

300627

UNIVERSIDAD LA SALLE

5
2ij

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

INCORPORADA A LA UNAM

"ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MECANISMOS DE REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA POR *Penicillium chrysogenum* EN FERMENTACION LIQUIDA Y FERMENTACION SOLIDA "

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA

BLANCA ESTELA GARCIA GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS: Q.B.P. GUADALUPE MORALES MEZA

MEXICO, D.F.

1997

**TRABAJO CON
VALIA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección de:

D. en C. Javier Barrios González

M. en C. Armando Mejía Álvarez

en el Laboratorio de Investigación de Metabolismo Secundario, área de Microbiología. Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.

A mis padres y a Juan

Agradezco a: Mis padres y mi hermano por su apoyo y cariño.
A mis asesores de tesis de la UAM quienes hicieron posible este trabajo.
A los Sres. Huarte por su apoyo y amistad.
A mis amigos por su ayuda y apoyo.

INDICE

RESUMEN	5
I. OBJETIVOS	6
II. INTRODUCCION	7
III. ANTECEDENTES	8
1. Fermentación	8
1.1. Fermentación líquida	8
1.2. Fermentación sólida	8
1.2.1. Definición	
1.2.2. Comparación entre FS y FL	
1.2.3. Tipos de microorganismos en FS	
1.2.4. Crecimiento y control del metabolismo en FS	
1.2.5. Aplicaciones	
2. Metabolismo Secundario	14
3. Penicilina	15
3.1 Biosíntesis de penicilina	15
3.2 Mecanismos de regulación de la biosíntesis de penicilina en fermentación líquida	18
3.2.1 Represión catabólica	
3.2.2 Regulación por amonio	
3.2.3 Regulación por lisina	
3.2.4 Regulación por producto	
3.3 Producción de penicilina por FL	20
3.4 Producción de penicilina por FS	20
IV. MATERIALES Y METODOS	22
V. RESULTADOS	27
1. Sistema de fermentación sólida para estudios de Regulación	27
2. Efecto de la glucosa en la regulación de la biosíntesis de penicilina en FL y FS	27
2.1. Regulación por carbono en Fermentación Líquida	30
2.2. Regulación por carbono en Fermentación Sólida	40
3. Efecto del amonio en la regulación de la biosíntesis de penicilina en FL y FS	48
3.1. Regulación por amonio en Fermentación Líquida	48
3.2. Regulación por amonio en Fermentación Sólida	48

VI. DISCUSION	60
1. Regulación por Carbono	60
2. Regulación por Nitrógeno	61
VII. CONCLUSIONES	63
VIII. BIBLIOGRAFIA	64
IX. INDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS	69

RESUMEN

Estudios recientes han reportado un sistema innovador de fermentación sólida para la producción de penicilina, que permite alcanzar concentraciones más elevadas del antibiótico (hasta 17 veces) comparadas con las obtenidas por fermentación líquida (sistema convencional de cultivo).

Con el fin de entender mejor la fisiología del microorganismo productor del antibiótico en este medio y poder así, evaluar el potencial del sistema se realizaron, en esta tesis, estudios comparativos de los mecanismos de regulación (por carbono y nitrógeno) de la biosíntesis de penicilina por *Penicillium chrysogenum* P-2 ATCC 48271 en fermentación sólida (utilizando bagacillo de caña lavado con medio definido absorbido) y en fermentación líquida.

Los resultados sugieren que la biosíntesis de penicilina está reprimida con una concentración de glucosa de 170 mM tanto en medio líquido como en medio sólido. La regulación por amonio se observó en un medio con 135 mM en fermentación sólida mientras que en fermentación líquida se observa con 175 mM de amonio.

Se concluye que los mecanismos que regulan la biosíntesis de penicilina en fermentación líquida (por carbono y nitrógeno) también la regulan en fermentación sólida y a umbrales similares, y que las diferencias de producción obtenidas entre ambos sistemas no se deben a estos mecanismos regulatorios. Debe haber otros aspectos de la fisiología que sí son diferentes en FS, pero que no han sido identificados por falta de estudios.

I. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

Establecer si los principales mecanismos de regulación de la biosíntesis de penicilina por *Penicillium chrysogenum*, que se conocen para fermentación líquida, regulan la producción en fermentación sólida.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Adaptar el sistema de fermentación sólida para realizar estudios de regulación.
- 2) Comparar el efecto regulatorio por glucosa y amonio en la biosíntesis de penicilina en fermentación líquida y fermentación sólida.
- 3) Determinar el umbral de concentración en que el metabolito ejerce su efecto regulatorio en FS y FL.

II. INTRODUCCION

La fermentación sólida (FS) es un método tradicional de cultivo empleado en la antigüedad, revalorizado y modernizado en los últimos 15 años, dando lugar a sistemas de FS no tradicionales y novedosos para la producción de enzimas, proteínas, ácido giberélico y otros, siendo de gran utilidad en muchos campos de aplicación en la industria alimentaria, farmacéutica y agropecuaria.

Como estudios innovadores para la producción de metabolitos secundarios por FS, en 1988, Barrios-González et al. desarrollaron un sistema novedoso de fermentación sólida con el uso de soportes inertes impregnados con medios de cultivo líquidos. Este sistema se adaptó exitosamente para la producción de penicilina, metabolito secundario, (Barrios-González et al., 1988b) mostrando un potencial económico importante, ya que al realizar una comparación entre fermentación líquida (FL) y fermentación sólida en condiciones similares, la producción de penicilina en FS, era 17 veces más alta y obtenida en la tercera parte del tiempo que en FL. Se observó un rendimiento siete veces mayor y una productividad volumétrica 8.5 veces superior. Con los estudios realizados se puede concluir que la fisiología del microorganismo en medio sólido puede ser muy diferente a la observada en medio líquido, en FS se requiere de medios de cultivo mas concentrados para alcanzar el crecimiento y producción adecuados. Adicionalmente, los medios de cultivo desarrollados para la FL pueden ser utilizados en FS y los productos obtenidos pueden ser recuperados (por extracción con solventes o por extrusión) y analizados. De esta manera, se pueden realizar comparaciones precisas entre los medios líquido y sólido.

A pesar de lo anterior, la fermentación sólida tiene un atraso tecnológico comparativo frente a la fermentación en medio líquido, debido a que su estudio y aplicación han comenzado recientemente.

El profundizar en estos conocimientos básicos de la fisiología del microorganismo y los factores que controlan la producción del antibiótico en FS aunados a otros estudios de este sistema, sentarán bases para el desarrollo de procesos de producción industrial y posteriormente el desarrollo de metodologías para el mejoramiento genético de cepas de alta producción.

III. ANTECEDENTES

1. FERMENTACION

El término "fermentación" se refiere al metabolismo anaerobio de carbohidratos en el cual el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria es el piruvato o algún derivado del mismo (Davis et al, 1980).

Actualmente, en el ámbito industrial, el término "fermentación" ha sido ampliado a cualquier proceso que consista en la obtención de un producto microbiano en un ambiente fisicoquímico adecuado (Wang, 1975), aún cuando el proceso involucre aireación forzada (Davis et al, 1980).

1.1. Fermentación líquida o sumergida (FL)

La fermentación líquida (FL) o cultivo sumergido se realiza con la inoculación del microorganismo deseado en un medio líquido que contiene los nutrientes necesarios para su desarrollo. En este cultivo, el agua constituye el vehículo en el cual se encuentran suspendidas las células y disueltos los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo. En procesos aerobios, es necesario incorporar el oxígeno mediante agitación y aireación forzada. La FL es altamente susceptible a contaminación bacteriana por lo que requiere de técnicas de esterilización costosas.

1.2. Fermentación sólida

1.2.1. Definición

El término Fermentación Sólida ha sido descrito por diversos autores a través de los años, Hesseltine en 1972 la describe como una fermentación en la que el sustrato no es líquido, Raimbault en 1980, como el crecimiento y el metabolismo de microorganismos sobre materiales sólidos, con una estructura organizada en la ausencia de líquido en forma libre; en 1982, Aidoo la define como todo cultivo que tiene lugar sobre un sustrato sólido o un soporte nutricionalmente inerte y en 1985, Lonsane et al, proporciona una definición más amplia y completa en la que lo describe como un cultivo microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida porosa en ausencia de escurrimiento de líquido. La matriz porosa puede ser un sustrato húmedo o un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes disueltos en una solución.

En base a esta definición, la FS se clasifica en dos tipos dependiendo de la función de la matriz sólida porosa:

a) Cultivo sólido con una fase sustrato-soporte:

En este cultivo, la fase sólida está constituida de un material generalmente amiláceo, lignocelulósico o proteico, que presenta simultáneamente las funciones de soporte y fuente de nutrientes. La mayor parte de las aplicaciones en FS utiliza este sistema.

b) Cultivo sólido con un soporte impregnado de un medio líquido.

Este es un proceso para el crecimiento microbiano asociado a la utilización de materiales impregnados en un soporte o matriz porosa inerte (p.e. bagacillo de caña de azúcar, aserrín de madera, esponja, poliuretano, resinas sintéticas y vermiculita), que permite evitar la degradación de la matriz sólida durante el crecimiento, asegurándose así las condiciones geométricas estables. Además, este sistema de FS, permite utilizar los mismos medios que se utilizan en FL, facilitando así las comparaciones con los cultivos sumergidos (FL) (Oriol et al, 1988).

La fermentación en medio sólido ha sido utilizada desde la antigüedad para la preparación de alimentos fermentados, el ensilaje y el composteo. El uso del koji para salsa de soya data de 1000 años A.C. y puede ser considerado como un prototipo de fermentación sólida (FS). Este consiste en cultivar *Aspergillus oryzae* en granos de soya para producir proteasas y amilasas, las cuales degradan las proteínas y convierten el almidón en azúcar. De esta manera, el material fermentado se utiliza para la producción de salsa de soya o para la producción posterior de vino de arroz o sake. Actualmente en Oriente estos procesos tradicionales están bien establecidos y son de gran interés para la industria agropecuaria, alimenticia, farmacéutica y química y representa un campo prometedor para el tratamiento de desechos sólidos.

En Occidente, a partir de los años cuarenta la FS fue reemplazada por la fermentación sumergida (FL), sin embargo; a partir de 1972, Hesseltine et al, estudiaron y describieron los procesos tradicionales de FS en Oriente e informaron de la importancia tecnológica de estos sistemas de cultivo (Hesseltine et al, 1972, 1977a y 1977b). A partir de esta fecha, se observó un repunte en el interés de la fermentación sólida, la cual se ha utilizado para producir micotoxinas en grandes cantidades en granos y otros productos de la agricultura (Hesseltine, 1972), enzimas y proteínas (Aidoo et al., 1982), y se han reportado también procesos de fermentación sólida para la producción de ácido giberélico (Kumard & Lonsane, 1987)

En 1980 Rimbault & Alazard desarrollaron un método para estudiar el crecimiento fúngico en fermentación sólida, el cual permite mejorar el control de las condiciones de cultivo. Esta técnica se ha utilizado en el desarrollo de un proceso de enriquecimiento proteico de harina de yuca por fermentación sólida (Rimbault et al., 1985), se ha aplicado también en el desarrollo de procesos similares para la producción de: celulasas (Roussos, 1985), pectinasas (Trejo,

1985) y aflatoxinas (Barrios-González et al., 1986). Algunos de estos resultados se han llevado a escalas de hasta 30 Kg. en reactores (Huerta et al., 1985).

En 1988, Barrios-González et al., y Oriol et al., exploraron diferentes sistemas de fermentación sólida utilizando soportes inertes impregnados con medio líquido. Estos sistemas se utilizaron para evaluar la posibilidad de producir penicilina por fermentación sólida y determinar, en el caso de existir, las ventajas sobre la fermentación sumergida convencional, encontrando que la producción de penicilina en FS era 17 veces mayor que la obtenida en FL y se obtuvo en la tercera parte del tiempo; este trabajo se detalla posteriormente en este capítulo (ver 3.3. Producción de penicilina por FS).

1.2.2. Comparación entre FS y FL

La FS y la FL han sido comparadas por algunos autores (Lonsane et al., 1985; Mudget, 1986; Hesseltine, 1987). A continuación se describen las ventajas y desventajas que presenta la FS contra la FL:

Ventajas:

- a) Simplicidad del medio de cultivo, a menudo es suficiente con agregar agua.
- b) Disminución de contaminaciones bacterianas debido a la baja humedad del medio.
- c) Requieren menor energía de proceso que las correspondientes en FL.
- d) Proporciona ventajas selectivas para una gran variedad de hongos filamentosos y otros organismos como los actinomicetos que presentan crecimiento en forma micelial.
- e) Disminución de efluentes líquidos a tratar si el producto se utiliza directamente o bien, el producto se obtiene mas concentrado.
- f) Muchas veces utilización directa de sólidos fermentados.
- g) Para las fermentaciones tradicionales la microflora del soporte sirve como inóculo.
- h) Aireación fácil debida a la porosidad del material
- i) Volúmen menor del fermentador que en el cultivo líquido a cantidades iguales de sustrato.
- j) En muchos casos se obtiene mayor producción

Desventajas:

- a) Problemas de disipación de calor
- b) Regulación difícil de los parámetros de cultivo como pH.
- c) Adición difícil de nutrientes y agentes controladores.
- d) Falta de conocimientos básicos y tecnológicos

1.2.3. Tipos de microorganismos en FS.

Varios grupos de microorganismos son capaces de crecer en sustratos sólidos (Smith, 1985). Sin embargo, los hongos filamentosos tienen la mejor capacidad para crecer en ausencia de agua libre y presentan la ventaja adicional de invadir el soporte o sustrato sólido gracias a su crecimiento en forma apical y ramificada.

Las ventajas de crecimiento fúngico, ligadas a la geometría del sustrato utilizado, permite un crecimiento orientado en todas direcciones (incluyendo cierta penetración) de espacios libres, permitiendo el aprovisionamiento de nutrientes (Raimbault, 1980). En la práctica, los sustratos más comunes para procesos de FS son materiales amiláceos como granos y tubérculos, y lignocelulósicos como madera, paja y heno. Hongos de las Clases Phycomyces, Ascomycetes y Deuteromycetes han encontrado importancia práctica convirtiendo el almidón en azúcar. En particular varias especies de *Rhizopus*, *Mucor* y especialmente *Aspergillus* han sido utilizadas para producir biomasa, enzimas y micotoxinas.

1.2.4. Crecimiento y Control del metabolismo en Fermentación Sólida.

Patrones de crecimiento

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

En la mayor parte de las FS el crecimiento también se caracteriza por extensiones radiales de la hifa en la superficie de la matriz sólida, pero la dirección y la velocidad de crecimiento depende de la disponibilidad de nutrientes y la configuración geométrica de la matriz. La adhesión a la superficie juega un papel importante en el crecimiento y distribución del micelio. Muchos hongos filamentosos y levaduras secretan polisacáridos con propiedades adhesivas (Corpe, 1980).

Una característica adicional en los cultivos de hongos, es que los componentes celulares de un micelio o incluso de una sola hifa se encuentran en diferente estado fisiológico. La punta de la hifa contiene células jóvenes que se encuentran en la fase exponencial de crecimiento, mientras que las partes que no

crecen contienen células con un metabolismo lento o aún células muertas (Moo-Young, et al, 1983).

Aspectos fisiológicos

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

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

- i) la aireación y el mezclado,
- ii) el tamaño de partícula,
- iii) los nutrientes y
- iv) los factores ambientales: humedad, temperatura y pH
- v) la densidad del inóculo

En realidad estos son los mismos parámetros que se controlan en FL (excepto la humedad y el tamaño de partícula).

Efecto de los factores físicos

Importancia de la cantidad y de la actividad del agua. En FS la capacidad de retención de agua del soporte, determina la cantidad máxima de líquido presente en la fase sólida. Según Doelle (1985), la necesidad de agua de un microorganismo, puede expresarse cuantitativamente refiriéndose a la actividad de agua (A_w). El valor de este parámetro es de 1 para el agua pura y disminuye con la concentración de solutos. La A_w se define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el medio. En general se puede decir, que el crecimiento microbiano se puede dar en valores de A_w entre 0.6 y 0.99. El agua interviene en la constitución de los microorganismos y en FS también en la difusión de enzimas, nutrientes y productos a través de la matriz sólida (Oriol, 1987). El agua libre, no debe ser demasiado abundante para no reducir la porosidad del material y en consecuencia disminuir el intercambio gaseoso. Estos intercambios son debidos a la evaporación y a la producción de agua por el metabolismo.

