide con lo reportado por Oriol, *et.al.*, (1988) en donde *A. niger* en fermentación sólida puede utilizar eficientemente altas concentraciones de sustratos (glucosa) lo que puede ser inhibitorio en un cultivo sumergido.

III.1.1.- Regulación por Nitrógeno.

II.1.1.1.- En fermentación líquida.

Es sabido que las penicilinas, cefalosporinas, y 7- α -metoxicefalosporinas y todos los derivados del tripéptido intermediario L-(α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina. Para ser sintetizados dependen de la disponibilidad de grupos amino, de ahí que surgió el interés por saber de que manera interviene el nitrógeno en la síntesis de algunos antibióticos. Sánchez, *et.al.*, (1982), encontraron que la síntesis del antibiótico por *P. chrysogenum* es reducida dos veces en fermentación líquida manejando una concentración de NH_4Cl de 8.5 mM, no afectando el crecimiento significativamente, mientras que al manejar una concentración más baja de NH_4Cl (0.85mM) se alcanzó la máxima formación de antibiótico.

En 1971, Hunter y Segel reportaron que micelio de *P. chrysogenum* crecido en diferentes condiciones experimentales, acumulaba altos niveles de L-glutamato. Fenómeno que posteriormente fué confirmado por Sánchez y colaboradores además de encontrar que la poza se incrementa al final de la trofofase. Estableciéndose adicionalmente que la concentración del glutamato sobrepasa a la del resto de los aminoácidos y que su acumulación precede la síntesis de penicilina. Sucesivo a esto se encontró que el glutamato estimula la síntesis del antibiótico en micelio que ha sido cosechado durante la idiofase y resuspendido en un medio mínimo, efecto que parecía no deberse a una mayor disponibilidad de aminoácidos precursores del antibiótico, ya que su concentración intracelular no fué modificada al adicionar el glutamato.

Las bases bioquímicas de esta acción han sido establecidas al demostrar que el glutamato induce la L-(α -aminoadipil) L-cisteína sintetasa, primera enzima de la vía que sintetiza penicilina. Kaszab, *et al.*, (1981) al estudiar este punto presentaron como posibilidad que la enzima inicial en la vía de la biosíntesis de glutation equivale a la misma que cataliza el primer paso de la biosíntesis de penicilina, pues al parecer esta enzima cataliza la formación L-glutamil cisteína a partir de L-cisteína sintetasa y glutamato a la vez que es inhibida por elevadas concentraciones de glutation (Richman, *et.al.*,1975).

Por otro lado, se observó que en *P. chrysogenum* el glutation inhibe la actividad de la enzima mencionada así como también se ha encontrado que el glutamato es capaz de inducir ambas actividades lo cual refuerza la idea de una enzima para ambas reacciones (Lara, *et.al.*, 1983). Al parecer el amonio también influye en la formación de la penicilina, ya que dicho ion afecta negativamente la formación del metabolito secundario y su acción es proporcional a la concentración que guarda en el medio de cultivo.

III.1.1.2.- Bn fermentación sólida.

Estudios preliminares sobre regulación por amonio mostraron un comportamiento similar en FS y FL (Barrios-González, 1994).

III.1.2.- Regulación por Glucosa.

III.1.2.1.- En fermentación líquida.

La formación de la penicilina en el hongo *P. chrysogenum* es reprimida por la glucosa, dependiendo el porcentaje de represión de la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Otras fuentes de carbono como la sacarosa, fructuosa y galactosa, afectan de manera negativa la formación del antibiótico en un grado similar al ejercido por la glucosa.

El almidón por su parte inhibe parcialmente la síntesis del antibiótico, mientras que la lactosa y la ramnosa carecen de tal efecto (Revilla, *et.al.*, 1980). Con respecto a la glucosa, se sabe que ésta es la mayor y mejor fuente de energía para el crecimiento de muchos microorganismos productores de antibióticos. Así, cuando la glucosa es agotada (o se llega a una concentración en la cual la represión es anulada) la segunda fuente de carbono es utilizada y la formación del antibiótico se inicia , (Revilla, *et.al.*, 1984).

Los mismos autores al tratar de determinar el efecto de la glucosa en la producción de penicilina por *P. chrysogenum* en fermentación líquida, obtuvieron resultados que les indicaron la posibilidad de una represión de la enzima penicilino-sintetasa.

III.1.2.2.- En fermentación sólida.

Hace poco tiempo se realizaron estudios sobre la regulación por carbono sobre la síntesis de penicilina por *P. chrysogenum* P-2 en FS y FL. Se utilizó un medio definido en ambos sistemas y bagacillo lavado (sin azúcares residuales) en FS. Se utilizó una concentración de azúcares totales (glucosa+lactosa) constante en todos los experimentos. Con el fin de poder estimar, de manera aproximada, el umbral de regulación de la glucosa en el medio sólido y en el medio líquido, se estudió este fenómeno a las menores concentraciones de glucosa posibles (entre 112 y 224 mM).

En fermentación líquida, la represión catabólica se manifestó en el cultivo con 170 mM de glucosa inicial como un retraso relativo de unas 15 horas en el inicio de la síntesis de penicilina, tiempo en el que la concentración del azúcar en el medio descendió a niveles no represivos. En estas condiciones el efecto de la glucosa fue muy parecido al observado en FL, con la diferencia que se observó un periodo con una velocidad de síntesis baja, seguida de uno con una alta velocidad de síntesis. Se interpretó esto como una desrepresión parcial, seguida de una total. En este sistema la producción se inició más tarde que en FL debido a que se inoculó con esporas. El cultivo con 170 mM mostró un pequeño retraso en el inicio de la síntesis mientras que en el de 224 mM el retraso fué más notorio. Con las cinéticas de consumo de glucosa se estimó el umbral regulatorio de la síntesis entre 36 y 14 g/l. Estos resultados mostraron que el mecanismo de represión catabólica también regula la síntesis de penicilina en FS. La coincidencia entre los umbrales estimados en uno y otro sistema sugiere que este mecanismo regulatorio funciona a umbrales similares en FS y en FL (Barrios-González, 1994).

III.1.3.- Regulación por Lisina.

III.1.3.1.- En fermentación Líquida.

La biosíntesis de la penicilina por *Penicillium chrysogenum* está sujeta a un tipo diferente de retroinhibición por el aminoácido L-lisina (Fig 2). Uno de los intermediarios de la biosíntesis de lisina es el α -aminoadipato, el cual está involucrado en la biosíntesis de penicilina.

La retroinhibición por lisina de la primera enzima de su propia biosíntesis (homocitrato-sintetasa) limita la producción de α -aminoadipato, así indirectamente inhibe, la biosíntesis de penicilina (Demain and Masurekar, 1974). Al añadirse α -aminoadipato a la fermentación de penicilina, el efecto inhibitorio de lisina es revertido.

Luengo, *et.al.*, (1979), al estudiar el efecto de la lisina en la ruta biosintética de penicilina en las cepas Wis-54 y A-SP-78. Manejó cultivos en medio definido complementado con lisina (10 y 50 mM). Observando que las dos cepas retardaban la producción de penicilina, iniciándose ésta hasta que se encontraban niveles bajos de lisina, alcanzando la misma producción que las fermentaciones control.

Al realizar la misma estrategia con medio complejo observó lo mismo, sin embargo al añadir diariamente la lisina (10 y 50 mM), la producción fué suprimida, por lo que era muy probable que la lisina inhibiera la ruta biosintética.

Al tratar de esclarecer si además de inhibir, reprimía la ruta biosintética de penicilina, Luengo, *et.al.*, (1980) montaron experimentos *in vivo* e *in vitro*, encontrando que a 50 mM la lisina actúa como represor, pues al añadir α -AAA no había reversión alguna, tanto en cepas de alta como de baja producción. Siendo posible que las cepas mutantes industriales hayan perdido su sensibilidad a la lisina, o que el contenido de la lisina en algunos medios pueda no ser la concentración inhibitoria para la síntesis de penicilina, lo que explica que algunas cepas sean sobreproductoras de antibióticos, (Jermini, 1979).

III.1.4.-Regulación por Penicilina.

Gordee, *et.al.*, (1972), diseñaron una estrategia para determinar si la penicilina podía actuar como un regulador de su propia biosíntesis. La cual consistió en añadir penicilina-V (1-10mg/ml.) a diferentes tiempos durante la fermentación por cepas de alta y baja producción de penicilina de *P. chrysogenum*. Encontrando la inhibición de una posterior acumulación del antibiótico en el medio líquido sin afectar el crecimiento, observándose el mismo efecto con penicilina-G, 6-APA y algunas otras penicilinas semisintéticas. Mientras que la penicilina-N, ác. peniciloico, cefalosporina C y ác. 7-aminocefalosporánico, no presentaron este efecto.

