

Universidad Autónoma Metropolitana



Producción de cefalosporina C por fermentación en
medio sólido de *Acremonium chrysogenum* C10

Tesis

para obtener el grado de:
Maestra en Biotecnología

Presenta:

Tania Ethel Cuadra Zelaya

Director:

Dr. Javier Barrios González

**La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados del CONACYT y además
cuenta con apoyo del mismo Consejo con el No de registro 0471-O**

Iztapalapa, D.F. a 26 de octubre de 2004

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
Tesis
**Producción de cefalosporina C por fermentación en medio sólido de
Acremonium chrysogenum C10**

que presentó
Tania Ethel Cuadra Zelaya

Comité Tutorial:

Director: Dr. Javier Barrios González

Asesor: Dr. Francisco José Fernández Perrino

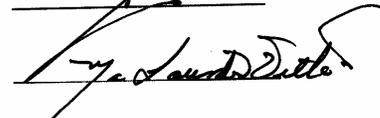
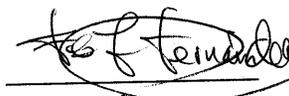
Jurado

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Secretaria: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Sinodal: Dr. Ernesto Favela Torres

Sinodal: Dra. Lourdes Villa Tanaka



Deseo expresar el más sincero de los agradecimientos a todas las personas e instituciones que han contribuido a la realización de este trabajo:

Dr. Javier Barrios González: por su enseñanza y orientación en el desarrollo del trabajo además del ánimo en los momentos difíciles se presentaron.

Dr. Francisco José Fernández Perrino: Por su apoyo al permitirme participar en este proyecto de investigación.

Dra. Araceli Tomasini Campocosio por su ayuda y apoyo constante durante la realización de todo el trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario y de la Maestría, por su apoyo, comprensión, sugerencias; pero sobretodo su amistad que es muy importante para mi.

A la Fundación FANTEL por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

A Dios, mi Papi, mi Mami, Florence y Carmen Dinora
por el amor tan grande que siempre me dan, que
supera el tiempo y la distancia.

Resumen

Se han observado buenos resultados de producción de cefalosporina C (CPC) en fermentación sólida (FS) de una fase soporte-substrato (como salvado de trigo) utilizando *Acremonium chrysogenum* C10 como microorganismo productor. En esta tesis se presenta el trabajo realizado para establecer condiciones de producción de CPC en FS de dos fases soporte sustrato; sistema que presenta ventajas significativas para estudios básicos que permitirán comprender mejor la fisiología del hongo en este medio y así diseñar procesos de producción más eficientes.

Se realizaron FS durante 5 días, utilizando alternativamente como soportes bagazo de caña y espuma de poliuretano, con medio de cultivo con un contenido 2X de nutrientes y 70% de humedad. Se determinó que con un inóculo de 0.1% g micelio (peso seco)/ g de medio sólido húmedo, se logra establecer un cultivo sólido puro de *A. chrysogenum*, bajo condiciones no estériles (columna con aireación no estéril). Además se observó que la producción de CPC en FS en los dos soportes estudiados, se realizaba rápidamente del primero al segundo día de cultivo, acompañada también de una rápida elevación del pH. Sin embargo, ésta producción se mostró más estable en bagazo de caña que en espuma de poliuretano bajo las condiciones iniciales de este estudio. Al mantener el cultivo de *A. chrysogenum* en bagazo de caña dentro de ciertos valores de pH (6.4-8.0) durante los días de producción, se observaba que se alargaba el tiempo y nivel de producción de CPC, además de que se alteraba la velocidad de consumo de azúcares. Se encontraron 2 estrategias efectivas para mantener el cultivo en el intervalo de pH deseado durante más tiempo: disminuir el pH inicial a 5.8 y usar amortiguador de fosfatos 0.075M. El uso del amortiguador en el sistema permitió obtener mejores niveles de

producción de CPC en FS con bagazo de caña con un contenido de nutrientes mayor (2.5X), el cual, sin amortiguador elevaba rápidamente el pH e impedía la continuidad de la producción de CPC.

Finalmente, también se determinó que temperaturas de cultivo entre 25 y 30° C no dan lugar a diferencias significativas en el nivel de producción de CPC en FS con bagazo de caña, pero sí modificaban el tiempo en el que se observa la producción máxima.

Abstract

Good results of cephalosporin C (CPC) production has been observed in solid fermentation (SF) of one phase support-substratum (like wheat bran) using *Acremonium chrysogenum* C10 as producing microorganism. In this thesis is described the work made to establish conditions of CPC production SF of two phases support-substratum; this system displays significant advantages for basic studies that they will allow to understand better the physiology of the fungus in SF and thus to design more efficient production processes.

SF were made during 5 days, using sugarcane bagasse and polyurethane foam as supports alternatively, with culture media with a 2X content of nutrients and 70% moisture content. It was determined that with an inoculum of 0,1% g of mycelium (dry weight)/g of moisten solid media, it is managed to establish a pure solid culture of *A. chrysogenum*, under nonsterile conditions (column with nonsterile aeration). In addition, it was observed that the production of CPC in SF in both supports studied, was quickly made from the first to the second day of culture, also accompanied by a quick pH elevation. Nevertheless, the production was more stable in sugarcane bagasse than in polyurethane foam under the initial conditions of this study. When maintaining the culture of *A. chrysogenum* in sugarcane bagasse within certain values of pH (6.4-8.0) during the days of production, it was observed that the time and level of CPC production extended, in addition the sugar uptake rate was altered. Two effective strategies to maintain the culture in the interval of wished pH during more time were found: lowering initial pH to 5.8 and using phosphate buffer 0.075M. Employing the buffer in the system allowed to obtain better levels of production of CPC in SF with sugarcane bagasse with a greater content of nutrients (2.5X), which, without buffer tended to increase pH quickly, preventing the continuity of the CPC production. It was also determined that temperatures of culture between 25 and 30° C do not give rise to significant differences in the level of CPC production in FS with sugarcane bagasse, but they modified the time in which the maximum production is observed.