1.2.5. Aplicaciones

Las aplicaciones de la FS se pueden dividir en:

- aquellas que se realizan con la flora natural, en las cuales, los sustratos sólidos de la naturaleza como residuos vegetales y animales, son degradados por varios procesos microbianos con en el composteo y ensilaje.

- aquellas en las que se utilizan cultivos puros, permitiendo mejorar el control sobre la utilización del sustrato y sobretodo, de la formación de los productos. (koji).

En la tabla 1 se dan ejemplos de procesos de campos de aplicación de FS.

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

Tabla 1. Campos de aplicación de la FS.

2. METABOLISMO SECUNDARIO

Los metabolitos secundarios microbianos, incluyen grupos de compuestos que han sido muy extensa y exitosamente utilizados como agentes quimioterapéuticos y farmacológicos.

Los metabolitos secundarios, no son esenciales para el crecimiento y su producción no está asociada con esta fase de desarrollo, en oposición a los metabolitos primarios, como aminoácidos, nucleótidos, lípidos y carbohidratos que son esenciales para el crecimiento del microorganismo. Los metabolitos secundarios microbianos son producidos durante la idiofase, etapa de mantenimiento que sigue a una etapa de crecimiento acelerado o trofofase, activada en una situación de estrés por la escasez de uno o varios nutrientes del medio como son: carbono, nitrógeno, fosfato, o elementos traza. Los nutrientes no limitantes pueden ser entonces, desviados hacia biosíntesis no relacionadas con el crecimiento.

A pesar de la enorme diversidad de estructuras químicas encontradas en los metabolitos secundarios microbianos, la mayoría de estos compuestos pueden ser agrupados según su origen biosintético como son:

- a) aminoácidos
- b) azúcares
- c) acetyl-CoA, intermediarios del ciclo de Krebs y compuestos relacionados
- d) terpenos (Rose, 1979)

La función de los metabolitos secundarios en el metabolismo celular es desconocida. Existen varias hipótesis para explicar la producción de metabolitos secundarios en microorganismos, las cuales han propuesto que estos metabolitos no son importantes para el crecimiento, sino que proporcionan una ventaja selectiva para el microorganismo. Se considera que éste, provee un mecanismo por medio del cual el exceso de intermediarios o aún el exceso de carbohidratos en el medio, pueden ser metabolizados durante condiciones de crecimiento adversas (Bu'lock, 1961). Tal mecanismo servirá para mantener a la célula en un estado funcional durante condiciones que evitan o dificultan el crecimiento.

Como ejemplo de los metabolitos secundarios, podemos mencionar los alcaloides del ergot, cuya síntesis comienza cuando se agota la fuente de fósforo del medio; la síntesis de giberelinas que se inicia al agotarse la fuente de nitrógeno y el caso de la penicilina, cuya síntesis se dispara al agotarse la fuente de carbono de utilización rápida, la glucosa (Wang et al, 1979).

Dentro del grupo de los metabolitos secundarios, un lugar destacado corresponde a los antibióticos, ya que han revolucionado la batalla que mantiene al hombre contra los microorganismos patógenos para él mismo, así como para animales o plantas. Dentro de estos antibióticos se encuentra la penicilina.

3. PENICILINA

La penicilina es el progenitor de los agentes quimioterápicos más importantes desarrollados en los últimos 50 años. Este, junto con las cefalosporinas y tetraciclinas son de gran importancia médica e industrial, por lo cual se han realizado amplias investigaciones sobre la biosíntesis de penicilina con el hongo *Penicillium chrysogenum*.

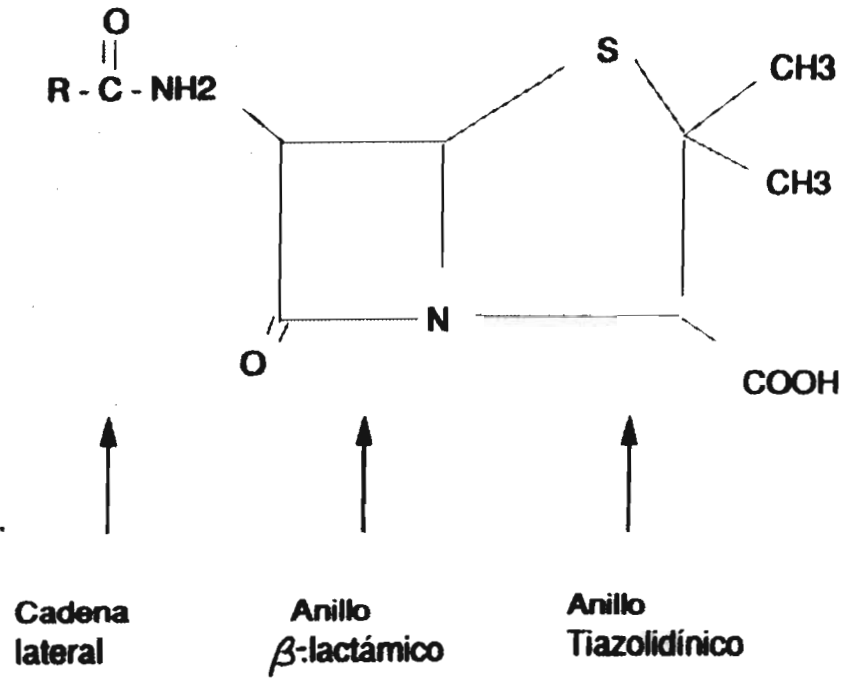
En la actualidad, se cuenta con una imagen coherente de la biosíntesis de este antibiótico realizada por el hongo *Penicillium chrysogenum*. Muchos de los principios derivados de estudios con *P. chrysogenum* y otros hongos productores de antibióticos relacionados, son aplicables a microorganismos productores de otros metabolitos secundarios (Ball, 1987).

3.1. Biosíntesis de penicilina

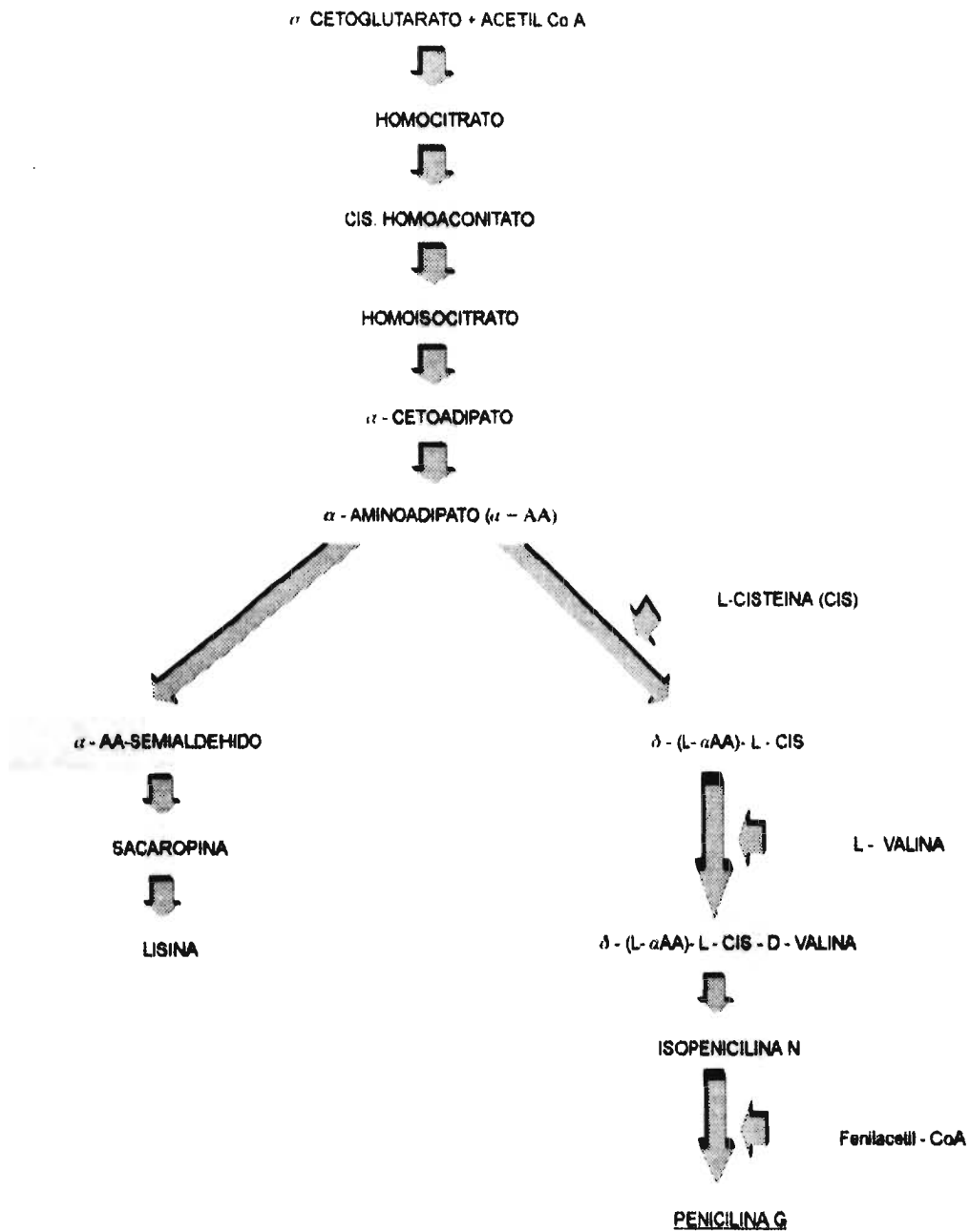
Las penicilinas forman parte de un grupo de antibióticos llamados β -lactámicos, en los cuales el anillo β -lactámico está fusionado a un anillo de cinco (tiazolidina) o seis miembros (dihidrotiazina) respectivamente (Esquema 1) (Chain, 1948; Abraham & Newton, 1961). El núcleo de la penicilina puede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

La ruta biosintética de la penicilina es ramificada, presenta una rama común hacia la formación de un metabolito primario (lisina) y hacia el otro lado, la formación del metabolito secundario (Martin, 1980), (Esquema 2).

El ácido α -aminoadípico es el precursor de ambos metabolitos. El primer paso en la biosíntesis de la penicilina es catalizado por la enzima δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteína sintetasa, que lleva a cabo la unión de α -aminoadípico con el aminoácido L-cisteína, para formar el primer intermediario de la vía. Este se condensa con el aminoácido L-valina para formar el tripéptido L- α -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina (ACV). En la actualidad, 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. Posteriormente 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 el grupo α -aminoadípico 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, activado en la forma fenilacetil CoA y da origen a la penicilina G o bencilpenicilina, producto final de la vía (Martin, 1980).



Esquema 1. Estructura química de las penicilinas



Esquema 2. Rutas biosintéticas de L-*lisina* y *penicilina G* en *Penicillium chrysogenum*

Penicillium chrysogenum, puede producir varios tipos de penicilina de acuerdo con el ácido carboxílico apropiado adicionado al medio de fermentación. Para que el ácido carboxílico sea incorporado biológicamente en la penicilina, debe poseer un metileno adyacente al grupo carboxilo. (Casida, 1964).

3.2. Mecanismos de regulación de la biosíntesis de penicilina en fermentación líquida.

Los mecanismos que regulan la biosíntesis de la penicilina para *Penicillium chrysogenum* en cultivo líquido son los siguientes:

- Represión catabólica
- Regulación por amonio
- Regulación por lisina
- Regulación por producto

3.2.1. Represión catabólica

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

Este fenómeno, que es similar al inicialmente llamado "efecto de la glucosa", es ahora entendido en términos de regulación catabólica (Martin & Aharonowitz, 1983).

La regulación catabólica de la biosíntesis de antibióticos es un mecanismo general que controla la síntesis de antibióticos de diferentes grupos biosintéticos incluyendo la actinomicina, puromicina, cefalosporina y penicilina.

Penicillium chrysogenum requiere de glucosa para su crecimiento (metabolismo primario), al agotarse esta fuente de carbono de rápida utilización, inicia la biosíntesis de penicilina utilizando una fuente de carbono de lenta asimilación (disacáridos). En 1964, Casida reportó que el efecto regulatorio causado por la glucosa en la producción industrial de penicilina en FL, se evita suministrando el azúcar lentamente en el medio de cultivo.

En 1984, Revilla et al. observaron que, la glucosa a concentraciones de 28 - 140 mM ejerce un efecto de represión dependiente de la concentración, mas no

de inhibición sobre las enzimas de la biosíntesis de penicilina y en 1986, encontraron que:

- La glucosa reprime la formación del tripéptido ACV reprimiendo a la enzima ACV sintetasa. La adición de ácido α -aminoadípico, cisteína y valina no revierten el efecto.

- La glucosa disminuye la tasa metabólica de ácido α -aminoadípico ya que se incrementan los niveles de homocitrato sintetasa y sacarofina deshidrogenasa (enzimas de la biosíntesis de la lisina involucradas en la formación y conversión del ácido α -aminoadípico en lisina); y estimula la incorporación de lisina en proteínas.

- La glucosa reprime a la isopenicilina N sintetasa.

- La glucosa no afecta a la aciltransferasa.

3.2.2. Regulación por amonio

Penicillium chrysogenum, posee diferentes sistemas de transporte para diferentes fuentes de nitrógeno, en ausencia de fuentes de nitrógeno orgánico, puede utilizar amonio como única fuente de nitrógeno para su crecimiento y reproducción. El amonio es asimilado como glutamato o glutamina por medio de la NADP-glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa y su transporte es inhibido por retroalimentación por niveles intracelulares de glutamina (Sánchez et al, 1988).

El amonio regula enzimas de la biosíntesis de la penicilina, mas no se conoce si su efecto es por represión, inhibición o una combinación de ambos. Sanchez et al, en 1981 reportaron que el hongo produce penicilina cuando se encuentra en un medio definido con 8.5 mM de NH_4Cl como única fuente de nitrógeno, pero su formación se reduce severamente en un medio con una concentración de 100 mM. Ocurre el mismo efecto con sulfato de amonio. No se observa efecto sobre isopenicilina N sintetasa, pero la ACV sintetasa disminuye severamente (Sánchez et al, 1981).

3.2.3. Regulación por lisina

La L-lisina tiene la capacidad de inhibir la síntesis de penicilina, inhibiendo la formación de α -aminoadipato a través de regulación por retroalimentación de homocitrato sintetasa. Este efecto puede ser revertido con la adición de ácido α -aminoadípico, compuesto que estimula la formación del antibiótico (Luengo et al, 1979).

3.2.3. Regulación por producto

El término de la síntesis de penicilina durante la fermentación, está relacionada con la acumulación de la misma. La adición de penicilina exógena a cualquier tiempo durante una fermentación, limita su acumulación subsecuente. La cantidad de penicilina exógena que inhibe la síntesis de la penicilina, depende de la capacidad sintetizadora de la cepa de *Penicillium*; ésto sugiere que el potencial de producción de un antibiótico debe estar regulado genéticamente por un mecanismo de regulación de inhibición por producto. Es posible que las cepas superproductoras tengan una mutación en la que se alteró la regulación o sensibilidad de alguna enzima de la biosíntesis de penicilina (Gordée, 1972).

3.3. Producción de penicilina por FL

En la actualidad, el proceso típico de producción industrial de penicilina, se realiza por fermentación en cultivo líquido, en el cual se inocula con *Penicillium chrysogenum* en un fermentador, que contiene una mezcla acuosa de los nutrientes orgánicos, consiste en un medio complejo, el cual en ocasiones es necesario reoptimizarlo para cada una de las nuevas mutantes superproductoras. Las formulaciones típicas incluyen glucosa o melazas en alimentación continua, sólidos de agua de cocimientos de maíz, aceite vegetal como antiespumante, precursores específicos como ácido fenilacético y en algunos casos, se enriquece el medio con sales inorgánicas. El medio puede ser esterilizado en el fermentador o fuera de él. La fermentación se lleva a cabo en dos etapas en las cuales se mantiene la temperatura a 25 °C, en la primera, se desarrolla el inóculo aumentando la biomasa, en la segunda se sintetiza el antibiótico, el proceso es aerobio con un suministro de oxígeno de 0.4 - 0.8 mmol/l/min. La producción máxima se obtiene entre los 6 y 8 días de fermentación (Sánchez et al, 1988). Este proceso requiere de equipos para mantener la temperatura deseada, la velocidad de agitación, pH y la dosificación de nutrientes adecuada.