Concluyendo que la cantidad de penicilina que inhibe la síntesis de penicilina depende de la capacidad sintetizadora de cada cepa. Lo que puede estar determinado por algún mecanismo de retroinhibición regulado genéticamente.

Algo muy similar, reportaron Martín *et.al.*, en 1979, al estudiar la retroregulación de la biosíntesis de penicilina-G mediante fermentaciones líquidas con *P. chrysogenum* suplementadas durante la inoculación con altos niveles de penicilina exógena, no sintetizándose penicilina. Así la concentración de penicilina exógena requerida para la total inhibición de la síntesis de penicilina nueva, dependió del nivel de producción del antibiótico por el microorganismo. En este caso se estudiaron dos cepas: Wis 54-1255, produce 600 µg pen/ml requiriéndose 500 µg pen/ml para lograr una completa inhibición de la síntesis de penicilina, y T.P. 26 que produce más de 5000 µg pen/ml requiriéndose 10 000 µg pen/ml para la total inhibición de la síntesis.

De lo anterior se concluye que la formación de la penicilina por la cepas hiperproductoras es mucho menos sensible a la inhibición por producto final que la cepa de baja producción, es decir que la concentración del antibiótico que es inhibitoria para su propia biosíntesis en una cepa en particular, es generalmente similar al nivel de producción alcanzado por esta misma cepa. Esta retroregulación puede tener relevancia en la producción industrial de la penicilina, ya que la remoción del producto final puede ser un método para incrementar la producción de penicilina.

V I. - O B J E T I V O S :

DETERMINAR SI LA RETRORREGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA G DE *Penicillium chrysogenum* TAMBIEN SE MANIFIESTA EN FERMENTACION SOLIDA.

SI ESTE ES EL CASO, ESTIMAR LOS UMBRALES DE RETRORREGULACION EN LA PRODUCCION DE PENICILINA G CON *Penicillium chrysogenum* CON CLONES DE ALTA Y BAJA EFICIENCIA RELATIVA (P_i-2 y P_i-4) EN FERMENTACION SOLIDA.

V.-MATERIAL Y METODOS.

V.1.- Microorganismos y conservación.

Se manejaron dos cepas de *Penicillium chrysogenum* P2 ATCC 482711. El clon P₁-2, como un prototipo de baja producción y el clon P₁-4 como prototipo de alta producción. Ambas cepas fueron aisladas como se describió previamente. (Barrios-González, *et. al.*, 1993A). *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se utilizó como microorganismo indicador de actividad antibiótica. Almacenados para su preservación por liofilización.

V.2.- Medios de cultivo.

Medio para bioensayo.

TSA: Agar de Soya Tripticaseína (g/l.).

Peptona de caseína	17
Peptona de soya.	3
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2.5
Dextrosa	2.5
Agar bacteriológico.	10
pH	7.3
Aforar a	1000 ml.

Medio de Esporulaci3n para Bacillus subtilis.(g/l.)

Peptona	8
Extracto de Carne	3
MnCl ₂	10 ⁻⁵ M
pH	7.2
Aforar a	1000 ml.

Medio de esporulaci3n para Penicillium chrysogenum (g/l.).

Medio Power.

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
**SMM	0.25
NaCl	2
Agar Bacteriol3gico	20
Aforar a	1000 ml.

**S3lidos de maceraci3n de maiz.

Medio para Fermentación Sólida. (g/l).

Lactosa	110
Glucosa	14
CaCO ₃	20
KH ₂ PO ₄	6
MgSO ₄	6
SMM	70
Acido Fenilacético	1.3
Aforar a	1000 ml.

*Medio de Producción de composición definida g/lt.**Medio Czapeck.*

Sacarosa	30
NaNO ₃	2
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
Agar	30
pH	7.0

V.3.- Obtención de la suspensión de esporas.

El material liofilizado se hidrató y se inoculó a un matraz conteniendo 40 ml. de Agar Medio Power. Incubándose a 25°C por un periodo de 5 a 12 días según la cepa a trabajar, transcurrido este tiempo se obtuvo la suspensión de esporas añadiendo 20 ml. de una solución acuosa de tween 20 (1 gota por cada 100ml.), sometiéndose a una agitación magnética, y posterior conteo de esporas en cámara de Neubauer.

V.4.- Fermentación sólida.

a) *Tratamiento del Soporte.*

Se empleó como soporte, bagacillo de caña de azúcar obtenido en el ingenio azucarero de Zacatepec Morelos, México. Se realizó un tamizado del bagacillo en mallas No. 30 y 50 utilizando las partículas retenidas entre estas dos mallas, se mezcló el bagacillo con el 50% de agua total a utilizar en el sistema, cubriéndose el recipiente con papel, celofán y aluminio. Se introdujó al autoclave y se llevó a 3 psi de presión por 30 min., transcurrido este tiempo se esterilizó a 15 psi de presión por 15 min.

b) *Preparación del medio de cultivo.*

Al bagacillo de caña de azúcar ya pretratado se le adicionó el medio de producción (Somerson) para la obtención del medio de cultivo sólido. Este medio contenía 70% de humedad y 30% de sólidos, incluyendo el soporte (bagacillo de caña). Se consideró el aporte de agua que proviene de la suspensión de esporas, y que este varía dependiendo de la cuenta que se obtenga.

c) *Condiciones de cultivo.*

El cultivo se realizó según la descripción de Raimbault y Alazard (1980), en columnas que contenían 12 g. de medio de cultivo con una densidad de empaque de 0.23 g/ml., sumergidas en un baño de agua a 25°C para control de la temperatura y con una aeración (aire húmedo) de 2.4 l/h. El medio sólido se inoculó con una cuenta de 2×10^6 esporas/ml.

La estrategia general de este trabajo fue la adición de diferentes concentraciones de penicilina V al inicio de las fermentaciones sólidas montadas con las cepas P2-4 y P2-2, estas fermentaciones fueron repetidas por lo menos dos veces para cada cepa, muestreando dos columnas cada 24 horas. Por lo que los parámetros registrados son reportados en promedio para todos los experimentos.

V.5.- Bioensayo.

Se obtuvo una suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* inoculando el medio de esporulación con dos asadas procedentes de una colonia aislada previamente en agar nutritivo. Se incubaron en matraces de 250 ml. con 125 ml. de medio a 30°C durante 72 horas con agitación de 200 rpm. Cuando se obtuvo la suspensión, se determinó su densidad óptica (DO) a 340 nm y se inoculó al medio TSA.

Se utilizaron cajas de acrílico de 30x30 cm., se le adicionaron 350 ml. de TSA inoculados con *Bacillus subtilis* (0.2 ml. de suspensión de esporas con una D.O. de 1 para 100 ml. de medio TSA). Ya solidificado el medio se colocaron los cilindros y se incubaron a 33°C por 16 horas para la formación de los halos de inhibición. En el caso de las muestras obtenidas de la fermentación sólida, estas se colocaron en los pozos originados con el horadador de 8 mm. de diámetro, sometiéndose a las condiciones de incubación mencionadas anteriormente.

V.6.- Producción en cilindros de agar.

Se vaciaron 30 ml. de medio Power estéril en caja de petri (9.5 cm. de diámetro). Se cortaron los cilindros de agar con un horador de 8 mm de diámetro. Se colocaron en una caja petri estéril. Los cilindros fueron inoculados en el centro por picadura con palillos. Se sellaron las cajas que contenían a los cilindros ya inoculados con parafilm para su posterior incubación a 26°C por 5 días aproximadamente. Evaluando la producción de penicilina por bioensayo a 6 cilindros cada 24 horas.

V.7.- Determinación de la posible transacilación de penicilina V a G, ó de G a V en fermentación sólida.

V.7.1.- *Obtención de mutantes no productoras de penicilina.*

A una suspensión de esporas con una concentración de 5×10^7 esporas/ml., se le aplicaron radiaciones ultravioleta, en intensidades de 100, 50 y 33.33 ergios/cm². Se les sometió a una serie de diluciones y se sembró por extensión en superficie en medio Power y medio Czapeck. Se incubaron a 26°C en oscuridad. Ya crecidas las colonias y aisladas se numeraron y se procedió a inocular cilindros de medio Somerson, medio Czapeck y Power. Se incubaron a 26°C hasta esporular. Se les realizó bioensayo, y los cilindros que no originaron halos de inhibición se les resuspendió en agua con tween 20 y se inoculó medio Power, para posteriores fermentaciones sólidas.