Índice general

Índice de tablas

Índice de figuras

Abreviaturas

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Justificación.....	4
4. Antecedentes.....	6
4.1 Cefalosporina C.....	6
4.1.1 Desarrollo histórico	6
4.1.2 Estructura.....	7
4.2 Acremonium chrysogenum.....	9
4.2.1 Taxonomía.....	9
4.2.2 Biosíntesis de cefalosporina C (CPC)	10
4.2.3 Mecanismos de regulación de la biosíntesis de CPC.....	12
4.2.3.1 Regulación por la fuente de carbono.....	13
4.2.3.2 Regulación por la fuente de nitrógeno.....	14
4.2.3.3 Aminoácidos como precursores y mediadores de la regulación.....	15
4.2.3.4 Regulación por fosfato.	16
4.2.3.5 Regulación por pH ambiental.	16
4.2.3.6 Efecto del oxígeno en el sistema respiratorio y en la producción de CPC.....	17
4.2.4 Mejoramiento genético.....	18
4.3 Fermentación en medio sólido (FS)	20
4.3.1 Consideraciones generales.....	21
4.3.2 Factores ambientales que afectan la FS.....	22
4.3.2.1 Contenido de humedad y actividad de agua.	22
4.3.2.2 Tamaño de partícula y densidad de empaque.	25
4.3.2.3 Aireación y mezclado.....	25
4.3.2.4 Pretratamiento del sustrato o soporte.	25
4.3.2.5 Tamaño de inóculo.....	26
4.3.3 Mejoramiento de cepas para FS.....	26
4.4 Cultivos de Acremonium chrysogenum C10 para la producción de CPC.....	27
4.4.1 Cultivos en medio líquido.....	28
4.4.2 Cultivos en medio sólido.....	29
5. Materiales y Métodos.....	31
5.1 Microorganismos utilizados.....	31
5.2 Medios de cultivo.....	31
5.2.1 Medios de cultivo para Escherichia coli ESS 2231.....	31

5.2.2 Medios de cultivo para <i>A. chrysogenum</i> C10.....	31
5.2.3 Reactivos para determinación de glucosamina.....	33
5.3 Crecimiento de los microorganismos.....	33
5.3.1 Crecimiento de <i>E.coli</i> ESS 2231.....	33
5.3.2 Crecimiento de <i>A. chrysogenum</i> C10.....	34
5.3.2.1 Condiciones para esporulación.....	34
5.3.2.2 Condiciones para producción de inóculo.....	34
5.3.2.3 Producción de CPC.....	34
5.3.2.3.1 Cultivo en bagazo de caña.....	34
5.3.2.3.2 Cultivo en espuma de Poliuretano.....	35
5.4 Mantenimiento de los microorganismos.....	36
5.5 Técnicas analíticas.....	36
5.5.1 Métodos de extracción de CPC.....	36
5.5.2 Cuantificación de CPC.....	38
5.5.3 Cuantificación de azúcares totales.....	38
5.5.4 Determinación de pH.....	38
5.5.5 Determinación de humedad.....	38
5.5.6 Método de cilindros de agar para la selección de cepas de <i>A. chrysogenum</i>	38
5.5.7 Cuantificación de glucosamina.....	39
6. Resultados	
6.1 Extracción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano.....	40
6.2 Estudios de esporulación de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10.....	41
6.3 Cinética de crecimiento de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10 en medio semilla.....	42
6.4 Experimentos preliminares de FS de <i>A. chrysogenum</i> : efecto de la aireación.....	43
6.5 Producción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano.	47
6.6 Efecto del pH inicial en la producción de CPC.....	49
6.6.1 Efecto del pH inicial sobre el consumo de azúcares.....	53
6.7 Efecto de diferentes amortiguadores en la producción de CPC.....	54
6.8 Evaluación de 2 niveles de nutrientes, con y sin amortiguador, en la producción de CPC.	57
6.9 Purificación genética de la cepa de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10.....	61
6.10 Efecto de la temperatura en la producción de CPC y crecimiento de <i>A. chrysogenum</i>	66
7. Discusión	
7.1 Extracción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano.....	70
7.2 Estudios de esporulación de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10.....	70
7.3 Cinética de crecimiento de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10 en medio semilla.....	71
7.4 Experimentos preliminares de FS de <i>A. chrysogenum</i> : efecto de la aireación.....	72
7.5 Producción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano.	73
7.6 Efecto del pH inicial en la producción de CPC.....	74

7.7 Efecto de diferentes amortiguadores en la producción de CPC.....	76
7.8 Evaluación de 2 niveles de nutrientes, con y sin amortiguador, en la producción de CPC.	78
7.9 Purificación genética de la cepa de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10.....	81
7.10 Efecto de la temperatura en la producción de CPC y crecimiento de A. <i>chrysogenum</i>	83
8. Conclusiones.....	85
9. Bibliografía.....	87
Anexos.	
Anexo 1. Ensayo General de Potencia de Cefalosporina C	
Anexo 2. Ensayo para la determinación de azúcares totales (DNS modificado)	
Anexo 3. Prueba de Glucosamina	
Anexo 4. Composición general de los elementos complejos del medio	
Anexo 5. Relación C/N en el MCFA	
Anexo 6.	
Medio de Cultivo para producción de CPC sobre arroz Tsalai. (Wang y col., 1984)	
Medio de Cultivo para producción de CPC sobre trigo crudo (Adinarayana y col., 2003)	

Índice de tablas

4.1 Taxonomía.....	9
6.1 Recuperación de CPC de los dos soportes estudiados utilizando diferentes métodos de extracción.....	40
6.2 Estudios de esporulación de <i>A. chrysogenum</i> C10 en tres diferentes medios de cultivo.....	41
6.3 Producción y productividad en experimentos con diferentes valores de pH inicial y condiciones de pH observadas el día de producción máxima.....	51
6.4 Comparación del pH de inicio del cultivo con el observado en el momento de producción máxima de CPC.....	52
6.5 Velocidades de consumo de azúcares y tiempo de producción bajo diferentes condiciones de pH inicial.....	54
6.6 Valores de producción máximos observados en cada una de las condiciones del experimento de dos niveles de nutrientes y dos elementos de control de pH.....	59
6.7 Velocidades de consumo de azúcares y tiempo de producción bajo diferentes condiciones de contenido de nutrientes y control de pH.....	60
6.8 Características de <i>A. chrysogenum</i> C10 en diferentes etapas del estudio de producción de CPC en FS.....	62