3.4. Producción de penicilina for FS

Barrios-González, et al., en 1988, demostraron la posibilidad de producir penicilina por fermentación sólida. Se utilizó bagacillo de caña impregnado con medio de cultivo como el sistema de fermentación y el mismo medio de cultivo que el utilizado para la fermentación líquida o sumergida, los productos se recuperaron por extracción con solventes o por extrusión del bagacillo.

Adicionalmente, esta FS de la penicilina se realizó bajo condiciones no estériles sin problemas de contaminación o de degradación de producto, significando así que estas técnicas de cultivo permiten establecer las condiciones ambientales que proporcionan las ventajas ecológicas a los hongos. *Penicillium*

chrysogenum mostró una fisiología diferente en FS ya que requirió un medio mas concentrado para alcanzar el crecimiento y producción de penicilina adecuados y este efecto no se observa en la FL.

Finalmente se observó que el sistema de FS de penicilina, presentó una producción mayor de antibiótico en menor tiempo que en FL. En los resultados obtenidos (Tabla 2) se observa que, la producción de penicilina en FS es 17 veces mayor que la obtenida en FL y se obtuvo en la tercera parte del tiempo, la eficiencia de la utilización del azúcar para producir el antibiótico (Y p/s) fue 7 veces mayor en FS y la producción volumétrica es 8.7 veces mayor que en FL.

Sistema	Prod. máx. (U/ml)	Tiempo de P. máx. (Hrs)	Y p/s (U/mg)	Productividad (U/ml Hr)
FS	686	49	10.77	2.01
FL	38.5	166	1.5	0.23

Tabla 2. Comparación del desempeño de la producción de penicilina entre FS y FL (Barrios-González et al., 1988).

Estas ventajas, junto con los bajos requerimientos de energía de proceso (esterilización, agitación y aireación) indican que este sistema tiene un potencial industrial importante. Debido a lo anterior, se presume que la fisiología en sólido puede ser muy diferente que la observada en medio líquido por lo que requiere de mayores estudios.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. MICROORGANISMOS

En este estudio se utilizó la cepa de *Penicillium chrysogenum* P2 (ATCC 48271) en todas las fermentaciones. Como microorganismo indicador para bioensayo, se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

2. SELECCION Y CONSERVACION DE CEPAS.

Se realizó una purificación genética de la cepa *Penicillium chrysogenum*, para asegurar el mismo comportamiento del microorganismo durante el experimento mediante producción en cilindro de agar (ver sección 4.2 en este capítulo). La cepa seleccionada (clón) se conservó liofilizada y los cultivos de trabajo fueron mantenidos en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales con una solución de glicerol al 25 %.

3. MEDIOS DE CULTIVO

3.1. Medio de esporulación para *Bacillus subtilis*:

	(g/l)
Peptona	8
Extracto de carne	3
CaCl ₂ hasta una concentración 10^{-5} M a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.	
Agua destilada hasta	1000
pH = 7.2	

3.2. Para bioensayo con *B. subtilis* se utilizó agar de soya tripticaseína al 1 %.

3.3. Medio de esporulación para *P. chrysogenum*. Las esporas para cada experimento fueron producidas a partir de un vial con el que se inocularon matraces con medio de esporulación (Power) Barrios-González et al., (1993b) con la siguiente composición:

	(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 difco	2.5
Agua de cocimiento de maíz	0.25
Cloruro de sodio	2
Agar bacteriológico	20
Agua destilada hasta pH = 6.5	1000

3.4. Medios para la Fermentación líquida.

a) Como medio de crecimiento se utilizó el medio definido de Jarvis y Johnson (1974) con la siguiente composición:

	(g/l)
Glucosa	40
Sulfato de amonio	13
Carbonato de calcio	13
KH ₂ PO ₄	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02
Na ₂ SO ₄	0.5
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
Agua destilada hasta pH = 6.5	1000

b) Como medio de producción se utilizó el medio definido reportado por Luengo et al (1979) que consiste en:

	(g/l)
Glucosa	10
Sacarosa	10
Lactosa	30
Acido cítrico	10
Carbonato de calcio	10
Acido acético	2.5
Acido fenilacético	2
Etilamina	3
Sulfato de amonio	5
KH ₂ PO ₄	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01

CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01
MnSO ₄ .4H ₂ O	0.01
CoSO ₄ . 7H ₂ O	0.005
NaCl ₂	0.001
Agua destilada hasta pH = 6.8	1000

A este medio se le realizaron las siguientes modificaciones: se eliminó la sacarosa y se substituyó el sulfato de cobalto por cloruro de cobalto, manteniendo constante la molaridad del cobalto, de igual manera, la etilamina se substituyó por dietilamina en una relación equimolecular de amina.

3.5. Medios para la Fermentación sólida.

Los medios usados para impregnar el soporte sólido para FS fueron una modificación del medio de producción mencionado anteriormente; se duplicaron las concentraciones originales del medio y el pH se ajustó a 6, de manera que después de la esterilización el pH quedó en 6.5 en el medio sólido.

4. PRODUCCION DE PENICILINA

4.1 Bioensayo.

Para la evaluación de penicilina por bioensayo, se utilizaron cajas de acrílico de 30 x 30 cm. con 350 ml. de agar de soya tripticaseína inoculado con 0.2 ml. de una suspensión de esporas de *B. subtilis* (D.O. = 1 por c / 100 ml. de medio).

Se preparó una curva estándar de Penicilina G de 0.1 - 25 ug/ml. En las placas de bioensayo, con un sacabocados, se hicieron orificios de 8 mm. de diámetro, en los cuales, se colocaron 60 ul de la solución estándar o bien de la solución problema (medio con penicilina proveniente de la fermentación).

Se refrigeraron las placas a 4 °C durante 90 min (permitiendo así la difusión del antibiótico en el agar), y posteriormente se incubaron a 37 °C por 16 hrs (crecimiento del microorganismo indicador).

Finalmente se midieron los diámetros de los halos para calcular la concentración de penicilina (el diámetro del halo de inhibición es proporcional en forma logarítmica a la concentración del antibiótico). En los casos en los que los halos de la solución problema fueron mayores a los halos de la curva estándar, se realizaron las diluciones necesarias para obtener la concentración de penicilina.

4.2. Producción en cilindro de agar.

Para la evaluación de penicilina en cilindros de agar, se prepararon cajas de petri (9.5 cm) con 30 ml. de medio Power, de las cuales se obtuvieron cilindros de agar con un sacabocados de 8 mm. Los cilindros se colocaron en una caja de petri estéril vacía y se inocularon en el centro con esporas (de colonias aisladas y esporuladas de *P. chrysogenum*) utilizando un palillo de punta filosa. Las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 35 °C hasta esporulación (alrededor de 4 días). La producción se evaluó colocando estos cilindros sobre un bioensayo.

4.3. Producción por Fermentación líquida.

Para las fermentaciones sumergidas en líquido, se inocularon 50 ml. de medio de crecimiento contenidos en un matraz erlenmeyer de 250 ml con 10^6 esporas/ml. Los matraces se incubaron a 25 °C por 60 hrs. con agitación continua de 250 rpm. De este cultivo, se utilizaron 5 ml. para inocular 45 ml. de medio de producción contenidos en un matraz erlenmeyer de 250 ml. y se incubaron a 25 °C con agitación continua de 250 rpm.

4.4. Producción por Fermentación sólida.

Para los cultivos sólidos, se utilizó bagacillo de caña (obtenido como desecho de una fábrica de azúcar en Zacatecas, México) como soporte inerte. El bagacillo fue molido y tamizado en malla, utilizándose la fracción de 10-30 mesh, se preparó con 50 % de humedad y se esterilizó a 15 lb. de presión durante 15 min. El medio de cultivo estéril se inoculó con 10^6 esporas/ml y se utilizó para impregnar el soporte (bagacillo). Para cada experimento se abrió una ampollita de la cepa liofilizada, o se utilizó un vial con el que se inoculó el medio de esporulación. Una vez esporulado el cultivo, se suspendieron las esporas en agua estéril con las cuales se inocularon los medios líquidos de cultivo.

Una vez obtenido este medio sólido húmedo, se empaquetaron 11 g en fermentadores tubulares tipo Raimbault (1980) con una densidad de empaque de 0.032 g/cm^3 . Se incubaron a 25 °C con una velocidad de aireación de 2 l/h por columna ($0.17 \text{ l/h}^2 \text{ g}$ de medio húmedo).

Los cultivos sólidos se realizaron bajo condiciones no asépticas, de la manera descrita por Barrios-González, et al., (1988).

5. METODOS ANALITICOS

Las variables que se determinaron fueron:

- producción de penicilina por bioensayo y HPLC
- humedad por determinación de peso seco
- pH utilizando un potenciómetro
- concentración de biomasa, método gravimétrico
- concentración de azúcares reductores (método fenol-sulfúrico) y/o de glucosa (método de glucosa oxidasa en un autoanalizador de glucosa y L-lactato. Modelo 2000, PSY).

El muestreo se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces.

5.1. Fermentación líquida.

En fermentación líquida, a cada tiempo de muestreo, se recolectaron 2 matraces erlenmeyer y se filtró el cultivo. El sólido se secó en un horno a 60 °C por 48 hrs. y se determinó la biomasa. Con el líquido filtrado se realizaron la determinación de pH, azúcares reductores y/o glucosa así como la producción de penicilina utilizando 60 ul del filtrado para el bioensayo y cuantificación por HPLC.

5.2. Fermentación sólida.

En la fermentación sólida, a cada tiempo de muestreo, se recolectaron 2 fermentadores tubulares de los cuales, se determinó el pH en 1 g. de medio sólido agitado (con barra magnética) con 10 ml de agua destilada por 10 min. La determinación de penicilina se realizó mediante extracción de 0.5 g. del medio sólido con 3 ml. de solución buffer de fosfatos 0.1 mM, pH 5.5, se separó por centrifugación a 1700 rpm. por 20 min y se utilizaron 60 ul del extracto para determinar la concentración de penicilina por bioensayo y cuantificación por HPLC.

El resto del medio sólido se secó a 60 °C por 48 hrs. Con esta muestra se determinó el contenido de humedad por diferencia en pesos; para la determinación de azúcares reductores, se adicionaron 10 ml. de agua a 0.1 g. de bagacillo seco, y se realizó una extracción por agitación en vortex por 1 min., este sobrenadante se utilizó también para determinar la glucosa. Para determinar la concentración de biomasa (método gravimétrico) se pesó el contenido total del fermentador y se lavó en un buchner para eliminar los nutrientes, posteriormente se pesó una parte representativa (4g.) para calcular el incremento en peso del bagacillo seco.

V. RESULTADOS

1. SISTEMA DE FERMENTACION SOLIDA PARA ESTUDIOS DE REGULACION

En esta parte del proyecto se establecieron las condiciones para realizar estudios de regulación en FS. Estas condiciones incluyeron:

a) Uso de un medio de cultivo definido. Las fermentaciones en medio líquido, se realizaron con el medio sintético de crecimiento reportado por Jarvis & Johnson (1974) y el medio sintético de producción reportado por Luengo et al. (1979), a este último, se le realizó una modificación de la fuente de amina (etilamina reportada en el medio) por un nutriente de fácil adquisición en México. Esta evaluación se realizó manteniendo la relación equimolar de amina con los siguientes reactivos: NZ amina (nombre común), etanol amina, dietil amina y sulfato de amonio. En la Fig.1 se observa que la dietilamina presenta la mayor producción de penicilina en FL a las 100 hrs. de producción y, aunque el sulfato de amonio presenta una producción mayor a las 120 hrs., éste podría interferir posteriormente en los estudios de regulación por amonio. En base a esto, la etilamina se sustituyó por dietilamina y esta modificación se utilizó para todos los estudios de regulación realizados en este trabajo.

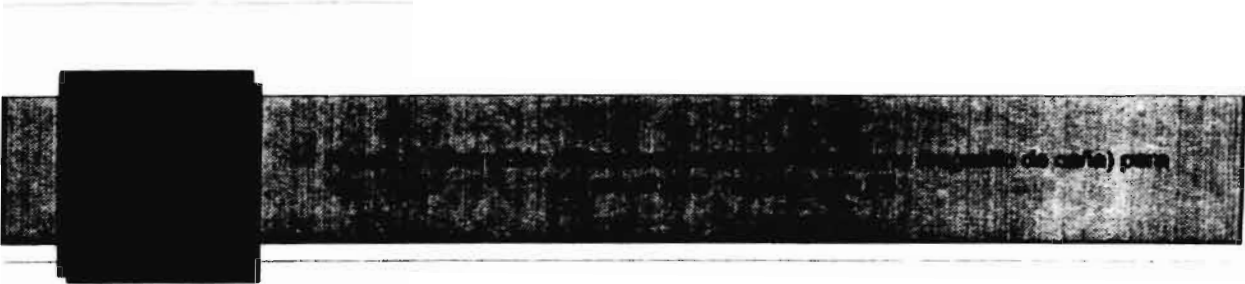
El medio utilizado para impregnar el soporte lavado para la fermentación sólida, fue una modificación del medio de producción arriba mencionado, se duplicaron las concentraciones originales de cada uno de los nutrientes a excepción del ácido fenilacético.

b) Eliminación de los azúcares residuales del bagacillo. Se encontraron como condiciones óptimas para eliminar los azúcares, las siguientes: adicionar 40 ml. de agua destilada por cada gramo de bagacillo tamizado y seco y calentar a 80 °C con agitación durante 15 min, filtrar y repetir la operación cuatro veces.

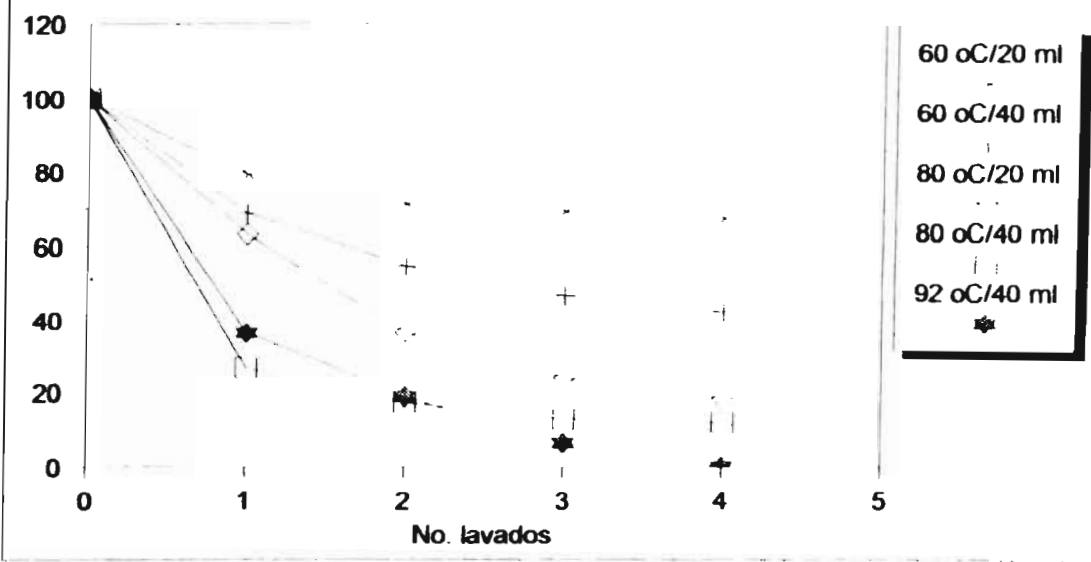
En la Fig. 2, se puede observar las diferentes condiciones de agua y temperatura probadas para la eliminación de los azúcares. La cuantificación de azúcares totales en el sobrenadante de cada lavado se realizó por el método fenol-sulfúrico.