V.7.2.- *Fermentación sólida con mutantes no productoras.*

Se montaron dos cultivos en estado sólido con la cepa parental (P₁-2), con la mutante 1 y la mutante 2.

Al inicio de tales cultivos uno fué complementado con 10 500µg/ml. de penicilina V y 1.3g/l de ác. fenilacético, y el otro cultivo solamente con ácido fenilacético (1.3g/l). Las fermentaciones fueron seguidas por 96 horas realizándose la cuantificación de penicilina producida.

V.8.- Métodos Analíticos.

V.8.1.- Cuantificación e Identificación de las penicilinas en cilindros de agar y muestras de fermentación sólida.

a) *Extracción de Penicilina.* Se pesaron 0.5 g. de bagacillo muestra, se agregaron 3 ml. de buffer de fosfatos y ajustó pH entre 5.0 y 5.2., centrifugando por 20 min. a 1700 rpm, se extrajo el sobrenadante con pipeta pasteur y se colocó en microtubos para ser congelados a -20 C, y ser analizados posteriormente. En el caso de los cilindros de agar, se les sometió al mismo proceso, sólo que se centrifugaron a 2500 rpm.

b) *Cuantificación e identificación de penicilina.* Se manejó cromatografía de alta resolución para líquidos. (HPLC): Utilizándose un método isocrático, una fase móvil inversa constituida de ACN/Buffer de Fosfatos en una proporción 20/80 (El buffer a una concentración de 0.05M y pH 6.) Una columna µBondapak C₁₈. Flujo 1ml/min.

V.8.2.- *Cuantificación de azúcares.*

A partir de una solución obtenida de igual forma que para la extracción de penicilina (apartado IV.8.1.a) se cuantificaron azúcares reductores por el método del Acido Dinitro-Salicílico (DNS) (Miller, 1959).

V.8.3.- Cuantificación de Biomasa.

Esta determinación se realizó a través de respirometría, mediante el uso de un cromatógrafo de gases. (marca GOW-MAC). 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 el sistema de muestreo automático y computarizado mencionado anteriormente, con un detector de conductividad térmica y columna CTRI (Alltech). Los datos se capturaron y procesaron con el programa Máxima de Waters. Antes de ser analizadas las muestras por el cromatógrafo de gases se secaron previamente haciendo pasar el aire húmedo por columnas conteniendo sílica gel con indicador de humedad.

La biomasa en cilindros se determinó mediante peso seco, lavando con agua caliente para disolver el agar.

V.8.4.- Determinación de humedad.

Esta determinación se realizó por gravimetría.

V.8.5.- Determinación de pH.

Se pesó 1 g. de bagacillo muestra, se adicionó 10 ml. de agua destilada y se agitó por 10 min., se midió con un potenciómetro.

V.8.6.- Cuantificación de la esporulación.

Se pesó 100µg. de bagacillo muestra, se adicionó 10 ml. de agua destilada con tween y se agitó por 5 min., se tomó muestra de esta dilución y se le realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer.

V I . - R E S U L T A D O S .

VI.1.- Efecto de la penicilina exógena sobre la germinación y producción de penicilina G en cilindros de agar.

VI.1.1.- Efecto sobre germinación.

Con el fin de descartar la posibilidad de un efecto negativo sobre la germinación y por lo tanto no directo sobre la producción de penicilina, se probaron diferentes concentraciones de penicilina exógena (V), en cilindros de agar inoculados con la cepa P₁-2. Se observó que los cinco perfiles de crecimiento, fueron muy similares entre sí, alcanzando su máximo crecimiento a las 96 horas (Fig 5).

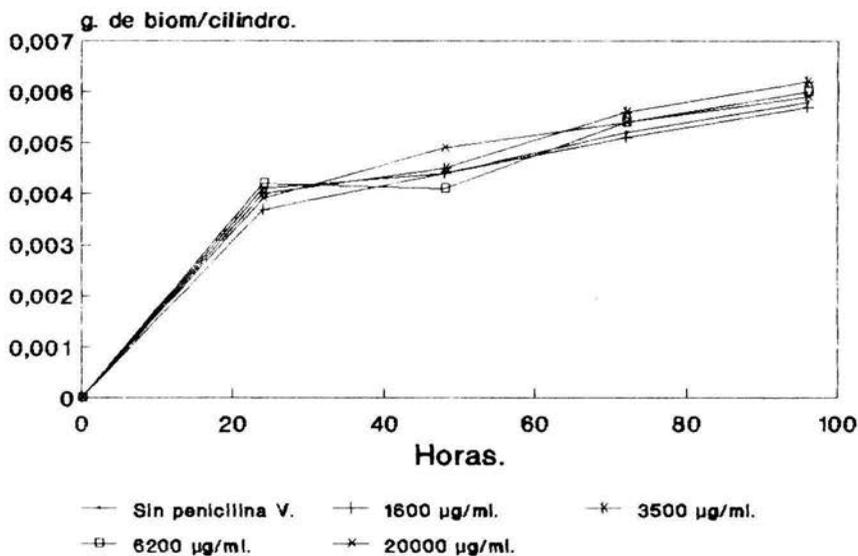


Fig 4.- Perfiles de crecimiento del clon P₁-2 en cilindros de agar conteniendo diferentes concentraciones de penicilina V

VI.1.2.- Efecto sobre la producción

Para establecer el efecto de la penicilina exógena (V) sobre la producción de la penicilina G, se determinó la producción en cilindros agar impregnados con diferentes concentraciones de penicilina V e inoculados con *P. chrysogenum* P₁-2 (TABLA I). En donde parece haber un efecto sobre la producción de penicilina G, tal efecto parece depender de la concentración de penicilina exógena manejada.

Penicilina exógena (µg/ml.)	Producción Máxima (µg/ml.)	Tiempo de Produc. Máxima (hrs.)	Tpo. de Inicio de la Produc. (hrs.)
0	400 (±32)	96	24
1500	270 (±33.5)	96	48
3500	200 (±32)	96	48
6500	320 (±57)	96	48
20000	285 (±28.5)	96	48

TABLA 1.- Producción de penicilina G en cilindros de agar inoculados con *P. chrysogenum* cepa P₁-2 conteniendo diferentes concentraciones de penicilina exógena.

VI.2.- Efecto de la penicilina exógena en la producción de la penicilina G en fermentación sólida.

VI.2.1.- Cepa P₂-2 (prototipo de bajo PS/PL).

Con el fin de saber si lo encontrado en cilindros de agar, se presentaba de la misma manera en fermentación sólida con bagacillo de caña, se procedió a montar estos cultivos, con diferentes concentraciones de penicilina V inoculando con la misma cepa (TABLA II). En donde los resultados mostraron una disminución en la producción de penicilina en los cultivos con 5 000µg/ml. de penicilina exógena.

Penicilina exógena (µg/ml.)	Producción Máxima (µg/ml.)	Tiempo de Produc. Máxima (hrs.)	Tpo. de Inic. de la Produc. (hrs.)
0	454 (±27.2)	96	24
1000	425 (±32.5)	120	24
2500	388 (±11.6)	96	24
5000	120 (±7.2)	72	24

TABLA II.- Efecto de la penicilina V sobre la producción de penicilina G en fermentación sólida con la cepa *P. chrysogenum* P₂-2

Al montar fermentaciones sólidas complementadas con penicilina exógena a las mismas concentraciones, y sin ser inoculadas, no hubo evidencia de penicilina G como lo ocurrido en los cilindros de agar (Fig.5).

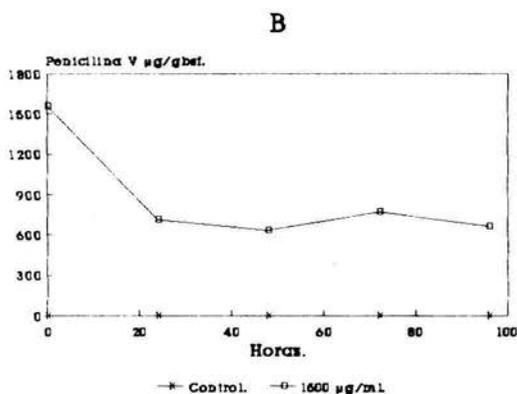


Fig 5.- Perfil de degradación de penicilina V en P.S.