Índice de figuras

4.1 Estructura química de la Cefalosporina C.....	8
4.2 Ruta de biosíntesis de la cefalosporina C (CPC) en <i>A. chrysogenum</i>	11
6.1 Morfología macroscópica y microscópica de <i>Acremonium chrysogenum</i> C10.....	42
6.2 Cinética de crecimiento de <i>A. chrysogenum</i> C10 en MSMA.....	43
6.3 Cinéticas de cultivo de <i>A. chrysogenum</i> C10 en bagazo de caña utilizando dos sistemas: columna aireada y matraz con aireación periódica	44
6.4 Cinéticas de cultivo de <i>A. chrysogenum</i> C10 en espuma de poliuretano utilizando dos sistemas: columna aireada y matraz con aireación periódica	46
6.5 Cinética del cultivo de <i>A. chrysogenum</i> en bagazo de caña y espuma de poliuretano.....	48
6.6 Efecto del pH inicial en la producción de CPC.	50
6.7 Evaluación de la capacidad amortiguadora de diferentes sustancias.....	55
6.8 Cinética de cultivo de <i>A. chrysogenum</i> C10 . Dos niveles de nutrientes y verificando el efecto del amortiguador de fosfatos para el control del pH.	58
6.9 Histogramas de frecuencias de la producción de CPC de colonias analizadas para purificación de <i>A. chrysogenum</i> C10. a) cepa comercial y b) cepa original.....	63
6.10 Histograma de frecuencias de la producción de CPC de colonias preseleccionadas en purificación de <i>A. chrysogenum</i> C10.....	64
6.11 Cinéticas de cultivo de <i>A. chrysogenum</i> C10 utilizando dos cepas obtenidas del procedimiento de purificación genética	65
6.12 Cinéticas de cultivo de <i>A. chrysogenum</i> C10 verificando el efecto de la temperatura en el crecimiento y producción de CPC.	68

Abreviaturas.

ACV: α -aminoadipil-cisteinil-valina

Az.: azúcares

cc: centímetro cúbico

col.: colaboradores

CoA: coenzima A

CPC: cefalosporina C

DAC: desacetilcefalosporina C

d.: día

DAOC: desacetoxicefalosporina C

g : gramo

gss: gramo de soporte seco

h : hora

IPN: isopenicilina N

IPNS: isopenicilina N sintasa

L: litro

M.: molar

min. : minuto

mL : mililitro

μ L: microlitros

mm: milímetros

mM.: milimolar

mg: miligramo

MSMA: medio semilla modificado, Adinarayana y *col.*, 2003.

MCFA: medio complejo de fermentación para *A. chrysogenum*, Caltrider y *col.*, 1966.

MFAF 0.075: medio de fermentación para *A. chrysogenum* con amortiguador de fosfatos 0.075M

μ g : microgramo

rpm: revoluciones por minuto

1. Introducción

La cefalosporina C (CPC) es la precursora de todas las cefalosporinas comerciales, antibióticos β -lactámicos modernos de muy alto costo pero aun así ampliamente usados (Demain y Elander, 1999).

A pesar de que se han logrado mejoras significativas en la producción de CPC a través de diversos estudios de la fisiología de *Acremonium chrysogenum*, especialmente en lo que se refiere a la caracterización de los complejos enzimáticos que participan en la formación de los productos intermedios de la biosíntesis, el conocimiento del funcionamiento de estos complejos se sigue considerando como “cuello de botella” en las fermentaciones para la producción de los antibióticos derivados de la CPC (Gutiérrez y col., 2000). Además se observa que su producción por *A. chrysogenum* se encuentra muy por debajo de la productividad alcanzada en la producción de penicilina por *P. chrysogenum* (Brakhage, 1998), observándose un crecimiento deficiente del microorganismo productor de CPC; por lo tanto aún quedan muchos esfuerzos por realizar y búsqueda de alternativas para incrementar la producción de esta sustancia.

La fermentación en estado sólido (FS) es una alternativa que ofrece ventajas ecológicas para el crecimiento de hongos y actinomicetos, y puede presentar otras ventajas significativas sobre los métodos de cultivo sumergido para la manufactura de productos no tradicionales de interés (Barrios-González y Mejía, 1996).

Los resultados de producción de CPC en FS utilizando elementos que ejercen la función de soporte y fuente de nutrientes a la vez, como arroz (Wang y col., 1984), Cebada (Jermini y Demain, 1986) y salvado de trigo (Adinarayana y col., 2003) indican que esta

sustancia puede ser producida en grandes cantidades y probablemente con ventajas por este sistema.

A través del presente estudio se pretende establecer condiciones para la producción de CPC en FS sobre un sistema de soporte que contenga una solución nutritiva. Lo anterior se realizará estudiando la extracción del producto desde los soportes propuestos (bagazo de caña y espuma de poliuretano), la evaluación de estos soportes en la FS y el ajuste de los principales parámetros de fermentación: tipo de inóculo, contenido de nutrientes, porcentaje de humedad inicial y pH. Este sistema promete altos niveles de producción y ventajas significativas para estudios básicos que permitirán comprender mejor la fisiología del hongo en este medio y así diseñar procesos de producción más eficientes.

2. Objetivos

Objetivo General.

Establecer las condiciones de producción de cefalosporina C (CPC) en un sistema de fermentación sólida de 2 fases soporte-sustrato, utilizando como microorganismo productor *Acremonium chrysogenum* C10.

Objetivos Específicos

1. Establecer sistemas de extracción de CPC en los soportes sólidos a ensayar (bagazo de caña y espuma de poliuretano)
2. Evaluar el efecto del tipo de inóculo en los dos sistemas de fermentación sólida.
3. Comparar la producción de CPC en los dos soportes estudiados y seleccionar el mejor.
4. Evaluar el efecto del pH inicial en la producción de CPC
5. Evaluar el efecto de la concentración de nutrientes sobre la producción de CPC

3. Justificación

Las cefalosporinas son antibióticos β -lactámicos modernos cuyas características bactericidas le ofrecen al médico y a los pacientes diversas ventajas: pocos efectos adversos, la habilidad de adaptar el tratamiento para combatir infecciones de microorganismos grampositivos, infecciones mixtas, o infecciones por microorganismos anaerobios; la disponibilidad de formas de administración oral, tópicas e inyectables; y una elección entre agentes de acción corta o prolongada, dependiendo de la naturaleza de la infección bacteriana, incluyendo cepas bacterianas resistentes a los antibióticos existentes.

Las características mencionadas hacen de las cefalosporinas productos de alto costo, que actualmente implican aproximadamente el 41% de las ventas del mercado mundial de antibióticos (Elander 2003).

Todas las cefalosporinas comerciales son semisintéticas y se derivan principalmente del 7-ACA, el cual es producido por diferentes métodos a partir de la cefalosporina C (CPC), que es un antibiótico β -lactámico que posee características hidrofílicas, producido comercialmente por fermentación líquida de cepas industriales del hongo *Acremonium chrysogenum*.

A pesar de que se han logrado mejoras significativas en la producción de CPC a través de diversos estudios de la fisiología de *Acremonium chrysogenum*, se observa que ésta aún encuentra a un nivel muy por debajo del alcanzado en la producción de penicilina por *P. chrysogenum* (Brakhage A., 1998), observándose un crecimiento y esporulación deficientes de el microorganismo productor de cefalosporina. Por lo tanto aun quedan muchos esfuerzos por realizar y búsqueda de alternativas para incrementar la producción de esta sustancia.