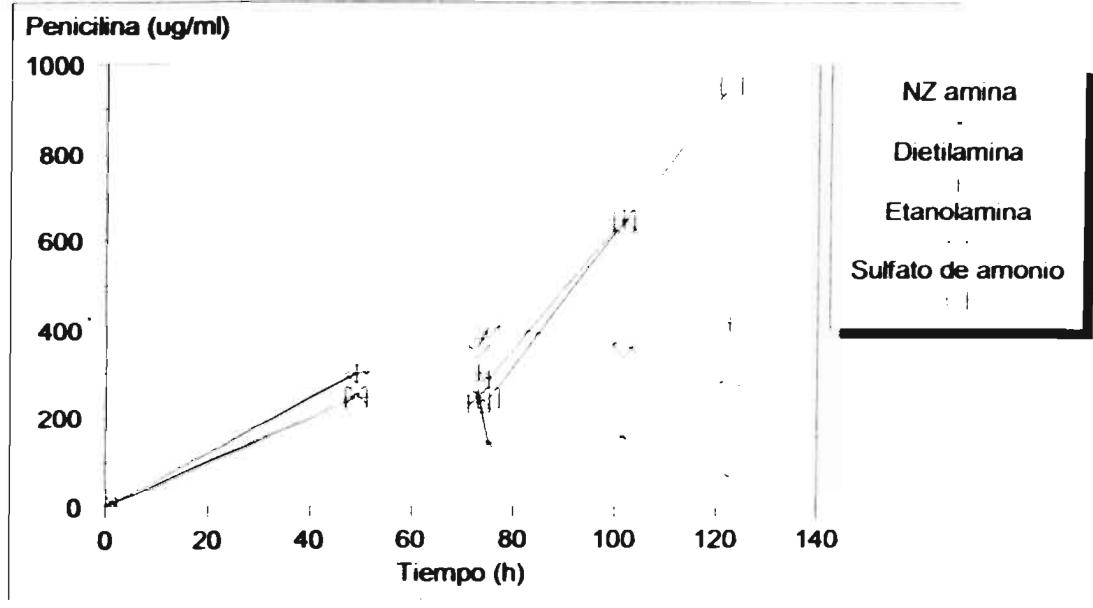
2. EFECTO DE LA GLUCOSA EN LA REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA EN FL Y FS.

Se realizó un estudio comparativo sobre el efecto regulatorio de la glucosa en la síntesis de penicilina por *P. chrysogenum*, P-2 en FS y FL.



Azúcares reductores (%)





2.1. Regulación por carbono en Fermentación Líquida.

En los experimentos iniciales de FL se suplementó el medio líquido de producción (conteniendo 3 % de lactosa) con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (112, 140 y 170 mM), en condiciones de C/N variable. En la Fig 3a se observa que en el cultivo con mayor concentración de glucosa, el inicio de la síntesis de penicilina sufre un retraso de alrededor de 15 hrs. al no encontrarse producción a las 20 y 28 hrs. El hecho de que el efecto regulatorio sólo se manifieste en ese período se puede explicar al observar la cinética de consumo de azúcares reductores (Fig. 3b), ya que las concentraciones de azúcares a las 47 hrs. son ya relativamente bajas y la diferencia de concentración (azúcares) entre tratamientos, se reduce hasta llegar a concentraciones similares a las 71 hrs. Es importante mencionar que el crecimiento (biomasa) como el pH no presentan diferencias importantes entre tratamientos (Fig. 3c y 3d).

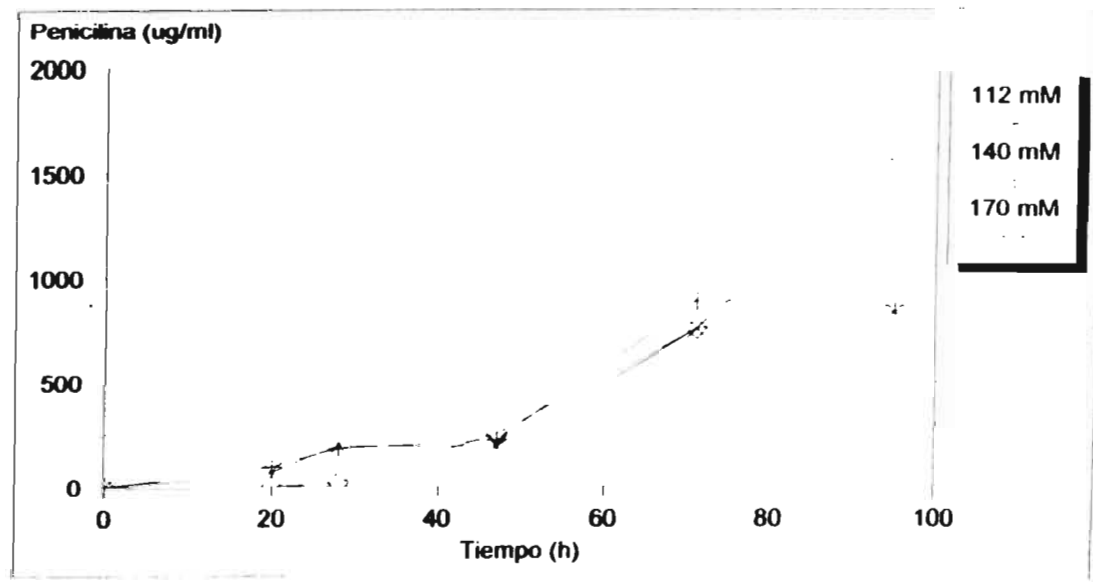
Con el objetivo de eliminar la fuente de variación adicional que representa el modificar la cantidad de nutrientes en la FS (disminución de contenido de soporte así como cambios en la densidad de empaque y capacidad de retención de agua del medio sólido), se estudió el efecto de la glucosa en medios con una concentración de nutrientes constante para comparar posteriormente este efecto en ambos sistemas.

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

En estos experimentos se cuantificó la concentración de glucosa en el medio de cultivo a los diferentes tiempos de muestreo. Al examinar la cinética de consumo (Fig. 4b) se encontró que, al iniciar la síntesis, el cultivo con 56 mM contiene 10 g de glucosa/l, mientras que el cultivo con 140 mM contiene 21 g de glucosa/l. Quince h después, el cultivo con 170 mM inicia la síntesis, con una concentración de glucosa de 14.3 g/l. También es posible ver que, cuando el cultivo con 170 mM inicial contiene 28 g de glucosa, la síntesis se encuentra reprimida.

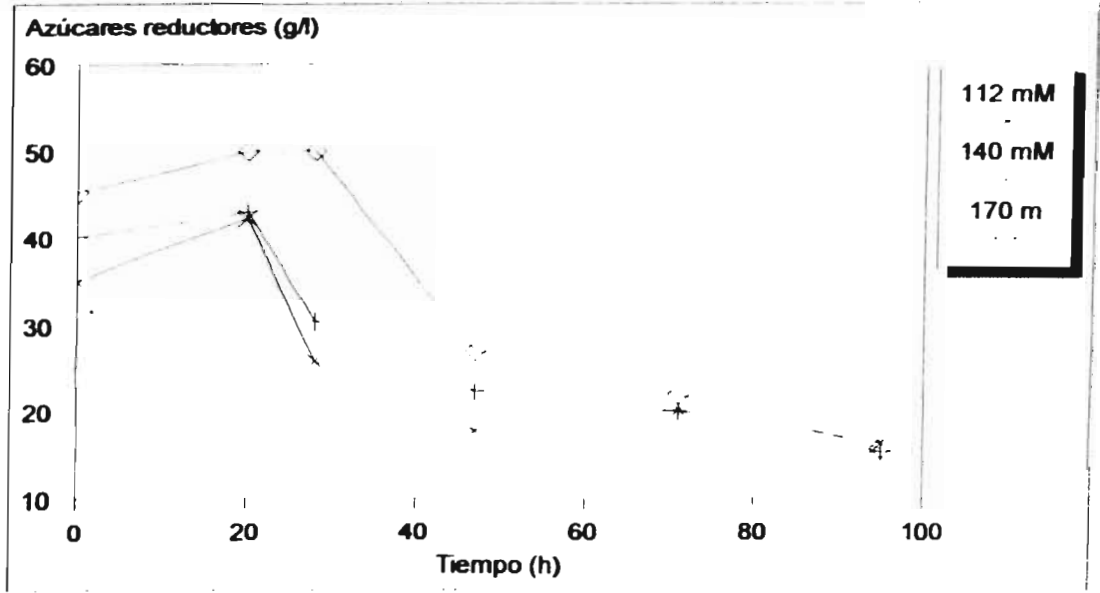
Ya que la concentración máxima de glucosa que produjo desrepresión fue 21 g/l y la mínima que causó represión fue 28 g/l, se estimó que el umbral regulatorio se encuentra, en estas condiciones, entre 20 y 28 g de glucosa/l. Por otro lado, la Fig. 4c indica que el perfil de biomasa no muestra diferencias entre tratamientos en el periodo entre las 4 y las 20 hrs. En la Fig. 4d se observa que no hay diferencias de pH entre los cultivos con 140 mM y con 170 mM, que son con los que se estimó el umbral.

[Redacted] **Penicilina (ug/ml) vs Tiempo (h) en fermentación líquida con relación CN variable.**



[Redacted]

**Estudio del consumo de nutrientes microbianos por *P. chrysogenum* P-2 en fermentación
de un sustrato rico en proteínas y con una relación C/N variable.**



Experimento 1-2 con diferentes
concentraciones de Ca^{2+} variable.

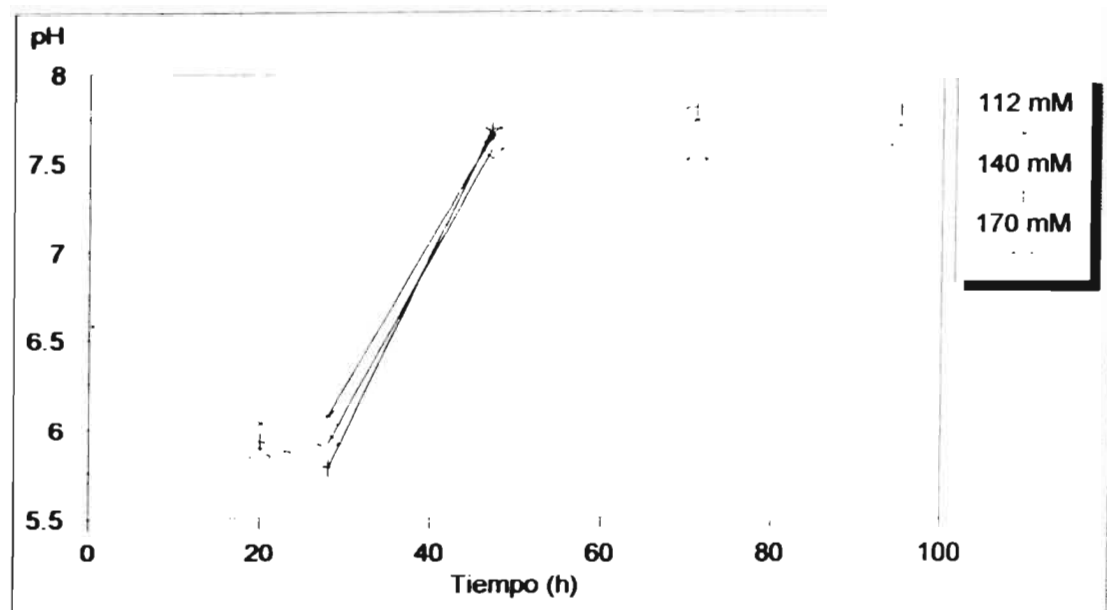
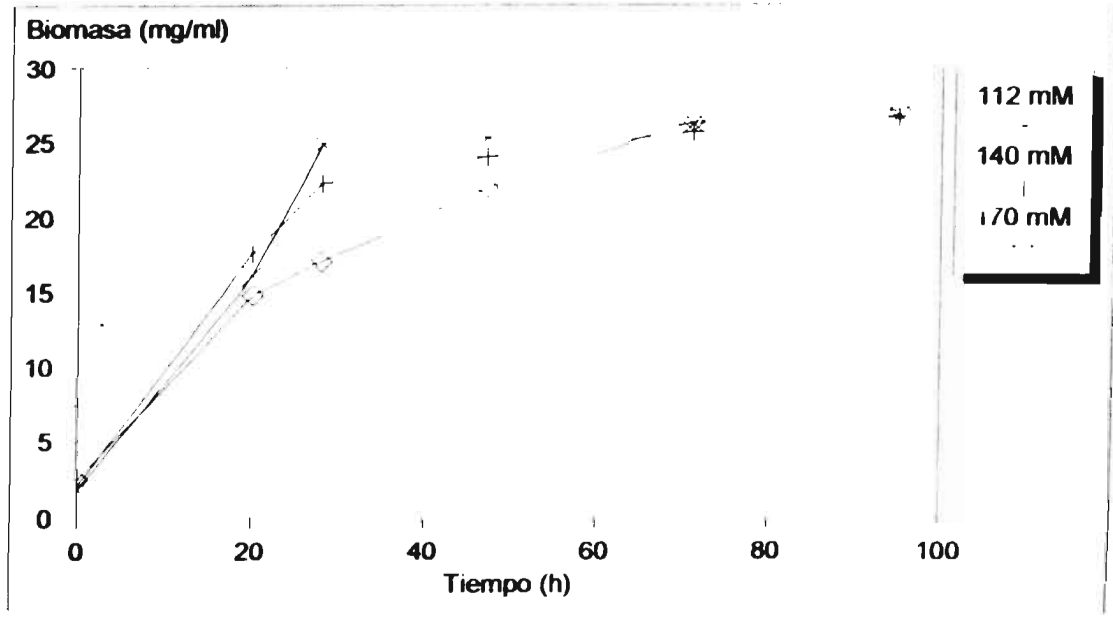
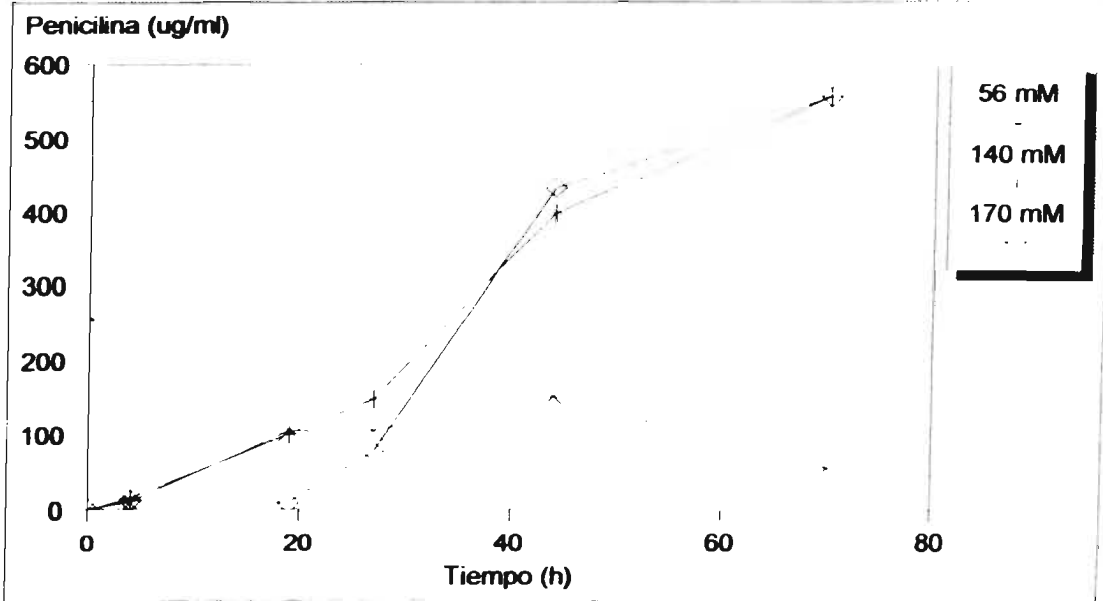


Figura 34. Crecimiento celular y biomasa de *Aspergillus niger* P-2 en fermentación
sólida con diferentes concentraciones de glucosa y una relación C/N variable.