Por lo que respecta al comportamiento del pH en los cultivos (Fig.6), los perfiles obtenidos resultaron ser muy similares entre sí, solo al final el pH varió entre 6.9 y 7.2.

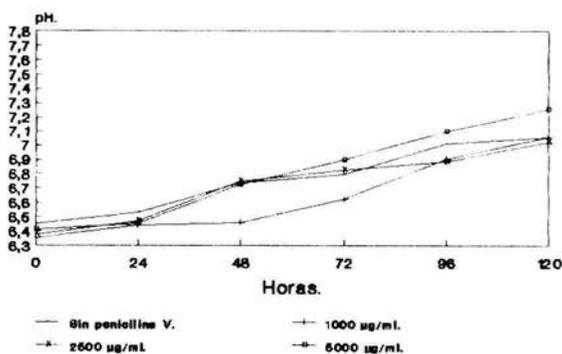


Fig 6.- Comportamiento del pH en presencia de penicilina V en P.S. con el clon P1-2.

En cuanto al crecimiento (Fig.7b), éste se estimó a través de un método indirecto que fué la producción de CO_2 , que inicialmente se obtuvo en % y posteriormente se calculó como $d\text{CO}_2/dt$ por gmsf, esta derivada se graficó contra el tiempo de cultivo, mostrando de esta manera los cambios de velocidad en la producción de CO_2 , y por lo tanto de la actividad metabólica. de *P. chrysogenum* ante la presencia de las diferentes concentraciones de penicilina V añadidas.

Los patrones de crecimiento fueron determinados por respirometría que representa un tipo de medición indirecto. Cabe señalar que en algunos estudios se ha cuantificado la biomasa a través de gravimetría, siendo una determinación difícil de precisar en sistemas de FS debido básicamente a que los p.o. se unen íntimamente a la matriz sólida y no pueden ser cuantitativamente separados. Mientras que las mediciones de respiración representan una alternativa debido a su precisión y a que es un método especialmente adecuado para el monitoreo y control del proceso en este tipo de sistemas.

La producción de CO_2 vista en forma integrada como producción total de CO_2 /gramo de materia seca fermentada/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). Aunque este coeficiente no se conoce, estas curvas resultan por el momento el mejor indicativo de crecimiento (Domínguez, 1995).

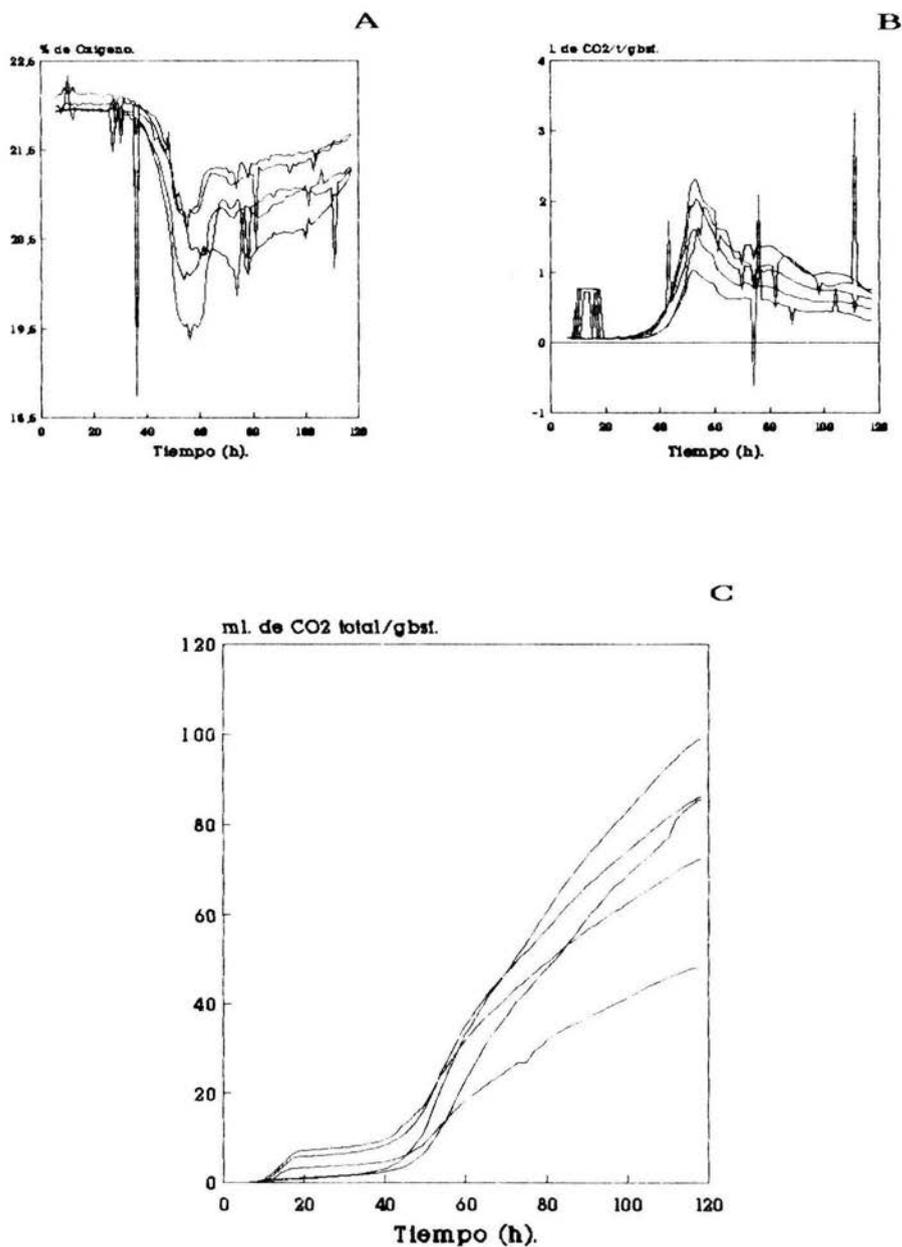


Fig 7.- Efecto de la penicilina V (0, 1000, 2500 y 5000µg/ml) en el consumo de O₂ (A), Velocidad de producción de CO₂ (B) y producción de CO₂ total por columna (C) durante el crecimiento de *P. chrysogenum* P₁-2 en F.S.

Estos valores de producción de CO₂ total fueron obtenidos a partir de una fórmula denominada acumulativa reportada por Saucedo-Castañeda en 1991.

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

en donde:

$$t = t_{i+1} - t_i.$$

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

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

De esta forma construimos la figura 7B en donde observamos que la mayor producción de CO₂ se da entre las 48 y 72 horas aunque parece ser que sí hay diferencias en cuanto a las producciones máximas de CO₂ ya que fluctúan entre 2500 y 1000 ml. de CO₂/gmsf. sin embargo estas diferencias no son significativas debido a que entran en el rango del comportamiento típico del clon P₁-2 en ausencia de penicilina V.

Los cuatro perfiles de esporulación se iniciaron a las 72 horas, esporulando menos el cultivo no adicionado con penicilina exógena (Fig. 8).

Por su parte el consumo de azúcares (Fig.9) se presentó en mayor porcentaje entre las 48 y 72 horas para los cuatro cultivos, siendo tales cinéticas muy similares entre sí.

En cuanto a la evolución de la humedad esta inició entre 68 y 69.5%, al final varió entre 74.5 y 75.5% (Fig.10.)

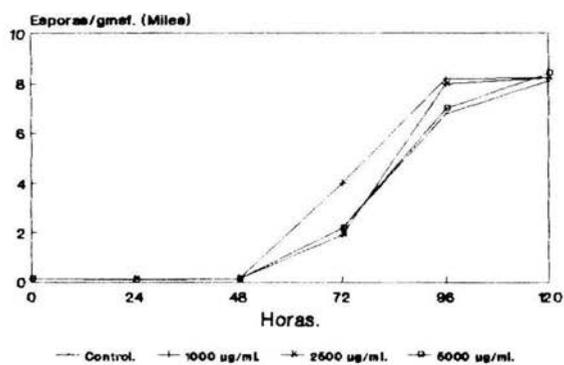


Fig 8.- Efecto de la penicilina exógena (V), en la germinación y crecimiento del clon P₁-2 en P.S.