Estudios realizados acerca de la producción de CPC por fermentación sólida del tipo de una fase soporte sustrato indican que esta sustancia puede ser producida en grandes cantidades y probablemente con ventajas por este sistema.

Investigaciones realizadas en los últimos años indican que métodos de dos fases soporte sustrato de fermentación sólida pueden llegar a ser sistemas de producción alternativos altamente eficientes para sustancias de alto valor agregado como las cefalosporinas, pero también se reconoce que es necesario un conocimiento más profundo de la naturaleza del metabolismo secundario del *Acremonium chrysogenum* en medio sólido para poder obtener el potencial de producción completo de este sistema. Por estas razones a través del presente trabajo se establecer las condiciones de producción de CPC en un sistema de fermentación sólida de dos fases soporte sustrato, así como empezar a definir las ventajas y retos que presenta la fermentación en este sistema, utilizando como microorganismo productor *Acremonium chrysogenum* C10.

4. Antecedentes.

4.1 Cefalosporina C

La cefalosporina C (CPC) es un antibiótico β -lactámico, perteneciente a la misma familia en la que también se incluye la penicilina. La cefalosporina, sin embargo, posee características hidrofílicas debidas a la cadena lateral de aminoácido que aparece unida al anillo β -lactámico, mientras que la penicilina posee características hidrofóbicas.

4.1.1 Desarrollo Histórico

Una vez descubiertas las propiedades terapéuticas de la penicilina, Giuseppe Brotzu, profesor de bacteriología de Cagliari (Cerdeña), político y hombre de negocios, se dedicó a investigar sobre organismos productores de otros antibióticos. Brotzu comenzó su trabajo en julio de 1945 y muy pronto, en 1948 publicó en la revista “The Works of the Institute of Hygiene of Cagliari” (Trabajos del Instituto de Higiene de Cagliari) un artículo titulado “Ricerca su di Nuovo Antibiotico” (“Investigación sobre un nuevo antibiótico”), que tuvo muy poca difusión (Gutiérrez, 1994).

Brotzu examinó la flora microbiana del agua marina cerca de la zona de salida de aguas residuales de Cagliari, suponiendo que el proceso de autopurificación del agua podría ser debido en parte al antagonismo bacteriano. De uno de sus múltiples cultivos aisló un hongo que era similar a *Cephalosporium acremonium*. Cuando lo crecía en agar, este microorganismo secretaba un producto que inhibía el crecimiento de una gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas (Brotzu, 1948).

En septiembre de 1953, Newton y Abraham descubren un antibiótico hidrofílico como producto del metabolismo de *Cephalosporium sp.* Esta sustancia, denominada cefalosporina C (CPC), fue encontrada en primer lugar durante los estudios químicos de la penicilina N. La CPC mostró actividad antibiótica frente a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, aunque su actividad específica frente a estos organismos fue sólo un 10% de la demostrada por la penicilina N. A pesar de este desalentador principio, algunas otras propiedades de la CPC resultaron ser interesantes: por ejemplo el hecho de ser estable en medio ácido diluido o ser resistente a la penicilinasas de *Bacillus subtilis*. Estas propiedades sugerían la posibilidad de que la CPC pudiera presentar modificaciones en el sistema de anillos de la penicilina (Newton y Abraham, 1955 y 1956).

A principios de 1955 se demostró que la CPC presentaba un amplio rango de actividad, que incluía gran cantidad de cepas de *Staphylococcus aureus*. Además, este antibiótico se mostraba como inocuo cuando se administraba intravenosamente en grandes dosis (Florey y col., 1956).

Actualmente todas las cefalosporinas comerciales son semisintéticas y se derivan principalmente del ácido 7-aminocefalosporánico, el cual a pesar que no es un intermediario de la biosíntesis de las cefalosporinas, es producido a partir de la CPC. Económicamente hablando, solo en 1998, las cefalosporinas implicaban ventas en el mercado mundial de casi 9 billones de dólares (Demain y Elander, 1999).

4.1.2. Estructura

Los estudios estructurales acerca de la CPC fueron considerablemente facilitados por el conocimiento previo de las propiedades de las penicilinas. Como la penicilina N, la CPC se

comportaba como un ácido monoaminodicarboxílico y contenía un residuo δ -D- α -aminoadipílico unido al resto de la molécula a través de su grupo δ -carboxílico. El espectro de absorción infrarroja de su sal sódica mostraba una banda fuerte a 1782 cm^{-1} característica del carbonilo β -lactámico y similar a la frecuencia de extensión del correspondiente carbonilo en las penicilinas. A pesar de estas similitudes, la CPC mostraba algunas diferencias marcadas con la penicilina N. En la hidrólisis ácida, no producía D-penicilamina, sino producía un número de fragmentos sulfurados que carecían de nitrógeno. Estos y otros resultados no eran consistentes con la presencia de un sistema de anillos β -lactámicos-tiazolidínicos fundidos, y en esta etapa fue propuesta la estructura que contenía el sistema de anillos dihidrotiazínicos (Fig 3.1) (Abraham y Newton, 1961). Esta estructura mostró ser consistente con las propiedades químicas y físicas de la CPC conocidas y subsecuentemente fue confirmada por cristalografía de rayos X (Hodgkin y Maslen, 1961). Como se esperaba, la inestabilidad del anillo β -lactámico en condiciones básicas acoplada a la presencia de otros sitios reactivos resultaba en la completa degradación de la molécula a pH alto (Peberdy, 1987).

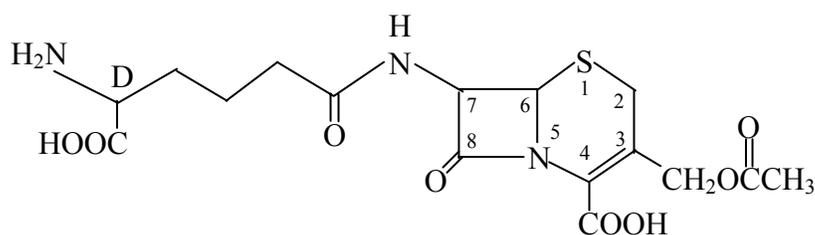


Fig 4.1 Estructura química de la Cefalosporina C

Durante la purificación de la CPC en buffer de acetato de piridina, se observó la formación de una betaína de piridinio (Hale y *col.*, 1961). Esta reacción mostró ser una

reacción general con una variedad de bases heterocíclicas débiles y posteriormente se le encontró una aplicación extensiva en la producción de cefalosporinas semisintéticas.