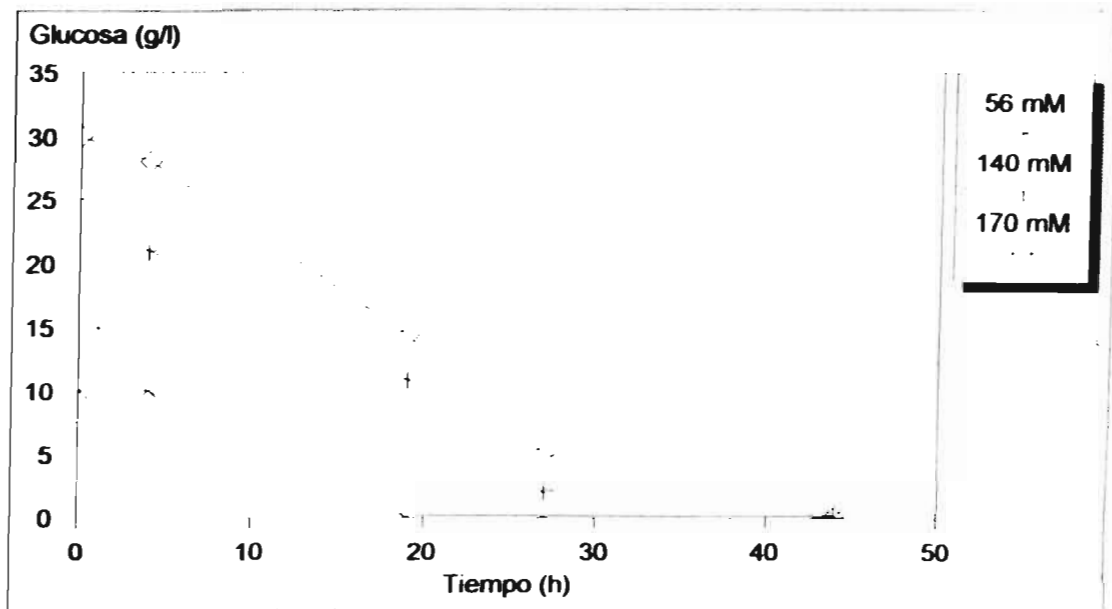


... fermentación líquida con
... CN constante.

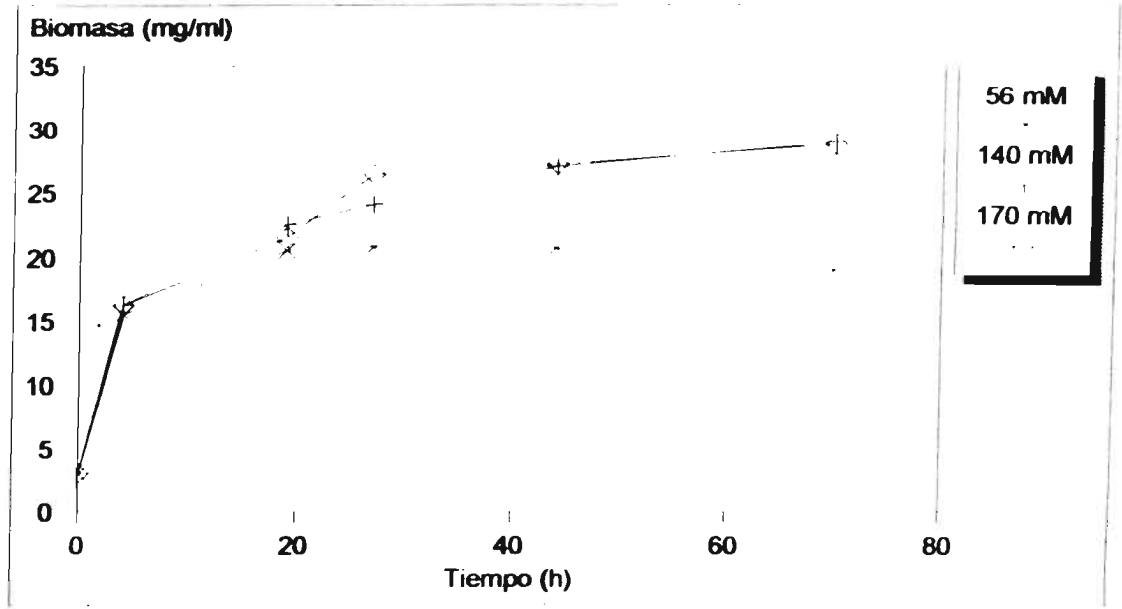


...

Figura 26. Consumo de glucosa por el *S. cerevisiae* en fermentación líquida con CO_2 constante y relación C/N constante.

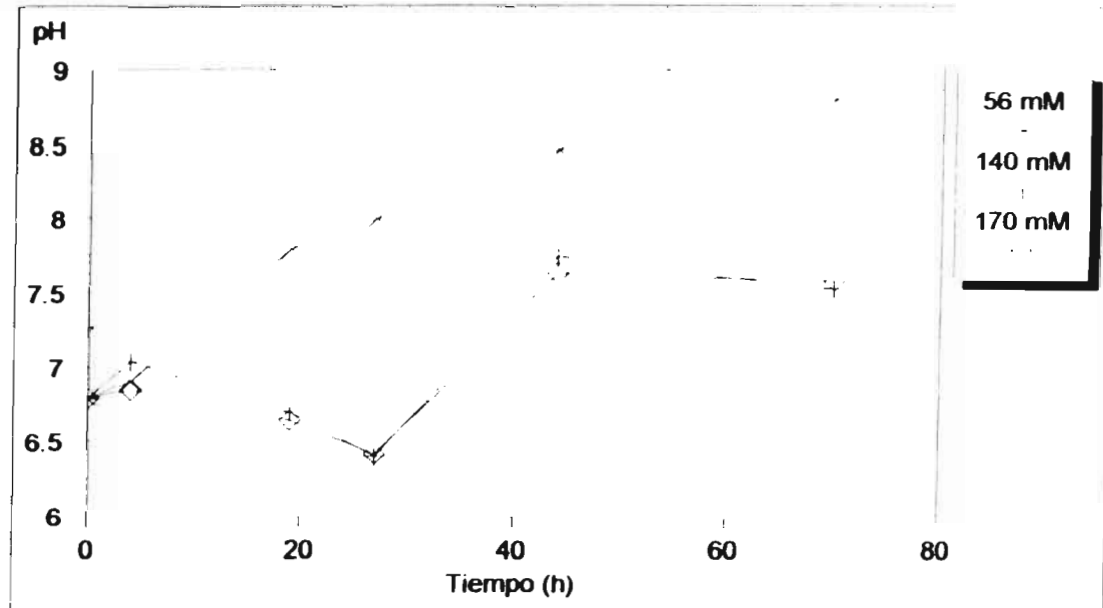


Proyecto de Investigación Biomasa y Gases de *P. putrescens* P-2 en fermentación
seguida por digestión anaeróbica para producción de biogás y una relación C/N constante.



Proyecto de Investigación Biomasa y Gases de *P. putrescens* P-2 en fermentación
seguida por digestión anaeróbica para producción de biogás y una relación C/N constante.

2 en fermentación
con CM constante



2.2. Regulación por carbono en Fermentación sólida.

Inicialmente se realizaron experimentos con C/N variable (concentración de lactosa constante) y altas concentraciones de glucosa (222, 334, 502 y 782 mM), pensando que la producción no se afectaría fácilmente. En la Fig. 5 se observa que en el cultivo con la concentración mayor no se detectó síntesis de penicilina, en el de 502 mM el inicio se retrasó hasta las 85 h. Además de estas observaciones, se confirmó que el cambio de relación bagacillo/nutrientes/agua ocasionaba fuertes diferencias en densidad y aspecto del material, por lo que se siguió con la estrategia de usar un contenido fijo de nutrientes (azúcares) en los diferentes tratamientos y de utilizar concentraciones menores de glucosa.

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

En estos experimentos, se observaron tasas de producción lentas seguidas por tasas rápidas, en lo que parece una desrepresión parcial y una desrepresión total de la síntesis (Fig 6a). Se puede decir que el período crítico es el comprendido entre las 70 y 84 h, ya que los cultivos con 112 y 170 mM se encontraban totalmente desreprimidos con concentraciones de glucosa por debajo de los 14.8 g/l (Fig. 6b). En ese período, el cultivo con 224 mM estaba parcialmente desreprimido, con concentraciones de glucosa que van de 38 g/l a 20.7 g/l. Es importante notar que en el período anterior, este cultivo se encontraba reprimido con concentraciones de glucosa entre 38-36 g/l.

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

Tampoco en este caso muestran, los valores de pH de los cultivos, diferencias importantes (Fig. 6c), lo mismo que las cinéticas de humedad. Este último parámetro se comportó de una manera normal para estas condiciones (bagacillo lavado y medio sintético): bajan ligeramente hasta las 70 h y después comienzan a subir hasta el final (Fig 6d).

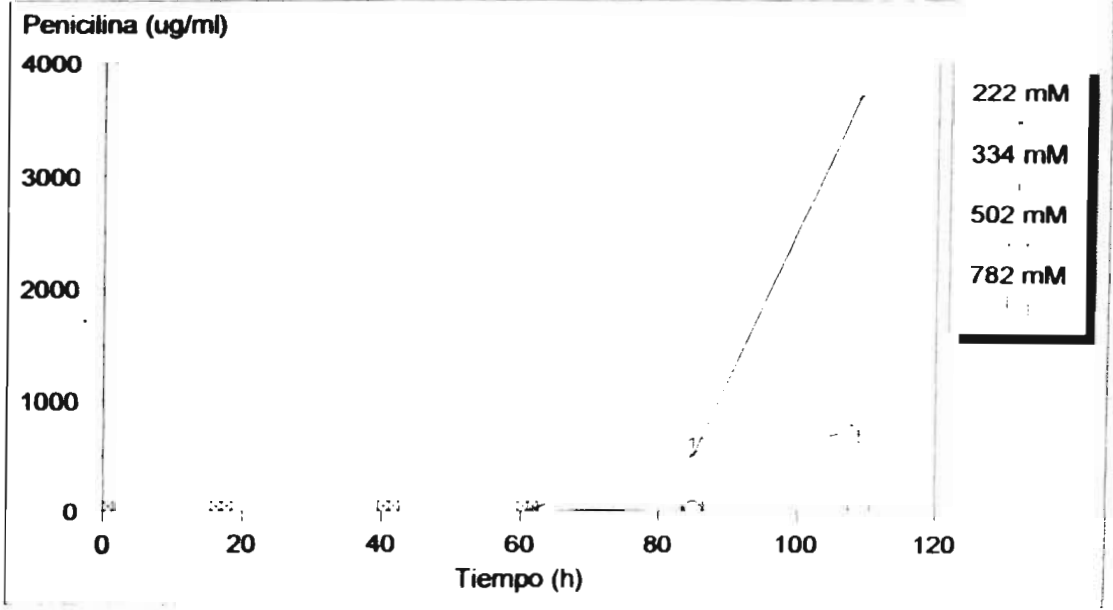
La concentraciones de biomasa parecen cercanas después de las 70 h (Fig 6e), aunque hay que recordar, que este método de cuantificación de biomasa (gravimétrico) no es muy confiable.

Sobre la tasa o velocidad de consumo de glucosa, es posible observar (Tabla 3) que ésta sube al incrementarse la concentración inicial del azúcar en FS. Sin embargo, el fenómeno es parecido en FL aunque menos acentuado

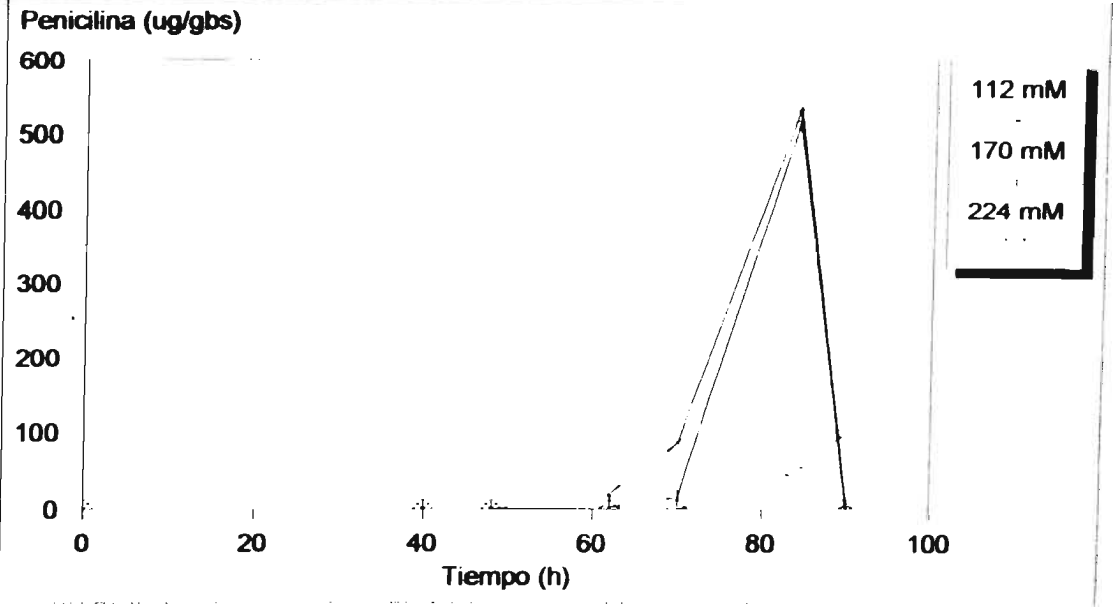
Sistema	Condiciones iniciales	Periodo (h)	Tasa de consumo de glucosa (g/l*h)
Fermentación Líquida	56 mM	4 a 19	0.66
	140 mM	0 a 27	0.85
	170 mM	0 a 27	0.92
Fermentación Sólida	112 mM	48 a 70	0.84
	170 mM	62 a 84	1.14
	224 mM	70 a 90	1.84

Tabla 3. Cálculo aproximado de las tasas de consumo de glucosa en FL y FS con diferentes concentraciones iniciales del azúcar

Figura 2. Producción de penicilina por *A. nidulans* P-2 en fermentación sólida con diferentes concentraciones iniciales de azúcar y una relación C/N variable.



[Redacted] en fermentaciones sólidas con [Redacted] (2M constante).



gbs = gramo de bagacillo seco

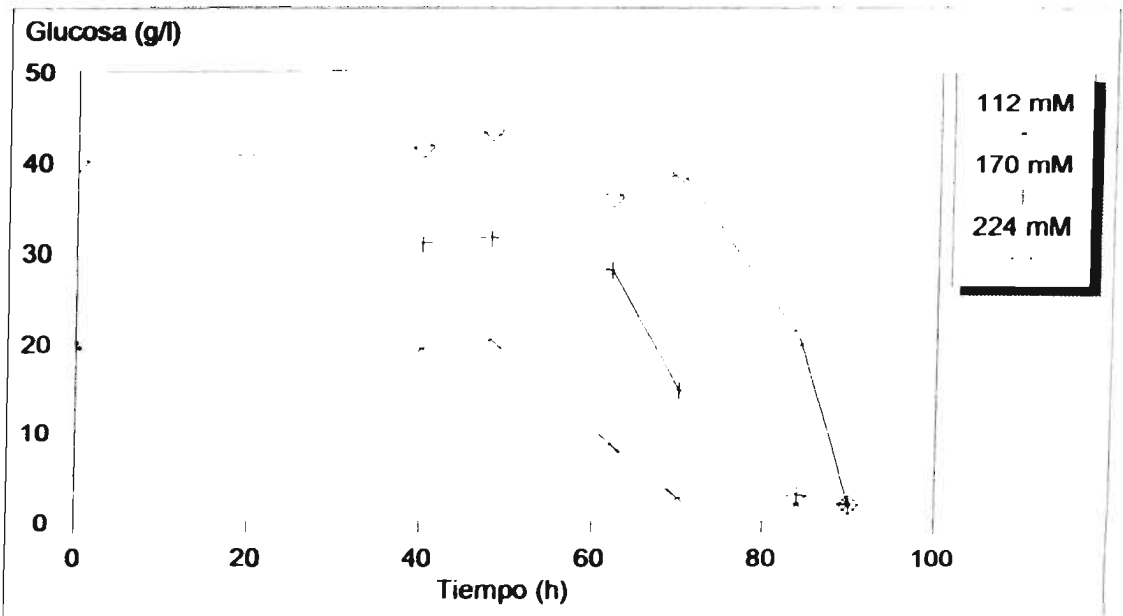


Figura 10. Evolución del pH durante el cultivo de *A. niger* P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glicerol (presión CAH constante).