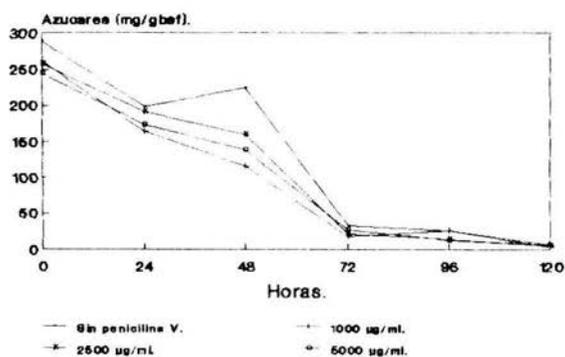


Fig 9.- Perfiles del consumo de azúcares por el clon P₁-2 en presencia de penicilina V en P.S.

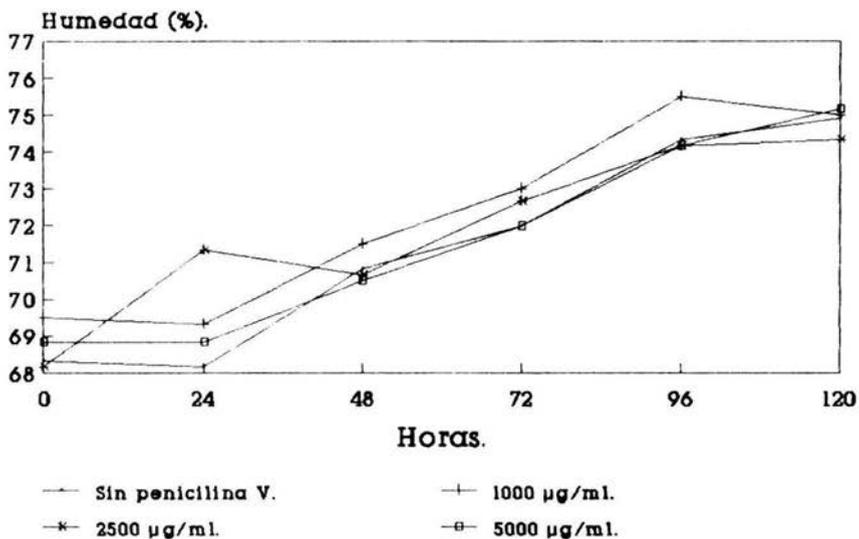


Fig 10.- Evolución de la humedad en presencia de penicilina V en F.S. con el clon P₂-2.

VI.2.2.- CEPA P₁-4 (prototipo de alto PS/PL).

Con el objeto de saber si lo encontrado en fermentación sólida al agregar penicilina exógena con una cepa de bajo ps/pl se manifestaba de igual manera en una cepa de alto ps/pl. se realizó la estrategia anterior con la cepa P₁-4. En donde también con 5000 µg/ml de penicilina V se da una disminución en la producción de penicilina G.

Penicilina exógena (µg/ml.)	Producción Máxima (µg/ml.)	Tiempo de Produc. Máxima (hrs.)	Tpo.de Inic. de la Produc (hrs.)
0	2000 (±200)	120	24
5000	1000 (±80)	72	24
7500	3000 (±450)	120	24
10000	5200 (±572)	96	48

TABLA III.- Efecto de la penicilina V añadida, sobre la producción de penicilina G en fermentación sólida con la cepa *P. chrysogenum* P₁-4.

Los perfiles de pH obtenidos fueron bastante parecidos entre sí (Fig.11), oscilando los valores iniciales entre 6.6 y 6.7 y los finales entre 7.5 y 7.7.

Los perfiles de crecimiento obtenidos por el método indirecto de respirometría indican un desplazamiento en cuanto a la actividad metabólica de 10 horas aproximadamente y además notables diferencias en cuanto a la producción máxima de CO₂ (Fig 12).

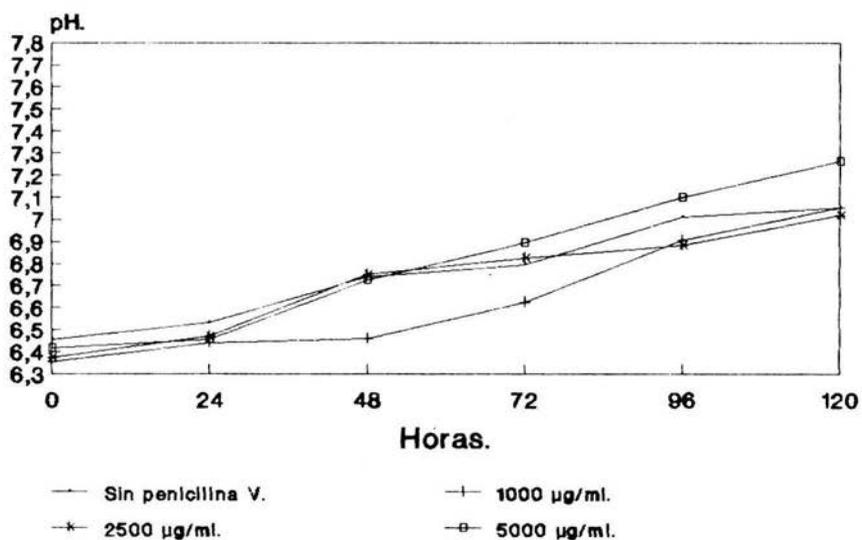


Fig 11.- Comportamiento del pH en presencia de penicilina V con el clon P₁-4 en fermentación sólida.

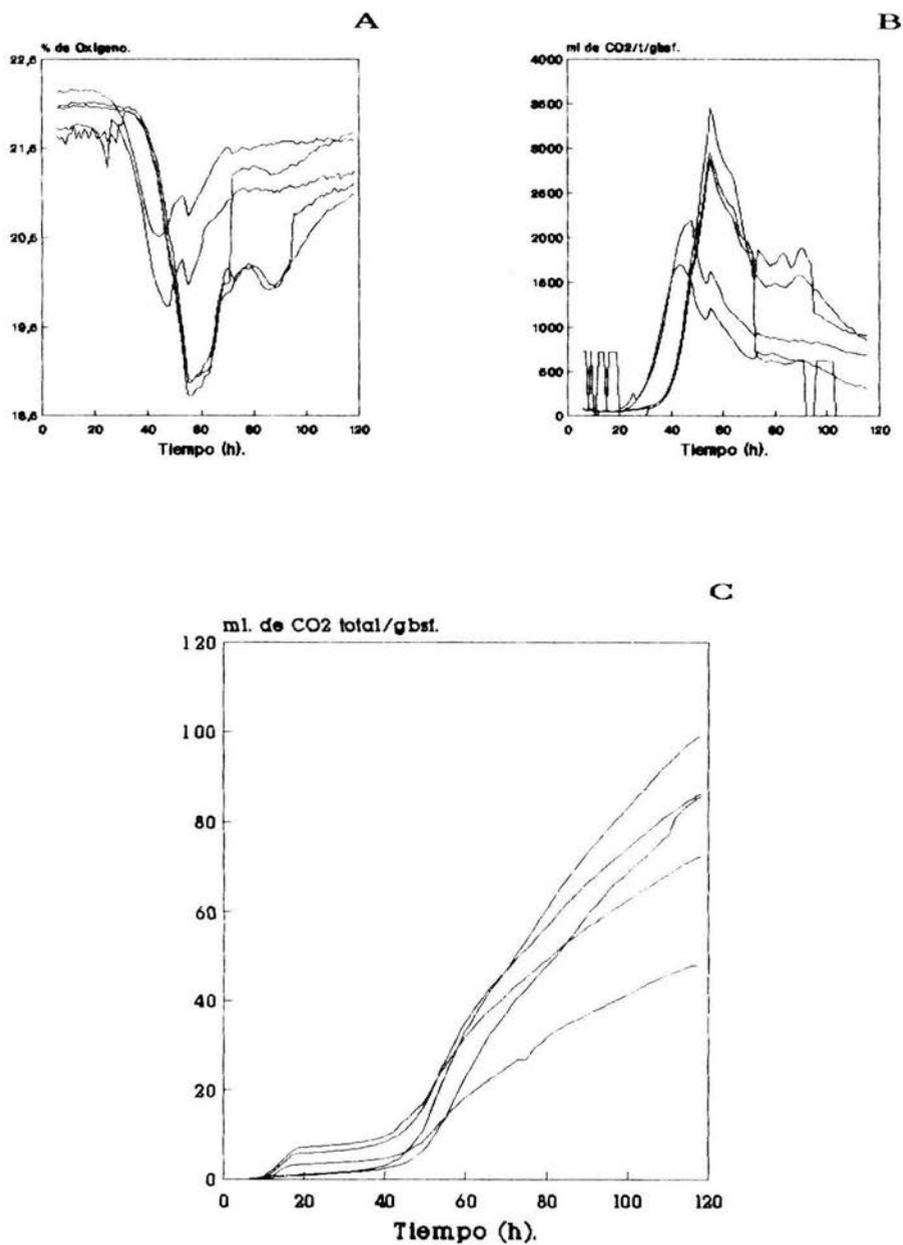


Fig 12.- Efecto de la presencia de penicilina V (0, 5000, 7500 y 10000µg/ml) en el consumo de O₂ (A), velocidad de formación de CO₂ (B) y producción total por columna (C) a través del crecimiento de *P. chrysogenum* P₁-4.