4.2 *Acremonium chrysogenum*

En su monografía de hongos similares a *Cephalosporium*, Gams (1971) transfirió 18 especies de *Cephalosporium* a *Acremonium* y describió muchas más especies de *Acremonium* en el género. *C. acremonium* es colocado por Gams en esta publicación como *Acremonium chrysogenum* en la sección *Nectrioidea*.

4.2.1 Taxonomía

El análisis de la secuencia del ARN ribosomal 5S de *Acremonium chrysogenum* muestra homología significativa con las secuencias de al menos 16 ascomicetos más (Chen y col., 1984). La clasificación presentada en la tabla 3.1 corresponde a una taxonomía en la cual las características moleculares son las que se imponen para la clasificación (Merops Protease Database. 2003). El género *Acremonium* (o *Cephalosporium*) es más bien un grupo heterogéneo de hongos imperfectos sujeto a considerable disputa taxonómica.

Las colonias de este microorganismo en extracto de malta después de 10 días se

<p>Tabla 4.1 Taxonomía <i>Acremonium chrysogenum</i> Superreino: Eucariota Reino : Hongos Filum: Ascomicetos Subfilum: Pezizomicotina Clase: Sordariomicetos Orden : Hipocreales Familia: Hypocreaceae. Genero: Acremonium.</p>
--

observan similares a las de levadura, viscosas, que alcanzan de 8-15 mm de diámetro, apareciendo su micelio (de color amarillo cromo a amarillo pálido) profundamente sumergido en el medio. Su esporulación es esparcida y los conidióforos indistinguibles de la forma vegetativa del micelio (Peberdy, 1987). La hifa también puede ser diferenciada en otro tipo de esporas, las artrosporas. (Lancini y Lorenzetti, 1993).

4.2.2 Biosíntesis de cefalosporinas

La mayoría de los pasos implicados en la biosíntesis de las cefalosporinas han sido caracterizados en el aspecto bioquímico (Fig4.2) (Queener y Neuss, 1982; Demain, 1983; Martín y Aharonowitz, 1983; Baldwin y Abraham, 1988; Martín y Liras, 1989a y 1989b; Luengo y Peñalva, 1993), si bien muchos aspectos relacionados con las reacciones llevadas a cabo por las diferentes enzimas se mantienen dentro del campo de la hipótesis. Y ello a pesar de su gran interés desde los puntos de vista médico e industrial.

Estudios en los que se utilizaron extractos acelulares condujeron a la observación de un tripéptido: el δ -(L- α -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina o en su forma abreviada ACV, que se forma en *A. chrysogenum*., al igual que en *Penicillium*, por condensación de los aminoácidos L-alfa-aminoadípico, L-cisteína y D-valina (aunque el precursor es el isómero L) a través de la enzima ACV sintetasa codificada por el gen *pcbAB* (Gutiérrez y col., 1991). El tripéptido ACV sería posteriormente ciclado para formar isopenicilina N debido a la acción de la enzima Isopenicilina N sintasa que es codificada por el gen *pcbC* (Samson y col., 1985).

La isopenicilina N es un intermediario que posee una cadena lateral de L- α -aminoadipilo unida al anillo β -lactámico (Fawcett y col., 1976).

Las rutas biosintéticas de cefalosporinas y cefamicinas son, hasta este punto, similares a la de la penicilina. De hecho, el tripéptido ACV y la isopenicilina N son intermediarios en la biosíntesis de estos tres grupos de antibióticos β -lactámicos y en los tres casos la isopenicilina N es el resultado de la ciclación del tripéptido. A partir de este punto las rutas divergen en los microorganismos productores de cefalosporinas y cefamicinas.