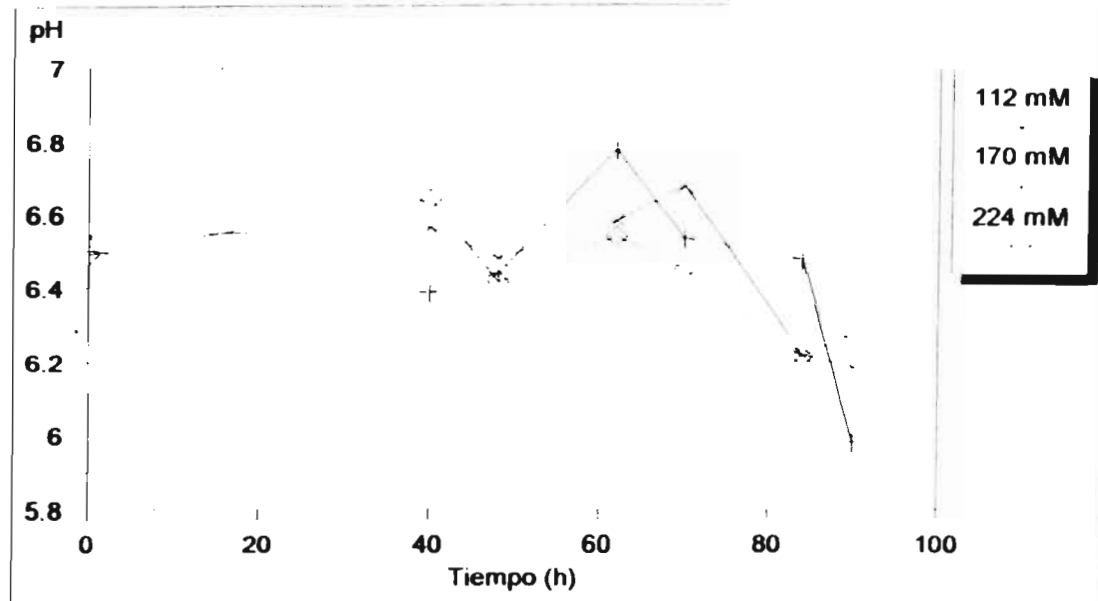


Figura 24. Comportamiento de la humedad durante el cultivo de *P. chrysogenum* P-2 en fermentación sólida en diferentes concentraciones iniciales de glucosa (112 mM, 170 mM y 224 mM).

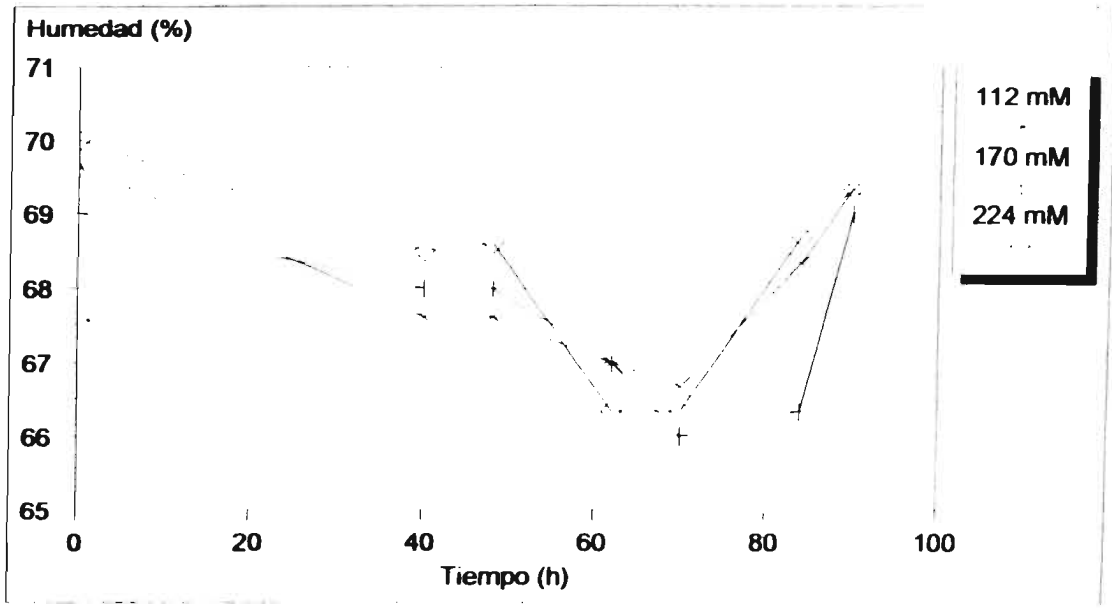
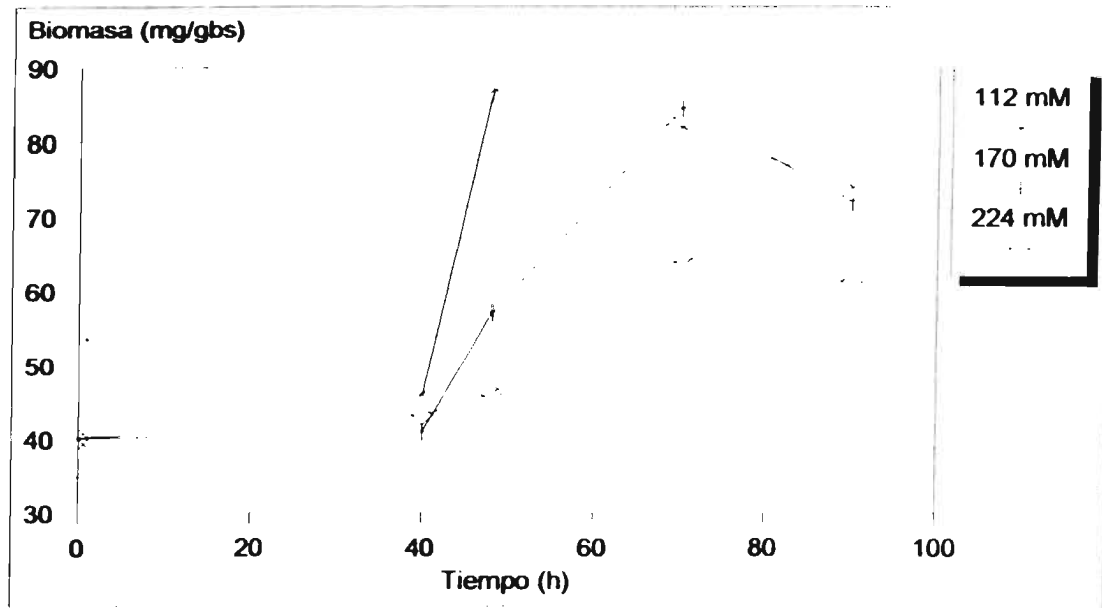


Figura 6a. Concentración de biomasa (biomasa gravimétrica) de *P. chrysogenum* P-2 en fermentaciones aéreas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (mM) en medio DFM aeróbico.



gbs = gramo de bagacillo seco

3. EFECTO DEL AMONIO EN LA REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PENICILINA EN FL Y FS.

Los estudios de regulación por Nitrógeno se realizaron suplementando el medio de cultivo con sulfato de amonio para lograr las concentraciones deseadas

3.1. Regulación por amonio en Fermentación Líquida.

En las primeras fermentaciones en medio líquido, se utilizaron concentraciones iniciales de amonio de 8.5 mM a 100 mM. Se observó que estas concentraciones de amonio no afectan las cinéticas de crecimiento (Fig. 7a) ni de pH (Fig. 7b), pero tampoco la de producción de penicilina (Fig. 7c).

Posteriormente se realizaron cultivos con mayores concentraciones de amonio: 75, 105, 145, 175 y 225 mM. Los resultados mostraron (Fig. 8a) un aparente efecto regulatorio de la síntesis de penicilina (visible como un retraso en el inicio de la síntesis durante las primeras 20 h) sólo con las concentraciones de 175 y 225 mM, pero no así con 145 mM e inferiores. Los cultivos con las concentraciones altas mostraron cinéticas de pH bastante diferentes, aunque a las 19 h, el pH de los cuatro cultivos fue similar (Fig. 8b).

Las cinéticas de crecimiento mostraron un pequeño pero creciente efecto inhibitorio del amonio, a partir de 105 mM (Fig. 8c). También fue posible detectar una diferencia en consumo de azúcares del control (75 mM), en relación con las concentraciones superiores (Fig. 8d).

3.2. Regulación por amonio en Fermentación sólida.

En FS se realizaron experimentos con diferentes concentraciones iniciales de amonio: 75, 135, 215, 275 y 375 mM. En la Fig. 9a, se muestra su efecto en la producción específica de penicilina. Es evidente que el inicio de la producción se va retrasando conforme aumenta la concentración de amonio a las 65 h. se observa claramente un aparente efecto regulatorio en los medios con una concentración inicial de 135 mM (y superiores), en contraste con el de 75 mM, en el que la biosíntesis ya va avanzada.

Las cinéticas de consumo de azúcares reductores indican que éstos fueron consumidos en forma similar en los cultivos con 75 y 135 mM (pequeño retraso en el de 135 mM), mientras que en concentraciones superiores se observa un notable retraso en el inicio del consumo, realizándose este a una tasa menor (Fig. 9b). También las cinéticas de humedad de las fermentaciones sólidas de 75 y 135 mM son parecidas (casi idénticas hasta las 90.h), mientras las de cultivos con concentraciones superiores son completamente diferentes (Fig. 9c). Sin embargo, las cinéticas de pH obtenidas con los distintos cultivos fueron diferentes (Fig. 9d). El cultivo con 75 mM de amonio muestra un pH de 6.7 a las 53 h., mientras que en ese tiempo, el de 135 mM tiene un valor de 7.4.

Experimentos Squid
pH = 100 mM

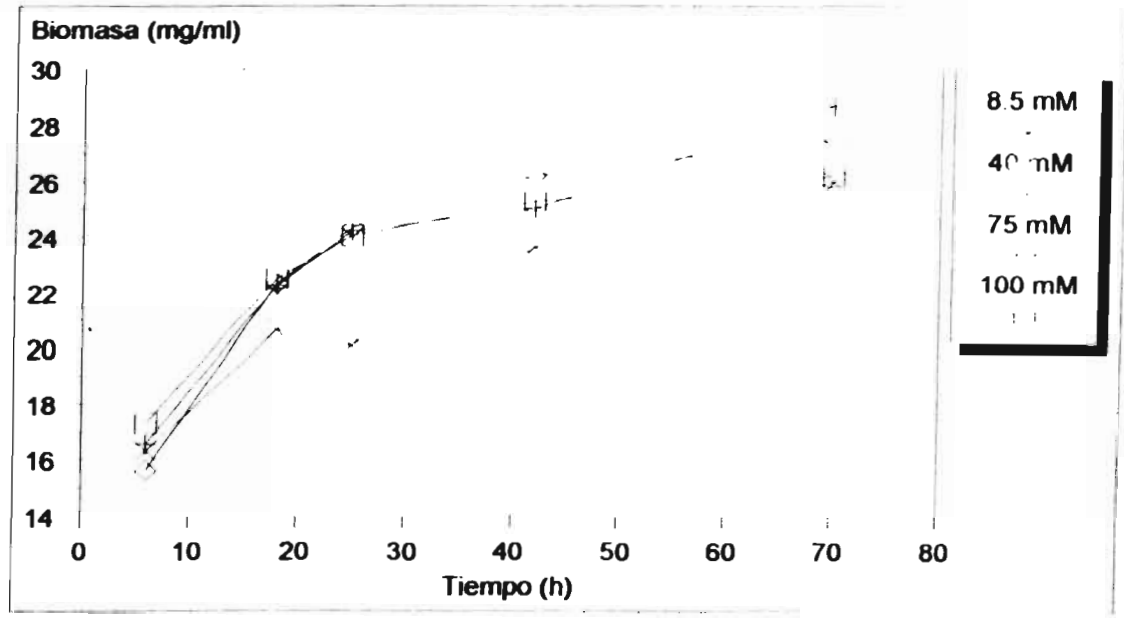
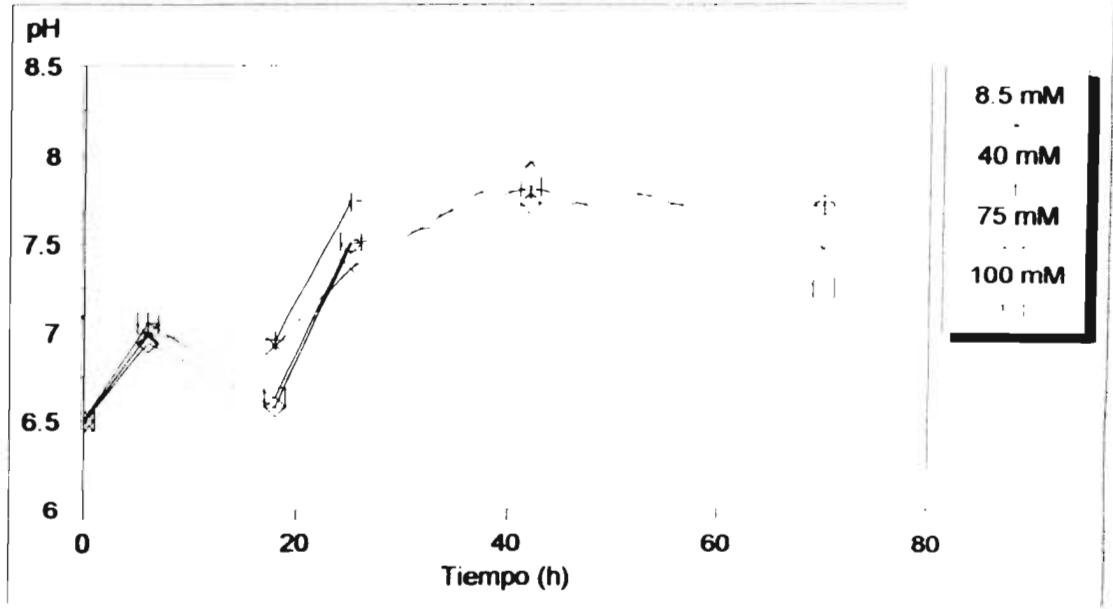
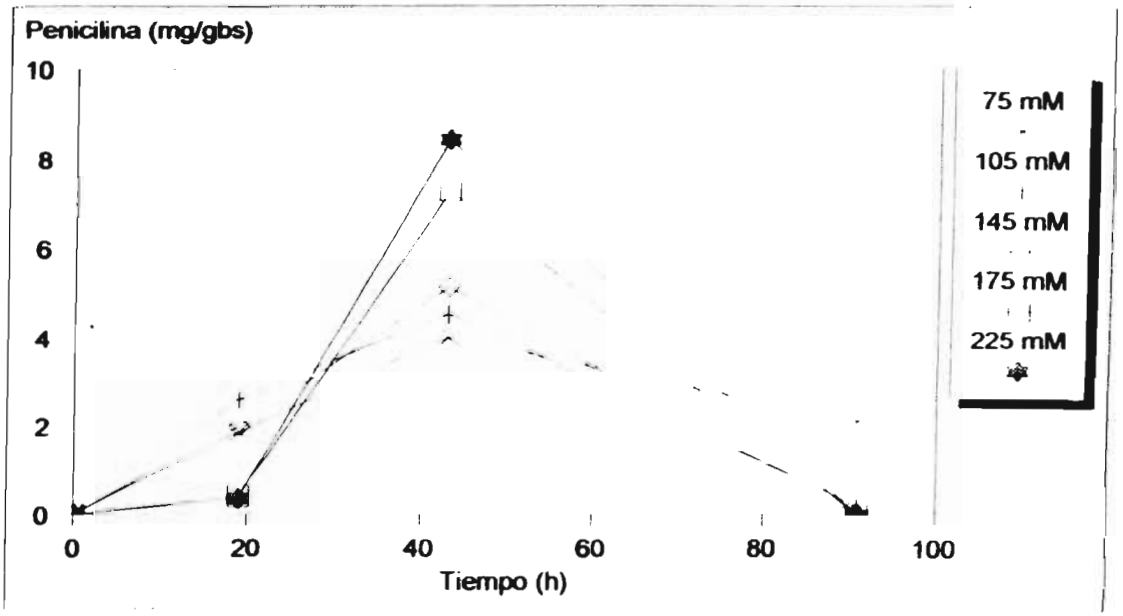