Los perfiles de humedad obtenidos resultaron muy parecidos entre sí, ya que los valores finales variaron entre 75 y 77% (Fig 13).

El consumo de azúcares se mostró típico de la fermentación sólida con esta cepa, siendo la mayor velocidad de consumo entre las 72 y 96 horas (Fig.14).

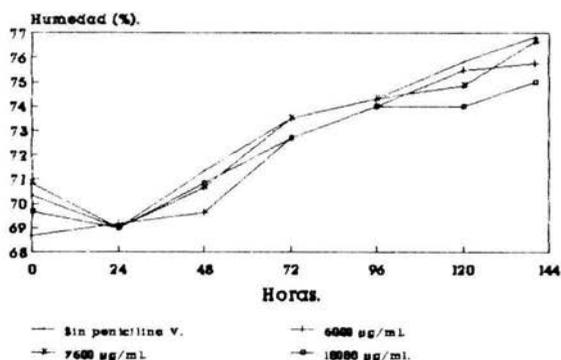


Fig 13.- Evolución de la humedad en P.S. por el clon P₁-4 en presencia de penicilina V.

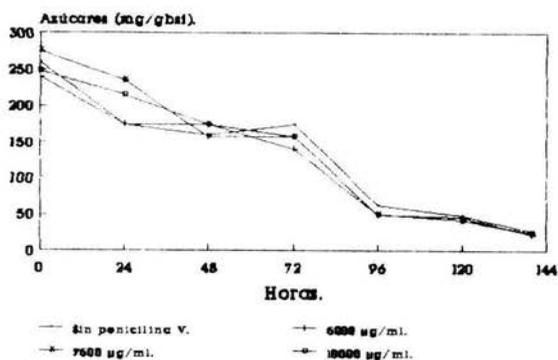


Fig 14.- Cinéticas del consumo de azúcares por el clon P₁-4 ante diferentes concentraciones de penicilina V en P.S.

VI.3.- Determinación de la posible transacilación de penicilina V a G, ó de G a V.

VI.3.1.- *Obtención de las mutantes.*

La verificación de la incapacidad de las mutantes obtenidas de la cepa P₁-2 para producir penicilina, se realizó a través de un bioensayo. En donde de 512 colonias probadas del primer aislamiento 33 produjeron halos muy pequeños y de aquí se realizó un segundo aislamiento probándose 167 colonias de las cuales 5 no formaron halo. Estas 5 mutantes se resuspendieron e inocularon en matraces conteniendo 40 ml. de medio Power para su esporulación y posterior cosecha e inicio de fermentaciones sólidas. Sin embargo sólo 2 de las cinco colonias crecieron de manera característica ya que las tres restantes no esporularon. A estas dos mutantes se les denominó pen-1 y pen-2.

VI.3.2.- *Determinación de la presencia de transacilación.*

Se realizaron fermentaciones sólidas con las cepas mutantes no productoras de penicilina y la cepa P₁-2, complementadas al inicio con penicilina V y ácido fenilacético (Fig 15). Los perfiles obtenidos de la producción de la penicilina G cuantificada por bioensayo por las mutantes, presentan una tendencia de disminución durante las primeras 48 horas, disminuyendo hasta casi 0 en las 24 horas restantes.

Mientras que la cepa P₁-2 se comportó como casi una recta ya que sólo disminuyó un 20% con respecto a la concentración inicial de penicilina V añadida durante el transcurso de la fermentación. Se realizaron fermentaciones sólidas con las mutantes no productoras conteniendo el precursor de la síntesis de la penicilina G (AFA). Al ser analizadas las muestras a través de bioensayo, mostraron la presencia de penicilina G en concentraciones de entre 0.3 y 0.5 µg/ml disminuyendo hasta casi 0 conforme transcurrió el cultivo.

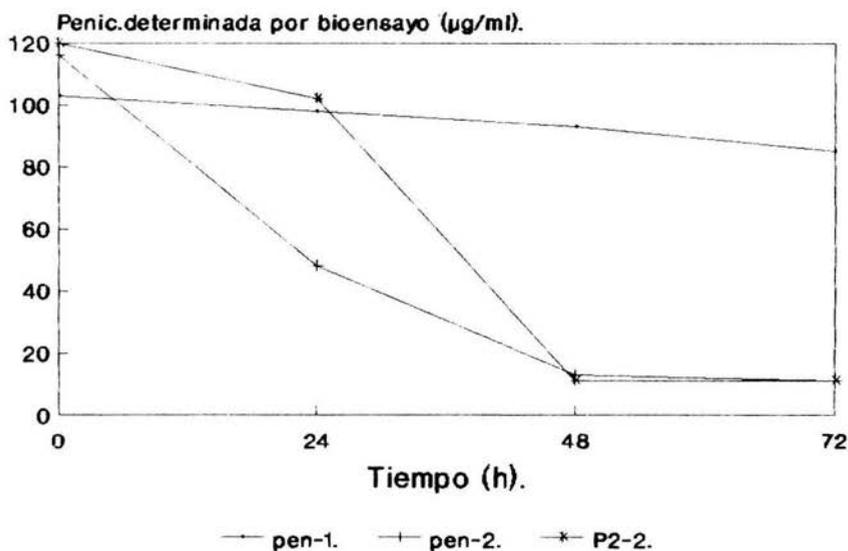


Fig 15.- Biosíntesis de penicilina G por F.S. con las cepas mutantes en presencia de penicilina V y precursor de la penicilina G..

V I I . - D I S C U S I O N .

VII.1.- Efecto de la penicilina V sobre la biosíntesis de penicilina G en cilindros de agar con la cepa P₂-2.

Los resultados aparentemente indican que el efecto de retroregulación se manifiesta en los cilindros de agar. Ya que las cinéticas de producción obtenidas muestran que la producción alcanzada por los cultivos complementados con 1500 y 3500µg/ml de penicilina V disminuyen de manera proporcional, es decir, que entre más penicilina exógena menos producción de penicilina G se obtiene.

Lo anterior nos hace suponer que el efecto de regulación en la producción de penicilina G está en función de la cantidad de penicilina añadida. Sin embargo, con 6500 y 20,000µg/ml. la disminución en la producción de penicilina no es tan proporcional como lo anteriormente analizado. Esto último nos haría pensar en un posible efecto de transacilación.

Sin embargo es probable que el efecto de retroregulación se dé al menos, para las dos primeras concentraciones ya que las cinéticas de crecimiento obtenidas, en donde al manifestarse los perfiles tan similares entre sí, nos sugieren que la penicilina V añadida no tuvo efecto sobre la germinación ni crecimiento, ya que si la germinación se hubiese retardado la producción de penicilina se hubiera logrado en un periodo de tiempo mayor.

De tal manera que es probable que al añadir 1,500 y 3,500µg/ml de penicilina V el estado metabólico del hongo no es afectado por la presencia de penicilina V. No así para el efecto ocasionado en presencia de 6,500 y 20,000µg/ml en donde proponemos como una teoría que el hongo entre a un "stress" metabólico y desencadene algunas reacciones para sobrevivir ante tales concentraciones de antibiótico, ocasionando de esta manera un ambiente físicoquímico para promover la transacilación.

También tenemos que considerar que en los cilindros impregnados de penicilina V sin inocular, al ser analizados por HPLC, mostraron la presencia de penicilina G. Esto quizá fué debido a la presencia de los sólidos de maceración de maíz, que al estar constituidos por arginina, histidina, ác. glutámico y posiblemente derivados del ácido fenilacético, (Foster; et.al., 1946), se promovió una transacilación; es decir intercambio de cadenas laterales entre el ácido que está integrado como cadena lateral de la penicilina V (ác. fenoxiacético) y el ácido fenilacético en la penicilina G. Detectándose, como consecuencia de esto, pequeñas cantidades de penicilina G en los cilindros de agar sin inocular.