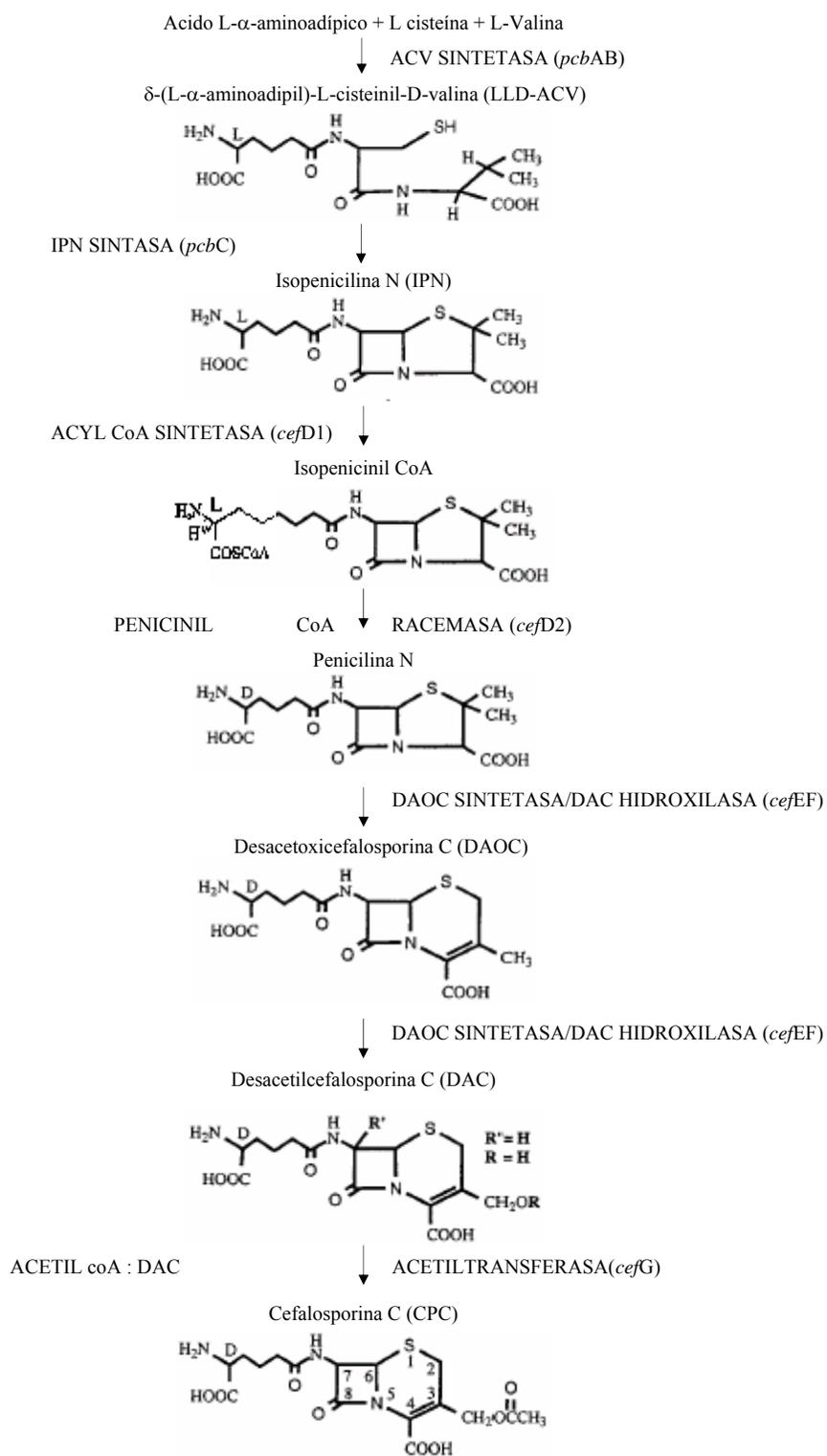


Fig 4.2 Ruta de biosíntesis de la cefalosporina C (CPC) en *A. chrysogenum*.
Detalle de los compuestos, enzimas (mayúsculas), y genes (cursivas) participantes.

En el caso de *A. chrysogenum* la isopenicilina N es convertida en penicilina N por un sistema de dos proteínas (Ullan y *col.*, 2002): la codificada por el gen *cefD1*, que muestra una alta similitud a las acil CoA sintetasas de cadena larga (Turgay y *col.*, 1992); y la codificada por el gen *cefD2*, el cual muestra una alta similitud a las acil CoA racemasas (Schmitz y *col.*, 1994 y, Schmitz y *col.*, 1995). La transformación final a penicilina N requiere también una hidrólisis del CoA tioester la cual ha sido reportada ocurre en forma no estereoespecífica a través de diferentes tioestearasas (Knihinicki, y *col.*, 1991).

La penicilina N es transformada en desacetoxicefalosporina C por medio de una enzima que convierte el anillo tiazolidínico de cinco miembros característico de las penicilinas en un anillo dihidrotiazínico de seis miembros (típico de cefalosporinas y cefamicinas). La desacetoxicefalosporina C es posteriormente hidroxilada, formándose desacetilcefalosporina C. En *A. chrysogenum* las actividades de expansión del anillo y posterior hidroxilación se encuentran asociadas en una única proteína: la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa, codificada por el gen *cefEF* (Scheidegger y *col.*, 1984; Dotzlaw y Yeh, 1987; Baldwin y *col.*, 1987), mientras que en los microorganismos productores de cefamicina se localizan en enzimas separadas codificadas por genes separados (Jensen y *col.*, 1985; Cortés y *col.*, 1987). El último paso de la ruta de biosíntesis de cefalosporina es la acetilación de la desacetilcefalosporina C a cefalosporina C (Fujisawa y *col.*, 1973 y 1975) paso catalizado por el producto del gen *cefG*: la Acetil CoA DAC acetiltransferasa (Gutiérrez y *col.*, 1992).

4.2.3 Mecanismos de regulación de la biosíntesis de CPC

Los estudios sobre la regulación de la biosíntesis de antibióticos β -lactámicos son útiles para mejorar los procesos de fermentación. La producción de antibióticos β -lactámicos tiene

lugar mejor bajo condiciones de desequilibrio de nutrientes y a velocidades de crecimiento bajas. Además existen factores ambientales como el pH y el nivel de oxígeno que afectan el crecimiento microbiano y la formación de productos.

4.2.3.1 Regulación por la fuente de carbono

Diferentes fuentes de carbono ejercen marcados efectos sobre la producción de CPC (Demain y *col.*, 1979). Concretamente, las fuentes de carbono que proporcionan un rápido crecimiento (glucosa, glicerol, maltosa) ejercen un efecto negativo en la producción de β -lactamas. Ya se han estudiado los pasos de la biosíntesis de CPC y, en particular los mecanismos involucrados, que son afectados por represión por glucosa (Behmer y Demain, 1983; Zanca y Martín, 1983; Zhang y *col.*, 1989). En *Acremonium chrysogenum*, los resultados obtenidos del análisis de la actividad enzimática en cultivos en crecimiento y/o en micelio en suspensión indicaron que la ACV sintetasa está sujeta a inhibición por carbono (Zhang y *col.*, 1989; Zhang y Demain, 1992).

Otras enzimas examinadas, tales como la isopenicilina N sintasa y la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa, parecen estar inhibidas a nivel de la síntesis de novo, lo cual implica represión transcripcional o traduccional (Behmer y Demain 1983; Zanca y Martín 1983; Heim y *col.*, 1984). Estudios realizados por Jekosh y Kück (2000) acerca de la fisiología molecular del gen *pcbC* que codifica para la isopenicilina N sintasa, indican represión transcripcional del gen por glucosa en una cepa silvestre de *A. chrysogenum*, sin observarse algún evento regulador a nivel traduccional. Por otro lado, en una cepa de *A. chrysogenum* mejorada en cuanto al nivel de producción de CPC (A3/2), no se observó la represión del gen *pcbC* observada en la cepa silvestre. Similarmente, Shen y *col.* (1986) notaron una reducida

actividad isopenicilina N sintasa en una cepa silvestre diferente en presencia de glucosa, mientras que no observaron cambios en esta actividad en otra cepa productora (C10). Estas observaciones los llevan a la conclusión de que el mejoramiento genético en *A. chrysogenum* está correlacionado con una reducida respuesta de la expresión del gen *pcbC* a la glucosa.

La investigación de Jekosh y Kück (2000) también apoya la hipótesis de que la expresión del gen *cefEF* que codifica para la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa es el principal blanco de la regulación por glucosa, a través de la represión de la síntesis de novo y de la misma forma en que se observa para la isopenicilina N sintasa.

La represión ejercida por la fuente de carbono también es importante en las fermentaciones de *C. acremonium*, con respecto a la degradación no deseable de la cefalosporina C por la acetilhidrolasa (Hinnen y Nüesch, 1976). Esta enzima es producida tardíamente en la fermentación y es reprimida por glucosa, maltosa y sacarosa, pero no por glicerol ni succinato.

4.2.3.2 Regulación por la fuente de nitrógeno

La formación de antibióticos β -lactámicos por *A. chrysogenum* (Shen y col., 1984) y por *P. chrysogenum* (Sánchez y col., 1981) está fuertemente regulada por la fuente de nitrógeno usada, siendo los iones amonio los que muestran el efecto negativo más fuerte (Sánchez y col., 1988), no debiéndose este efecto a su esqueleto carbonado.