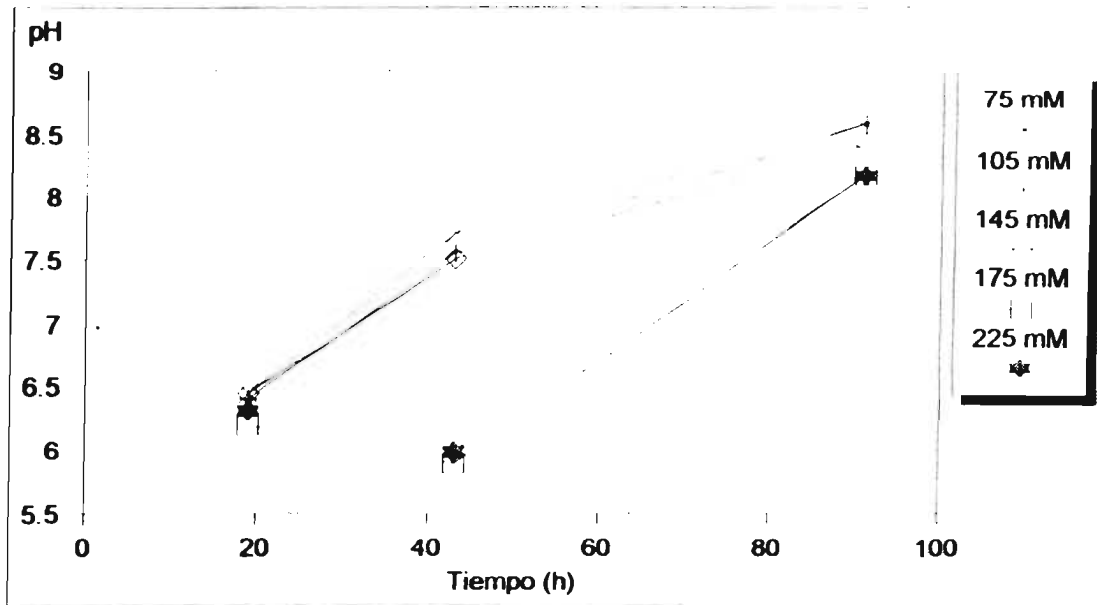
Figura 7b. Evolución de pH de las fermentaciones L1 en fermentaciones líquidas con sales de concentración inicial de nitrato (8.5 mM - 100 mM)

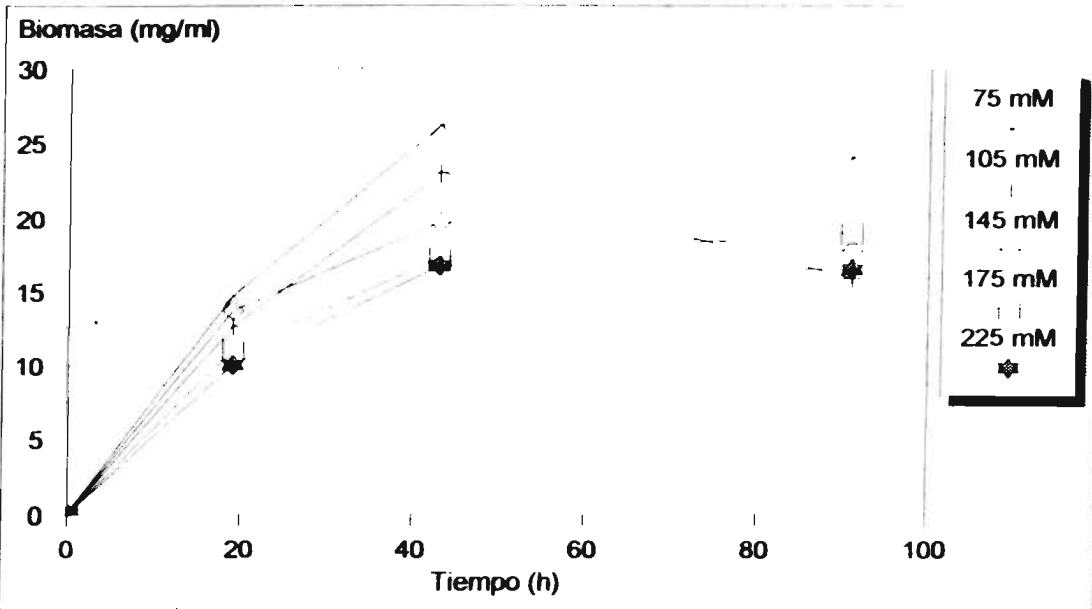


Penicilina (mg/gbs) vs. Tiempo (h) en medio líquido (FL) con [illegible] (225 mM)

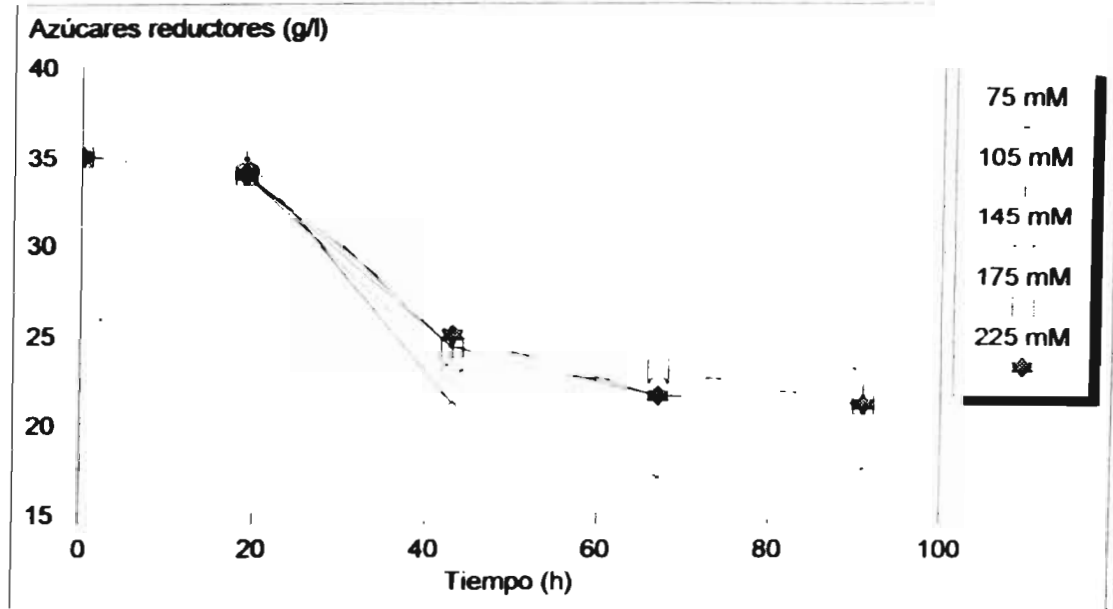


[Illegible text at the bottom of the page]



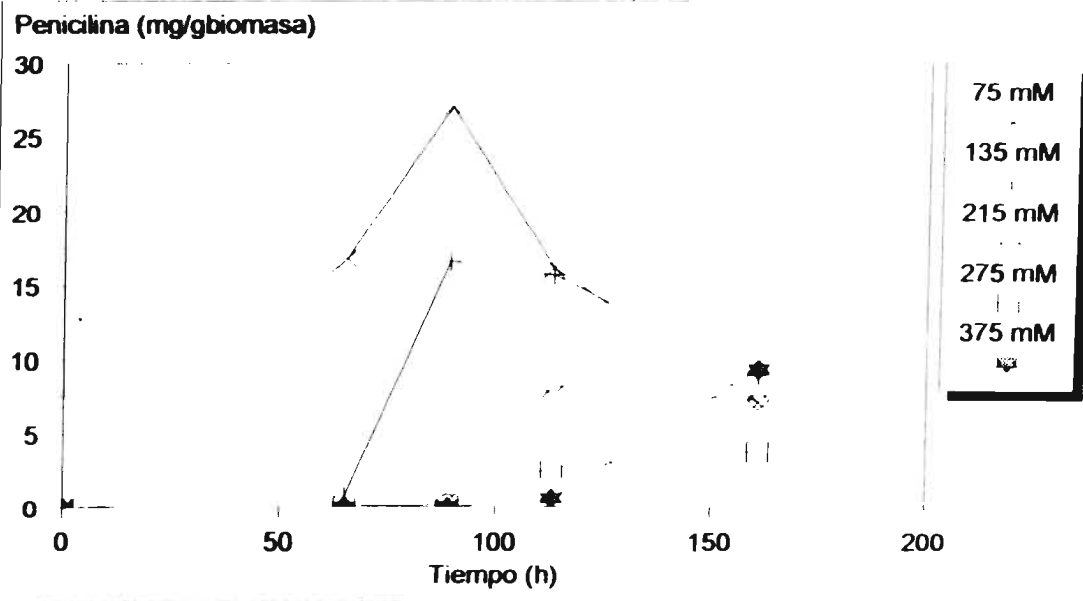


[Redacted header text]



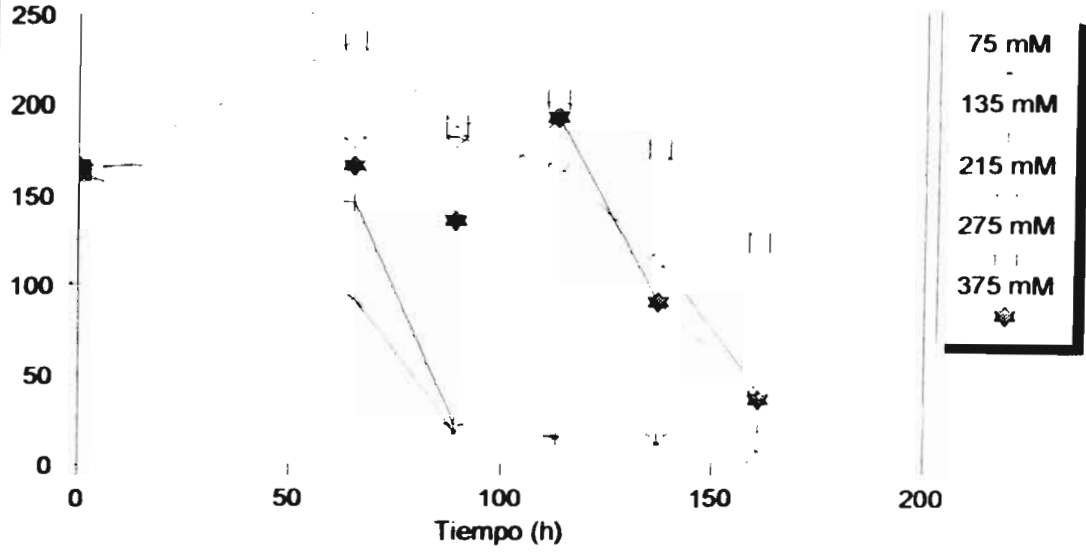
[Redacted footer text]

Figura 14. Producción de penicilina por *P. chrysogenum* P-2 en medio sólido (FS) con diferentes concentraciones de amoníaco.



[Redacted]

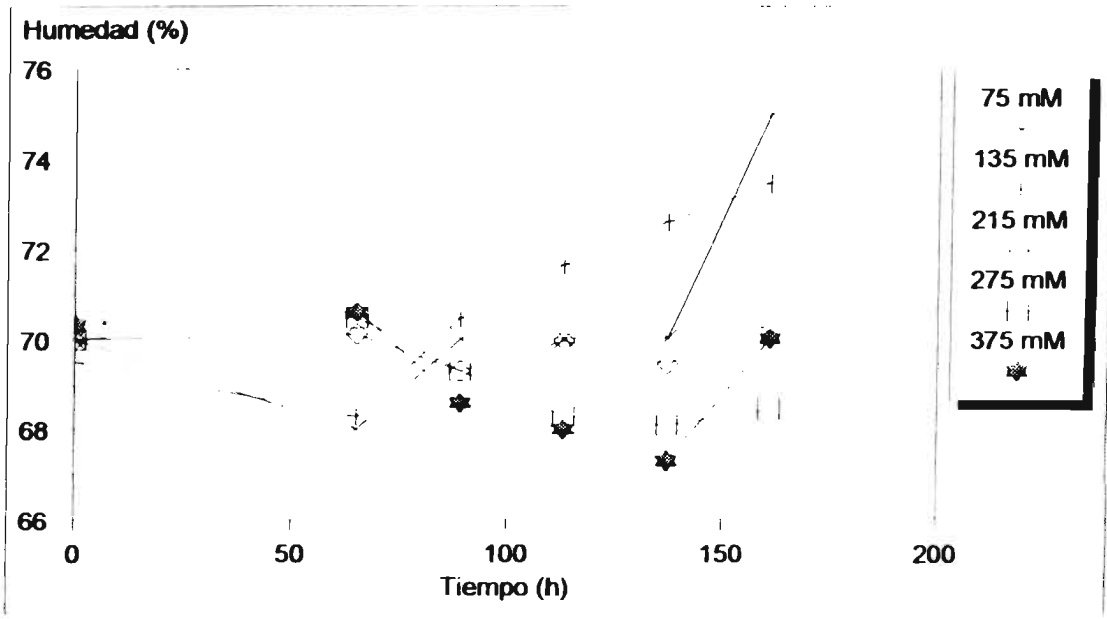
Azúcares reductores (mg/gbs)

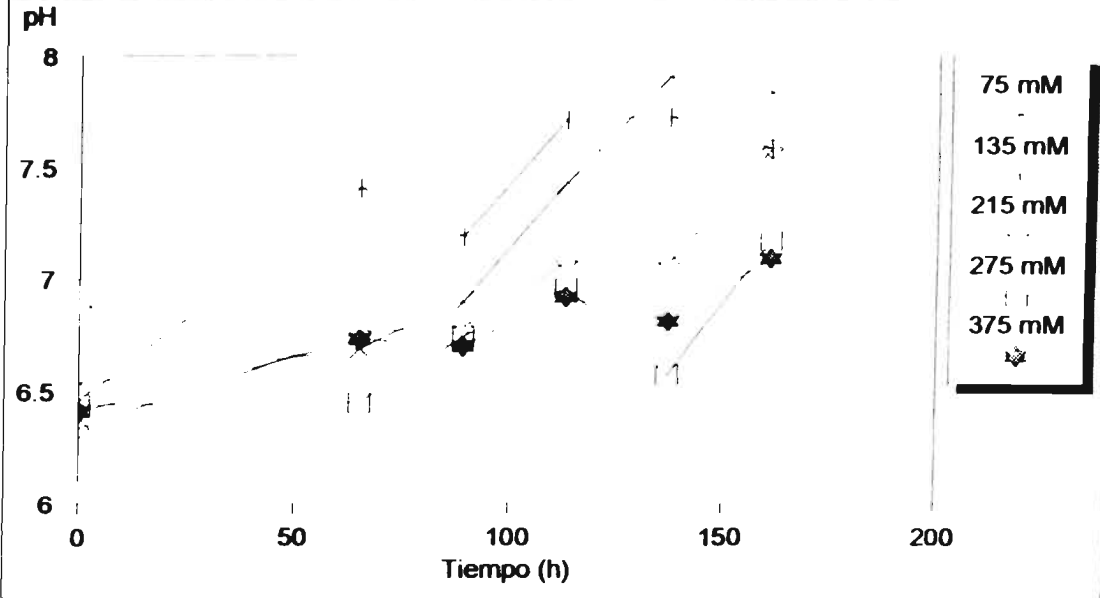


gbs = gramo de bagacillo seco

[Redacted]

Figura 9. Evolución de la humedad en los días de *P. chrysogenum* P-2 en medio sólido (FB) con diferentes concentraciones iniciales de amoníaco.





VI. DISCUSION

Como se mencionó anteriormente, existe una falta de estudios básicos sobre la fisiología de los microorganismos en fermentación sólida y más aún de estudios mas profundos como el funcionamiento de los sistemas regulatorios en este medio. Estos conocimientos son importantes no sólo por su interés básico, sino porque podrían tener aplicación a desarrollo de procesos de producción o de cepas sobreproductoras.

1. REGULACION POR CARBONO.

Los estudios en medio líquido han demostrado que la fuente de carbono puede tener efectos negativos sobre la síntesis de metabolitos secundarios. En el caso de la penicilina, la glucosa deprime la síntesis de antibiótico, reprimiendo la transcripción de las enzimas de la vía: tripéptido sintetasa e isopenicilina N sintetasa (Revilla et al, 1986).

En el trabajo aquí presentado se comparó la regulación por carbono de la síntesis de penicilina por *P. chrysogenum* P-2 en FL y en FS en soporte. Debido a las grandes diferencias entre ambos sistemas, la estrategia seguida fue la de utilizar medio de cultivo definido para ambos y determinar así los umbrales regulatorios de la síntesis de penicilina.