En base a lo cual, entonces a las cinéticas obtenidas en cilindros de agar inoculados con la cepa de bajo PS/PL e impregnadas de diferentes cantidades de penicilina V habría que restarle la penicilina presente debido al fenómeno mencionado, sin embargo no repercute de manera drástica ya que todos los cultivos se hicieron bajo las mismas condiciones y por tanto el comportamiento sería el mismo.

VII.2.- Efecto de la penicilina exógena sobre la biosíntesis de la penicilina G en FS con la cepa de baja producción relativa.

En fermentación sólida con *P. chrysogenum* P₁-2 cultivado con penicilina V en concentraciones iniciales de 1000 y 2500 µg/ml no se encontraron diferencias drásticas en cuanto al perfil de producción de la penicilina G. Con 5000µg/ml la síntesis de penicilina G disminuyó en un 71% .

Esto sugiere fuertemente la existencia de un efecto regulatorio debido a que no se observaron diferencias en el comportamiento del pH, germinación, consumo de azúcares, respirometría y humedad. Parámetros que al mostrarse diferentes entre sí reflejarían alguna alteración metabólica ocasionada por la presencia de la penicilina V.

VII.3.- Efecto de la penicilina exógena sobre la biosíntesis de la penicilina G por la cepa de alta eficiencia relativa en fermentación sólida.

La cepa de alta eficiencia relativa (*P. chrysogenum* P₁-4) cultivada en fermentación en estado sólido, ante la presencia de 5000µg/ml de penicilina V causó una disminución menos pronunciada en la producción de penicilina G (50%) con respecto a la producción obtenida por F.S. sin penicilina V.

Dada esta situación es muy probable que los umbrales de regulación para las cepas prototipo se encuentren entre 5000 y 7500µg/ml y que por arriba de 7500µg/ml la cantidad de penicilina V sea tanta que *P. chrysogenum* desencadene algunas reacciones que promuevan la transacilación como ya se mencionó anteriormente, ya que las concentraciones más altas tuvieron un efecto inesperado pues los cultivos con 7500 y 10000µg/ml. produjeron más que el control de manera proporcional.

Lo que puede ser explicado, debido a que teóricamente una conversión de penicilina V a penicilina G es posible, como también una conversión de penicilina G a penicilina V, y tal conversión podría dar una falsa impresión de retroregulación (como se vió en los cilindros de agar).

Al realizar las fermentaciones sólidas con las mutantes no productoras pen-, la intención fué confirmar si el efecto regulatorio visto anteriormente no era artificial debido al fenómeno de transacilación, y considerando que sí hay una degradación de penicilina exógena (V), y que paralelo a esto la síntesis de penicilina continúa aún en presencia de altas concentraciones de penicilina exógena, es posible que esa penicilina V se convierta en G y que esa sea la razón por la cual se detecten altas concentraciones de penicilina G con las dos más altas concentraciones de penicilina V.

Pensamos que entonces la transacilación pudiera ser un fenómeno químico. Lo que se descarta con los testigos empleados en las pruebas de fermentación sólida (cinéticas de degradación), pues no hay aparición de penicilina G. Otra posible explicación es que la transacilación puede ser enzimática, para la cual una prueba indicativa fué la obtención de las mutantes pen -, cuya alteración suponemos

esté en cualquier sitio menos en la aciltransferasa.

De esta forma pretendimos evaluar la actividad de esta enzima sin problemas ocasionados por la síntesis de penicilina G. El perfil de producción en presencia de penicilina V y AFA con las mutantes pen-, muestra como la penicilina añadida se fué degradando conforme transcurrió el cultivo llegando a degradarse casi totalmente. Mientras que en la F.S. con P₁-2 bajo las mismas condiciones el perfil de degradación casi se mantiene constante, lo que puede ser explicado al considerar que sí hubo producción de penicilina G y que se sumó a la penicilina V añadida, y al cuantificarse por bioensayo, nos muestra un perfil de la suma de V+G. Lo que entonces nos sugiere que en las concentraciones más altas 7500 y 10000 µg/ml, sí es probable que al haber una sobredosis de penicilina V ésta se convierta en penicilina G, y que por esto la posible regulación efectuada en estas concentraciones si este distorciónada por el efecto de transacilación.

Por otro lado los perfiles de producción de penicilina G en F.S. con las dos mutantes no productoras en presencia de AFA, indican que esta producción fué menor de 1 µg/ml considerándose esta producción despreciable, pero si es probable que en baja proporción se lleven a cabo reacciones no específicas que promuevan la formación de penicilina G en una muy baja proporción, o que algunas integrantes de la población no estén mutadas y sintetizen penicilina la cual se está detectando.

Tal efecto de transacilación como ya se mencionó anteriormente (introducción) requiere de la actividad de la enzima acil-CoA: Ac. 6-aminopenicilánico aciltransferasa (AAT), la cual se encarga de intercambiar el ω -aminoadipil de la cadena lateral de la Isopenicilina N por el ácido fenilacético, dando lugar a la penicilina G, requiriendo para su mayor actividad un pH de 8 y una temperatura de 25°C (Pruess and Johnson, 1967; Alvarez, *et.al.*, 1987). Por lo que según Mayer y Coghill (1946) un pH demasiado alto o excesivamente bajo (5-7.5), origina considerables pérdidas de penicilina.

Nestaas y Demain (1981), también apoyan este hecho ya que las cinéticas obtenidos por ellos, indicaron que la hidrólisis de la penicilina G en fermentación líquida fué muy alta a pH de 8 y muy baja a pH de 6. Si observámos nuestras cinéticas de pH veremos que finalizan entre 7.3 y 7.7 por lo que la tasa de hidrólisis muy probablemente sea baja, además también se debe considerar que se trata de una cepa diferente por lo que quizá también la hidrólisis pueda darse a otro pH. Aunado a esto no se encontraron diferencias en los perfiles de crecimiento, humedad, y velocidad de consumo de azúcares.

Todo lo anterior nos hace suponer que efectivamente el efecto de retroregulación también está presente en fermentación sólida (tanto en cilindros de agar como en fermentación con bagacillo de caña). Aunque parece ser que los umbrales de regulación entre las cepas prototipo no son tan diferentes entre sí, o bien que el rango establecido (5000 y 7500 μ g/ml) es tan amplio que no permite establecer diferencias menores.

Aunque sí es claro que el porcentaje de regulación de la producción de penicilina G está en función de la capacidad de producción de la cepa, es decir, que el clon P₁-4 (prototipo de alta eficiencia relativa) que produce en F.L. 975 µg/ml y 2000 µg/ml en F.S. es menos sensible a la retroregulación en F.S. que en F.L. de igual manera el clon P₁-2 que produjo en F.L. 645µg/ml en F.S. 450µg/ml sea más sensible al efecto de retroregulación en F.S.

Además de resultar muy interesante el hecho de que con 5000 µg/ml el porcentaje de regulación oscile entre el 50 y 70% pues en estudios realizados por Martín, et.al., en 1979 en F.L. reportan que la concentración de penicilina exógena requerida para la total inhibición de la síntesis de penicilina G, fué muy similar al nivel de producción alcanzado por las cepas manejadas. Sin embargo en nuestro trabajo no resultó ser así, ya que para que el clon P₁-2 suprimiera su síntesis se requirió de 10 veces la cantidad de penicilina sintetizada en condiciones normales y la P₁-4 requirió 2.5 veces su producción máxima lo que resulta ser una noticia muy importante ya que las concentraciones regulatorias en fermentación en estado sólido son proporcionalmente más altas que las reportadas para medio líquido (Martín, et.al., 1979).

V I I I . - C O N C L U S I O N E S .

A).- La penicilina exógena (V) no tiene efecto sobre la germinación de *P. chrysogenum* en cilindros de agar.

B).- La penicilina exógena (V) disminuye la producción de penicilina G en cilindros de agar, hasta determinada concentración.

C).- En fermentación sólida también existe el efecto de retroregulación, el cual es proporcional a la capacidad de producción de las cepas trabajadas.

D).- Los umbrales de regulación en F.S. parecen ser mucho mayores a los reportados en F.L.

I X. - N O M E N C L A T U R A .