Concentraciones de amonio superiores a 110 mM interfieren fuertemente en la producción de CPC por *A. chrysogenum*. La adición de NH_4^+ reprime la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa pero no la IPN sintasa (ciclase). La represión de la expandasa (DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa) es paralela a altos niveles de amonio en el caldo de cultivo durante

la fermentación. La L-asparagina y la L-arginina son mejores fuentes de nitrógeno que el amonio para la producción de antibióticos (Shen y *col.*, 1986).

4.2.3.3 Aminoácidos como precursores y mediadores de la regulación

Penicillium y *Acremonium* requieren determinadas fuentes de azufre para la producción óptima de sus respectivos antibióticos beta-lactámicos. Para la síntesis eficaz de cefalosporinas, *Acremonium chrysogenum* obtiene este azufre a partir de la metionina por transulfuración inversa (Treichler y *col.*, 1979).

Los organismos productores de antibióticos beta-lactámicos pueden utilizar la metionina como única fuente de nitrógeno y azufre. En adición, si se añade durante la fase de crecimiento vegetativo de *Acremonium chrysogenum*, este aminoácido ejerce un importante efecto estimulador sobre la producción de cefalosporinas. A través de diferentes investigaciones para dilucidar el papel de la metionina en la síntesis de CPC se ha podido concluir que este aminoácido no es solamente un precursor de la síntesis de cefalosporina, sino que también es inductor de ésta (Velasco y *col.*, 1994).

En las cepas protótrofas de *Acremonium chrysogenum* la síntesis de antibiótico no es inhibida por adición de lisina exógena ni promovida por el ácido alfa-aminoadípico. Sin embargo, esto se debe a la impermeabilidad y no a la falta de sensibilidad a estos aminoácidos. Así, los auxótrofos de lisina bloqueados después del alfa-aminoadípico son capaces de crecer bien cuando se añade lisina al caldo y, si la concentración de este aminoácido es excesiva, se paraliza la formación de cefalosporinas por inhibición de la homocitrato sintetasa.

También es interesante reseñar que en ciertos mutantes de *Acremonium* altamente productores, la actividad específica de la enzima glutamato deshidrogenasa está desreprimida mientras que en los mutantes de baja producción esta actividad enzimática está reprimida. La

alteración de la regulación de la glutamato deshidrogenasa puede aumentar la asimilación del nitrógeno favoreciendo así la síntesis de CPC (Página Web Departamento de Microbiología, Universidad de Salamanca 2003).

4.2.3.4 Regulación por fosfato

Se encontró que un exceso de fosfato ejercía un efecto negativo en la producción de CPC por *A. chrysogenum* W53253 (Küenzi, 1980). Las bases de este efecto todavía son materia de debate, y el mecanismo molecular todavía no se comprende. Se sugería que el fosfato incrementaba la velocidad de consumo de glucosa, incrementando así la represión por glucosa (Küenzi, 1980), mientras que experimentos con micelio en suspensión indicaron que en ausencia de glucosa, el fosfato mismo disminuía el flujo completo para la formación de CPC (Martín y *col.*, 1982). Esto fue posteriormente apoyado por Zhang y *col.* (1988), quienes encontraron un efecto negativo directo del fosfato en la formación de varias enzimas (ACVS, IPNS, y DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa) de la ruta de biosíntesis de cefalosporina. Se sugirió que el fosfato actuaba sobre la IPNS y la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa a través de la formación de un complejo con el hierro, necesario para la actividad enzimática, porque la inhibición de estas dos enzimas podía ser revertida a través de la adición de hierro en forma de sal ferrosa (Lübbe y *col.*, 1984). Sin embargo, aún la inhibición de la ACVS, que no requiere hierro en forma de sal ferrosa para su actividad, era revertida por Fe^{2+} (Zhang y *col.*, 1989). Por lo tanto la causa del efecto inhibitorio del fosfato todavía no está completamente entendida.

4.2.3.5 Regulación por pH ambiental

Para determinar el efecto del pH en la expresión de los genes de biosíntesis de CPC en *A. chrysogenum*, Schmitt y *col.* (2001) analizaron los niveles de transcripción en cultivos en

crecimiento en medio amortiguado entre valores de pH de 5 y 8. El análisis de ARN total en dos cepas de *Acremonium* mostraron que: en la cepa silvestre ATCC 14553 el gen *pcbC* (que codifica para la proteína IPNS) es expresado a niveles apreciables solamente por encima de pH 5, mientras que el transcrito del gen *cefEF* (que codifica para la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa) no es detectable por hibridación de Northern aún a pH 8. En contraste con esto, la cepa semiproductora A3/2 expresa ambos transcritos sobre el intervalo completo de pH estudiado. Los niveles más altos de transcripción fueron observados para cultivos creciendo entre pH 6 y pH 7.

En hongos filamentosos el factor de transcripción PACC es importante para la expresión génica en respuesta al pH del ambiente (Espeso y Peñalva, 1996; Suárez y Peñalva, 1996). El estudio de Schmitt y *col.* (2001) caracterizó el gen *pacC* de *A. chrysogenum*, mostrando que su proteína PACC se unía a todas las secuencias consenso PACC que están presentes en las dos regiones intergénicas conocidas de los genes de biosíntesis de CPC.

4.2.3.6 Efecto del oxígeno en el sistema respiratorio y en la producción de CPC

La velocidad completa de la síntesis de CPC es severamente reducida en condiciones de concentración baja de oxígeno. La reducción en la provisión de oxígeno lleva a la acumulación de penicilina N, un precursor de la CPC. El mecanismo de control del oxígeno sobre la síntesis de CPC no está completamente comprendido. Posiblemente, los bajos niveles de oxígeno afectan directamente a la ruta biosintética de la CPC, la cual incluye tres reacciones de oxidación. También es posible que un metabolismo completo más eficiente provisto por niveles más altos de oxígeno, indirectamente resulte en niveles mayores de producción de CPC (DeModena y *col.*, 1993).

Una revisión de Sandor y *col.* (2003) indica que *A. chrysogenum* posee una ruta respiratoria en su mitocondria resistente al cianuro, que se vale de una llamada oxidasa alternativa (AOX) para realizar su funcionamiento. Esta AOX responde de manera primaria a procesos que involucran la generación de especies que contienen oxígeno reactivo (ROS), incluyendo el incremento de aireación, el catabolismo de ciertas fuentes de carbono y el envejecimiento. Se probó que la actividad de la AOX juega un papel crucial en la sobreproducción de CPC a través de la remoción de equivalentes reductores, permitiendo así que el catabolismo del carbono proceda. Bajo condiciones no productoras, esta relación se pierde. Sin embargo, una inhibición de la generación de ROS resultaría inevitablemente en la disminución de la actividad de la AOX y subsecuentemente en una producción de CPC reducida, independientemente de la tecnología de producción utilizada.