En FL la represión catabólica se manifestó en el cultivo con 170 mM de glucosa inicial como un retraso relativo en el inicio de la síntesis de penicilina, la cual se presentó hasta que la concentración del azúcar en el medio descendió a niveles no represivos. Comparando las concentraciones de glucosa de los cultivos, en los períodos de desrepresión de unos y represión de otros (concentración máxima con desrepresión y mínima con represión), se estimó el umbral de regulación, en condiciones de FL entre 20 y 28 g. de glucosa/l.

Estos niveles concuerdan con los estudios clásicos en FL. Revilla et al., (1984) realizaron estudios muy precisos sobre represión catabólica de la biosíntesis de penicilina por *P. chrysogenum* ASP-78. Encontraron que, en cultivos de corta duración de células en reposo, el efecto represivo de la glucosa fue dependiente de la concentración en el rango de 28 a 140 mM (25 g/l).

En los experimentos de FS realizados inicialmente, se notó una importante variación en la relación bagacillo/nutrientes/agua, modificando las características del medio sólido en los diferentes tratamientos. Al mantener el C/N de los medios constante, la densidad y el aspecto de los diferentes cultivos fue similar; en éstas 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 de la penicilina baja, seguida de uno con una alta velocidad de síntesis. Esto se interpretó como una desrepresión parcial, seguida de una total. En este sistema la producción inició mas 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 fue más notorio. Con las cinéticas de consumo de glucosa se estimó el umbral regulatorio de la síntesis entre 36 y 14 g/l.

Estos resultados sugieren 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.

2. REGULACION POR NITROGENO

En los experimentos realizados en este trabajo se observó la regulación de la biosíntesis de penicilina por amonio en Fermentación líquida a una concentración de 175 mM.

Los estudios clásicos de Sánchez et al. (1981) descubrieron un efecto regulatorio del amonio (en medio líquido) por *P. chrysogenum* NRRL 1954, a una concentración inicial de 100 mM. En esta tesis se utilizó una cepa de mayor producción (*P. chrysogenum* P-2), y quizás ésta sea la causa por la que no se observó regulación a concentraciones de amonio de 100 mM. Se encontró un efecto regulatorio a concentraciones iniciales de amonio de 175 mM (y no a 145 mM). Sin embargo, a esas concentraciones de amonio se observaron pequeñas variaciones en crecimiento y cinéticas de pH, aunque los valores de pH de los momentos clave (19 h) fueron iguales.

En FS se estudió el efecto de un amplio rango de concentraciones (75 mM a 375 mM) iniciales de amonio. Los resultados mostraron síntesis de penicilina en todos los casos, pero con retrasos crecientes en el inicio y con decrecientes producciones finales.

Se observó un aparente efecto regulatorio, sobre la síntesis de penicilina en fermentación sólida a partir de 135 mM (y no a 75 mM) de amonio inicial. Aunque esta pareja de cultivos mostró cinéticas parecidas de humedad y consumo de azúcares (indicando patrones de crecimiento similares), las de pH son diferentes y en particular en el momento crítico del experimento (65 h). Esta diferencia podría afectar la interpretación de los resultados; sin embargo, ambos valores de pH (6.7 y 7.4) son adecuados para la producción del antibiótico, en particular, el del cultivo regulado.

Estos resultados sugieren que sí hay un efecto regulatorio del amonio sobre la síntesis de penicilina en FS. En el caso del amonio, no se puede hablar de umbrales ya que no se obtuvieron cinéticas de consumo.

Para comprobar estos resultados regulatorios, sin lugar a dudas, habría que realizar estudios transcripcionales de las enzimas de la vía. Adicionalmente, en el caso del amonio, habría que realizar estudios del nivel al que actúan las enzimas ya que actualmente, no se conoce.

VII. CONCLUSIONES

1. En la biosíntesis de penicilina en Fermentación Líquida por *P. chrysogenum* P-2 (ATCC 48271) se presenta un efecto tipo regulatorio por carbono a una concentración inicial de 170 mM de glucosa.

2. En la Fermentación Sólida el efecto regulatorio por glucosa se observó también a una concentración inicial de 170 mM.

3. La regulación por Amonio se observó en FL a una concentración inicial de 175 mM.

4. En Fermentación sólida la concentración inicial de amonio que mostró un efecto tipo regulatorio fue 136 mM.

5. Estos resultados sobre regulación indican que los mecanismos que regulan la biosíntesis de penicilina en Fermentación Líquida también están activos en Fermentación Sólida a niveles similares y que las diferencias de producción obtenidas entre ambos sistemas no se deben a estos mecanismos regulatorios. Debe haber otros aspectos de la fisiología que sí son diferentes en FS, pero que no han sido identificados por falta de estudios.

Sería recomendable realizar estudios genéticos de las cepas en FS, que identifiquen las características que permiten obtener la alta producción y las cuales no son debidas a estos mecanismos regulatorios.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- AIDOO, K.E., HENDRY, R., WOOD, J.B. (1982) Solid substrate fermentation. *Adv. in Applied Microbiol.* 28, 201-237.
- BARREDO, J. L., ALVAREZ, E., CANTORAL, J.M., DÍEZ, B., MARTÍN, J.F. (1988) Glucokinase-deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both β -galactosidase and penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemoter.*, 32 1061-1067.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., GUTIÉRREZ, M., VINIEGRA, G., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. (1988a) Modificación al proceso de fermentación sólida para producir metabolitos secundarios microbianos. Certificado de Invencción en trámite No. 665. México.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., TOMASINI, A., VINIEGRA-GONZALEZ, G., LÓPEZ, L. (1988b) Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 10, 793-798.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J., RODRÍGUEZ, G. M., TOMASINI, A. (1990) Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 70 329-333.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. MONTENEGRO, E., MARTIN, J.F. (1990b) Penicillin production by mutants resistant to PAA. *Abstr. Genetics of Industrial Microorganisms (GIM 90)*. 112, Estrasburgo, Francia.
- BEHAL, V. Enzymes of secondary metabolism: regulation of their expression and activity. En: "regulation of secondary metabolism" Workshop Conferences, Hoechst, vol. 16. Edit. by Horst Kleinkauf.
- BU'LOCK, J.D. (1961) Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Advances Appl. Microbiol.* 3, 293-342.
- BU'LOCK, J.D. (1974) Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. En: "The Filamentous Fungi" 1. Industrial Mycology. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. Edward Arnold, London.
- CASIDA, L.E. (1964) "Industrial microbiology". John Wiley and Sons, Inc. U.S.A.
- DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N. y GINSBERG, H.S. (1980) Microbiology, Third Edition, Harper and Row, U.S.A.
- DEMAIN, A. L. (1957) Inhibition of penicillin biosynthesis by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.* 67, 244-245.

- DEMAIN, A. L. (1968) Regulatory mechanisms and the industrial production of microbial metabolites. *Lloydia* 31, 395-418.
- DEMAIN, A. L. (1972) Cellular and environmental factors affecting the synthesis of metabolites. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*. 22, 345-362.
- DEMAIN, A. L. (1974) Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentations. *Lloydia* 37, 147.
- DEMAIN, A. L. (1983) Biosynthesis of B-lactam antibiotics. En: Antibiotics Containing the B-lactam Structure. Eds. A.L. Demain & N.A. Solomon. Springer Verlag, Berlin pp.189-228.
- DOELLE, H.W. (1985) Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. *ASEAN Food J.* 1, 10-14.
- FAJARDO, C., BARRIOS-GONZÁLEZ, J. (1988) Producción de ácido giberélico por fermentación sólida. XIX Congreso Nacional de Microbiología 26 al 29 de abril. Monterrey, N.L., México.
- FRIEDERICH, C.G., DEMAIN, A.L. (1977) Homocitrate synthetase as the crucial site for the lysine effect on penicillin biosynthesis. *J. Antibiot.* 30, 760-761.
- GORDEE, E.Z., DAY, L.E. (1972). Effect of exogenous penicillin on penicillin biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1, 315-322.
- GOULDEN, S.A., CHATAWAY, F.W. (1968) Lysine control α -amino adipate and penicillin synthesis in *P. chrysogenum*. *Biochem. J.* 110, 55.
- HESELTIME, C.W. (1972) Solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 517-532.
- HESELTIME, C.W. (1977) Solid state fermentation part 1. *Process Biochem.* July/August 24-27.
- HESELTIME, C.W. (1977) Solid state fermentation part 2. *Process Biochem.* November.29-32.
- HESELTIME, C.W. (1987) Solid state fermentation. An Overview. *Biodeterioration* 23, 79-89.
- JARVIS, F. G., JOHNSON, M.J. (1947) The role of the constituents of synthetic media for penicillin production. *J. Am. Chem. Soc.* 69, 3010-3017.

- JERMINI, M.F.G., DEMAIN, A. L. (1989) Solid State Fermentation for Cephalosporin Production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. *Experientia* 45, 1061-1065.
- KUMAR, P.K.R., LONSANE, B.K. (1987b) Gibberellic acid by solid state fermentation: consistent and improved yields. *Biotechnol. Bioeng.* 30 267-271.
- LUENGO, J.M., REVILLA, G., VILLANUEVA, J.R., MARTIN, J.F. (1979) Lysine regulation of penicillin biosynthesis in low-producing and industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *J. of Gen. Microbiol.* 201-211.
- LUENGO, J.M., REVILLA, G., VILLANUEVA, J.R., MARTIN, J.F. (1980) Inhibition and repression of homocitrate synthase by lysine in *P. chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 144, 869-876.
- MARTIN, J.F., DEMAIN, A.L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44, 230-251.
- MASUREKAR, P., DEMAIN, A.L. (1972) Lysine control of penicillin biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* 18, 1045-1048.
- MOO YOUNG, M., MOREIRA, A.R.M TENDERDY, R.P. (1983). Principles of Solid Substrate Fermentation. En: The Filamentous Fungi. Fungal Technology. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R., Kristiansen, B. London, Edward Arnold Publisher. 4, 117-144.
- MUDGETT, R.E. (1986) Solid state fermentation. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Eds. Demain, A.L., Solomon, N.A. Washington, American Society for Microbiology, 66-84.
- ORIOI, E., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. (1988a) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 498-503.
- ORIOI, E., SCETTINO, B., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., RAIMBAULT, M. (1988b) Solid state culture of *Aspergillus niger* on support". *J. Ferment. Technol.*, 66 57-62.
- RAIMBAULT, M., ALAZAR, D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *European J. Appl. Microbiol.* 9 199-209.
- RAIMBAULT, M., REVAH, S., PIÑA F., VILLALOBOS, P. (1985) Protein Enrichment of Cassava by Solid Substrate Fermentation Using Molds Isolated from Traditional Foods. *J. Ferment. Technol.* 63, 395-399.

- RAMOS, F.R., LÓPEZ-NIETO, M.J., MARTIN, J.F. (1985) Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts d-(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **27**, 389-387.
- REVILLA, G., LÓPEZ-NIETO, M.J., LUENGO, J.M., MARTIN, J.F. (1984) Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. of Antibiotics.* 781-789.
- REVILLA, G., RAMOS, F.R. (1986) Glucose represses formation of d-(L- α -aminoadipyl)-L-Cysteinyl-D-Valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. *J. Bterol.* **168**, 947-952.
- SÁNCHEZ, S., FLORES, M.E., DEMAINE, A.L. (1988) Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations. In: Nitrogen source of control of microbial processes. Ed. Sánchez, S.PREUS, USA.
- SÁNCHEZ, S., FLORES, M.E., MATEOS, R.C.(1983) Aspectos bioquímicos regulatorios de la biosíntesis de penicilina. En: caminos en la biología fundamental. 129-139.
- SÁNCHEZ, S., PANIAGUA, L., MATEOS, R.C., LARA, F., MORA, J. (1981) Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in strains of *Penicillium chrysogenum*. *Adv. in Biotechnol.* **3**, 147
- SHEN, Y.Q., HEIM, SOLOMON, N.A., WOLFE, S., DEMAINE, A.L. (1984) Repression of B-lactame production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* **37**, 503.
- SILMAN, R.W., CONWAY, H.F., ANDERSON, R.A., BAGLEY, E. B. (1979) Production of aflatoxin in corn by a large scale solid substrate fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1799-1808.
- SOMERSON, N.L., DEMAINE, A.L., NUNHEIMER, T.D. (1981) Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α -amino adipic acid. *Arch. Biochem.* **93**, 238-241.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Perspectives and limitations of solid fermentation in México, (1989) En: Solid State Fermentations in Bioconversion of agro-industrial raw material. M. Raimbault-ORSTROM.
- YANG, S.S., LING, M.Y. (1989) Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation. *Biotech, and Bioeng.* **33**, 1021-1028.

ZANCA, D.M. MARTIN, J.F. (1983) Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiotics* 36, 700-708.

ZANGH, J.Y., WOLOFE, S., DEMAIN, A.L. (1987) Effect of ammonium as nitrogen source on production of ACV synthetase by *Cephalosporium acremonium* C-10. *J. Antibiot.* 40, 1746.

X. INDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS

Esquema 1. Estructura química de las penicilinas	16
Esquema 2. Rutas biosintéticas de L-lisina, penicilina G y cefalosporinas	17
Tabla 1. Campos de aplicación de la FS.	13
Tabla 2. Comparación del desempeño de la producción de penicilina entre FS y FL.	21
Tabla 3. Cálculo aproximado de las tasas de consumo de glucosa en FL y FS con diferentes concentraciones iniciales del azúcar.	41
Fig. 1. Tratamiento para la eliminación de los azúcares residuales del bagacillo de caña para FS.	28
Fig. 2. Cinética de producción de penicilina con <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes fuentes de nitrógeno en medio definido.	29
Fig. 3a. Producción de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.	32
Fig. 3b. Consumo de azúcares reductores por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.	33
Fig. 3c. Variación de pH en fermentación líquida de <i>P. chrysogenum</i> P-2 con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.	34
Fig. 3d. Crecimiento durante el cultivo de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.	35
Fig. 4a. Producción de penicilina de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.	36
Fig. 4b. Consumo de glucosa por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.	37
Fig. 4c. Crecimiento durante el cultivo de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.	38
Fig. 4d. Variación de pH durante el cultivo de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación líquida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N constante.	39
Fig. 5. Producción de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentación sólida con diferentes concentraciones iniciales de glucosa y una relación C/N variable.	42

Fig. 6a. Producción de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante).	43
Fig. 6b. Consumo de glucosa por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante).	44
Fig. 6c. Cinética de pH durante el cultivo de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante).	45
Fig. 6d. Comportamiento de la humedad durante el cultivo de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante).	46
Fig. 6e. Concentración de biomasa (método gravimétrico) de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones sólidas con diferentes concentraciones iniciales de glucosa (relación C/N constante).	47
Fig. 7a. Cinética de crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones líquidas con bajas concentraciones iniciales de amonio (8.5 - 100 mM).	49
Fig. 7b. Cinética de pH de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones líquidas con bajas concentraciones iniciales de amonio (8.5 - 100 mM).	50
Fig. 7c. Producción de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en fermentaciones líquidas con bajas concentraciones iniciales de amonio (8.5 - 100 mM).	51
Fig. 8a. Producción de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en medio líquido (FL) con concentraciones elevadas de amonio (75-225 mM).	52
Fig. 8b. Cinéticas de pH en Fermentaciones líquidas con <i>P. chrysogenum</i> P-2 con concentraciones elevadas de amonio (75-225 mM).	53
Fig. 8c. Crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en Fermentaciones líquidas con concentraciones elevadas de amonio (75-225 mM).	54
Fig. 8d. Consumo de azúcares por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en Fermentaciones líquidas con concentraciones elevadas de amonio (75-225 mM).	55
Fig. 9a. Producción de penicilina por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en medio sólido (FS) con diferentes concentraciones de amonio.	56
Fig. 9b. Consumo de azúcares por <i>P. chrysogenum</i> P-2 en medio sólido (FS) con diferentes concentraciones iniciales de amonio.	57
Fig. 9c. Cinética de humedad en los cultivos de <i>P. chrysogenum</i> P.2 en medio sólido (FS) con diferentes concentraciones iniciales de amonio.	58
Fig. 9d. Variaciones de pH durante el crecimiento de <i>P. chrysogenum</i> P-2 en medio sólido (FS) con diferentes concentraciones iniciales de amonio.	59