AAA	Acido α -aminoadípico.
AFA	Acido fenilacético.
ATCC	American Type Culture Colection.
DNS	Acido 2-4-dinitrosalicílico.
DO	Densidad Optica.
FS	Fermentación Sólida.
FL	Fermentación Líquida.
gbsf	Gramos de bagacillo seco fermentado.
mM	Milimolar.
μ .o.	Microorganismo.
ps/pl	Producción relativa.
rpm	Revoluciones por minuto.

X.-B I B L I O G R A F I A.

- Aidoo, K.E., Hendry, R. and Wood, B.J.B. 1982. SOLID SUBSTRATE FERMENTATIONS. *Adv. Appl. Microbiol.* 28:201-212.
- Alvarez, E. E., Cantoral, J.M., Barredo, J.L. Díez, B. and Martín J.F. 1987. PURIFICATION TO HOMOGENEITY AND CHARACTERIZATION OF ACYL-COENZIME A: 6 AMINOPENICILLANIC ACID ACYLTRANSFERASE OF *Penicillium chrysogenum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31(11):1675-1682.
- Arima, K. and Uozumi, T. 1967. A NEW METHOD FOR ESTIMATION OF THE MYCELIAL WEIGHT IN KOJI. *Agr. Biol. Chem.* 31(1):119-123.
- Barrios-González, J., Tomasini, A. y Raimbault, M. (1986). VI CONGRESO NACIONAL DE INGENIERIA BIOQUIMICA. 27-30 de Abril. México, D.F.
- Barrios-González, J., Viniegra, G., Gutiérrez, M., Roussos, S. y Raimbault, M. 1988a. CERTIFICADO DE INVENCION. No. 17184 en trámite, México.
- Barrios-González, J., Tomasini, A. and Viniegra-González, G. López, J. 1988b. PENICILLIN PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION. *Biotech. Letter.* 10(11):193-798.
- 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.

Barrios-González, J., 1994. PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR FERMENTACION SOLIDA. *Tesis de Doctorado*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Bennet, J.W., and R. Bentley. 1992. BIOSYNTHESIS OF SECONDARY METABOLITES IN SOLID SUBSTRATE CULTIVATION. *Elsevier Applied Science*. pp:161-164.

Cannel, E. and Moo-Young, M. 1980. SOLID STATE FERMENTATION SYSTEM. *Process. Biochem.* 15:2-7.

Cuevas, P. F., Barragán, F., De la Peña, L., Cantú, R., Huesca, C., Sánchez, C., Hernández, F. de G. 1990. MEMORIAS DEL CURSO BETALACTAMICOS. *Asociación Farmacéutica Mexicana*, A.C., D.F. México. Julio 9-11.

Demain, A.L. and Masurekar, P.S. 1974. LYSINE INHIBITION OF *in vivo* HOMOCITRATE SYNTHESIS IN *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology*. 82:143-151.

Domínguez L.M.I., 1995. EFECTO DE LOS CONSTITUYENTES (SOPORTE, NUTRIENTES Y AGUA) SOBRE LA PRODUCCION DE PENICILINA EN FERMENTACION SOLIDA. *Tesis Profesional*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Freeman, B.A. 1986. Microbiología de Burrows. Capítulo 5. Agentes Quimioterapéuticos. 22a edición. Edit. Interamericana. pp:139-172.

Gordee, E.Z. and Day, L.E. 1972. EFFECT OF EXOGENOUS PENICILLIN ON PENICILLIN BIOSYNTHESIS. *Antimicrob. Ag. Chemoter.* 1:315-321.

Hesseltine, C.W. 1972. BIOTECHNOLOGY REPORT. SOLID STATE FERMENTATIONS. En: *Biotechnology and Bioengineering.* 14:517-532.

Hunter, D.R. and Segel, I.H., 1971. ACIDIC AND BASIC AMINOACID TRANSPORT SYSTEMS IN *Penicillium chrysogenum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 144:168-183.

Jermini, M.F.G and Demain, A.L., 1989. SOLID-STATE FERMENTATION FOR CEPHALOSPORIN PRODUCTION BY *Streptomyces clavuligerus* AND *Cephalosporium acremonium*. *Experientia.* 45(11-12):1061-1065.

Kaszab, I. and Enfors, S.O. 1981. THE τ -GLUTAMYL-CYSTEINE SYNTHETASE: A POSSIBLE CONNECTING POINT OF PRIMARY AND SECONDARY METABOLISM OF *Penicillium chrysogenum*. *Abstracts of the Second European congress of Biotechnology.* Eastbourne, England. pp:179.

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., Vázquez, G. and Sánchez, S. 1982. INDUCTION OF PENICILLIN BIOSYNTHESIS BY L-GLUTAMATE IN *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 105(1):172-178.

Luengo, J.M., Revilla, Villanueva, J.R. and Martín, J.F. (1979). LYSINE REGULATION OF PENICILLIN BIOSYNTHESIS IN LOW-PRODUCING AND INDUSTRIAL STRAINS OF *Penicillium chrysogenum*. *Journal of General Microbiology* 115:207-211.

Martín, J.F., Luengo, J.M., Revilla, G. 1979. BIOCHEMICAL GENETICS OF β -LACTAM ANTIBIOTIC BIOSYNTESIS. En: Genetics of Industrial Microorganisms. Ed. Sebek, O.J. *American Society for Microbiology*. Washington, D.C. pp.205-209.

Martín, J.F. and Demain, A.L. 1980. CONTROL OF ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS. *Microbiol. Rev.* 44(2):230-251.

Miller, G.L. 1959. USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGARS. *Anal. Chem.*, 31:426-428.

Nestaas, E. and Arnold, L. D. 1981. INFLUENCE OF PENICILLIN INSTABILITY ON INTERPRETATION OF FEEDBACK REGULATION EXPERIMENTS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12:170-172.

Ontiveros, C. 1993. MOLECULAR AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE PROMOTER REGION OF THE *Penicillium chrysogenum* ISOPENICILLIN N SYNTHETASE (pcbC) GENE. *Tesis de Doctorado*. Institut für Biotechnologie. Technische Universität. Francia.

Oriol, E., Schettino, B., Viniegra-González, G. and Rimbault, M. 1988a. SOLID-STATE CULTURE OF *Aspergillus niger* ON SOPORT. *J.Ferment. Technol.* 66(1):57-62.

Pandey, A. 1992. RECENT PROCESS DEVELOPMENTS IN SOLID-STATE FERMENTATION. *Process Biochem.* 27:109-117.

Pruess, D.L. and Johnson, M.J. 1967. PENICILLIN ACYLTRANSFERASE IN *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 94:1502-1508.

Queener, S. and Swartz, R. 1979. PENICILLINS: BIOSYNTHETIC AND SEMISYNTHETIC. En: Rose, A. H. ECONOMIC MICROBYOLOGY. SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. *Academic Press.* 3:35-122.

Ramesh, M.V., Lonsane, B.K., 1991. REGULATION OF α -AMYLASE PRODUCTION IN *Bacillus licheniformis* M27 BY ENZYME END-PRODUCTS IN SUBMERGED FERMENTATION AND ITS OVERCOMING IN SOLID STATE FERMENTATION SYSTEM. *Biotechnology letters.* 13(5):355-360.

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.

Rose, A. 1979. PRODUCTION AND INDUSTRIAL IMPORTANCE OF SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. En: Rose, A.H. ECONOMIC MICROBYOLOGY. SECONDARY PRODUCTS OF METABOLISM. *Academic Press.* 3:2-33.

Roussos, S. 1985. CROISSANCE DE *Trichoderma harzanium* PAR FERMENTATION EN MILIEU SOLIDE:PHYSIOLOGIE, SPORULATION ET PRODUCTION DE CELLULASES. *These de'Etat.* Université de'Axis. Marseille.I. 161 pp.

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, Canadá. Volúmen 3. 147-154.

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.

Saucedo-Castañeda. G. 1991. CONTROLE DU METABOLISM DE Schwanniomyces castelli CULTIVÉ SUR SUPPORT SOLIDE. *Tesis de Doctorado*. Université Montpellier. 68pp.

Trejo, M.R., 1986. PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS POR FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO. *Tesis Profesional*. Facultad de Química. Universidad Autónoma de México.

Viniegra-González, G. 1989. PERSPECTIVES AND LIMITATIONS OF SOLID FERMENTATION IN MEXICO. En: M. Raimbault (Editor). *SOLID STATE FERMENTATION IN BIOCONVERSION OF AGROINDUSTRIAL RAW MATERIALS*. ORSTOM, Montpellier, Francia. pp.67-72.

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.