4.2.4 Mejoramiento genético

Se han realizado diferentes aproximaciones para el mejoramiento genético de *A. chrysogenum* con vistas a una mayor producción de CPC, incluyéndose tanto métodos de mejoramiento genético clásico como mejoramiento genético molecular.

Entre los estudios de mejoramiento genético clásico se puede mencionar el de Chang y Elander (1979); ellos reportaron métodos efectivos para la selección directa de variantes mejoradas de *A. chrysogenum*. En una de estas líneas, estos autores estudiaron tres tipos de mutantes morfológicas. Observando que mutantes que formaban colonias compactas más pequeñas en medio químicamente definido mostraban la proporción más grande de aislados mejorados (alrededor del 4%).

El mejoramiento genético basado en el aislamiento de colonias mutantes morfológicamente compactas, confirmó que este es un procedimiento útil para el aislamiento

de cepas de mayor producción (Vialta y col., 1997). Aproximadamente el 2% de las colonias analizadas producían significativamente más CPC que la cepa original.

Diversos intentos de mejoramiento genético molecular han sido empleados para mejorar la producción de CPC en *A. chrysogenum*: en la cepa 394-4 de este microorganismo (cepa de producción mejorada) la inserción de múltiples copias del gen *ipnA* (codifica para la IPNS) no produjo resultados exitosos (Skatrud y col., 1989). Sin embargo, en este mismo estudio se reportó un incremento de un 15% en la producción de CPC a través de la transformación de la cepa con una copia extra del gen que codifica para la DAOC sintetasa/DAC hidroxilasa (*cefEF*). Sin embargo, cuando los experimentos se realizaron, no se conocía que *cefG* que codifica para la acetilCoA: DAC acetiltransferasa, está cercanamente unido a *cefEF* y estaba también presente en el plásmido utilizado para la transformación. Se demostró entonces que transformantes del tipo silvestre de *A. chrysogenum*, portando copias adicionales del gen *cefG* solamente, mostraban una relación directa entre el número de copias de este gen, los niveles de ARNm y los niveles de CPC producida, sugiriendo que esta enzima podría representar un paso limitante en la producción de CPC (Matsuda y col., 1992; Mathison y col., 1993). Por lo tanto, el efecto del gen *cefEF* solo en el incremento de la producción de CPC permanece sin aclarar.

Dado que la biosíntesis de CPC está regulada por el contenido de oxígeno del medio (Hilgendorf y col., 1987), Demodena y col. (1993) mejoraron el metabolismo aerobio en *A. chrysogenum* a través de la utilización de una hemoglobina de la bacteria *Vitreoscilla*. Su gen estructural (*VHb*) se fusionó con el fuerte promotor constitutivo TR1 de *Trichoderma reesei*. Después de la transformación de *A. chrysogenum* C10, varias transformantes producían hasta 5 veces más CPC que las cepas control, en experimentos de cultivo en lote.

Muchas otras modificaciones moleculares de *A. chrysogenum* se han realizado para el mejoramiento de la producción de CPC con este microorganismo (Samson y col., 1985; Chapman y col., 1987; Balwin y col., 1990; Hoskins y col., 1990; Smith y col., 1992); además de estudios de la aplicación de otras tecnologías en fermentación sumergida (Park y Khang, 1995). Sin embargo aún no se tienen niveles de CPC producida por *A. chrysogenum* como los alcanzados para penicilina con *P. chrysogenum* (Brakhage, 1998), y considerando que mientras el mejoramiento genético en *P. chrysogenum* es debido en buena parte a la amplificación de los genes de la biosíntesis de β -lactámicos, y que tal rearrreglo del genoma no ha sido reportado para *A. chrysogenum* (Smith y col., 1989; Walz y Kück, 1991; Fierro y col., 1995; Newert y col., 1997); se ha sugerido que el mejoramiento genético en este hongo parece estar correlacionado con la alteración de los mecanismos regulatorios, llevando a un incremento de la transcripción (Walz y Kück, 1993; Jekosch y Kück, 2000).

4.3 Fermentación en medio sólido (FS)

La FS es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida (Lonsane y col., 1985), matriz que tiene la propiedad de absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles. Los materiales sólidos pueden ser o no biodegradables (por ejemplo, almidón y celulosa son soportes degradables, mientras que el poliuretano no lo es). El crecimiento de los microorganismos en FS requiere que éstos crezcan sobre un soporte que difunda nutrientes, bajo una atmósfera gaseosa (Viniestra-González, 1997).

4.3.1 Consideraciones generales

Se pueden distinguir dos tipos de FS, dependiendo de la naturaleza de la fase sólida utilizada (Barrios-González y Mejía, 1996):

- a) Cultivo sólido de una fase soporte-sustrato. La fase sólida está constituida por un material que asume, simultáneamente, la función de soporte y fuente de nutrientes. Este material es generalmente de naturaleza amilácea y lignocelulósica. La mayoría de aplicaciones de la FS utilizan este sistema.
- b) FS de dos fases soporte-sustrato. En este tipo de fermentación, la fase sólida se considera como un soporte inerte que sirve como reservorio para una solución nutritiva. La capacidad de retención de agua es de primordial importancia en la selección de un soporte de este tipo.

La FS ha sido usada desde la antigüedad para la preparación de alimentos fermentados, ensilajes y composteo. Actualmente, está siendo utilizada para nuevos propósitos, incorporando conocimientos aportados desde los campos de la microbiología, la bioquímica y la ingeniería bioquímica. Este sistema de cultivo puede presentar ventajas significativas sobre los métodos de cultivo sumergido para la manufactura de productos de interés (y no sólo los tradicionalmente obtenidos de esta forma). Entre ellas, se podría destacar que a menudo no se requieren condiciones estériles para el proceso (ya que este procede como un cultivo puro desde el momento en que las condiciones utilizadas favorecen ecológicamente a los hongos y actinomicetos, los microorganismos principalmente asociados con la formación de metabolitos secundarios), la morfología micelial de hongos y actinomicetos se adapta bien al crecimiento invasivo sobre medio sólido, los requerimientos de energía en FS son relativamente bajos y,

sobre todo, los metabolitos se producen a menudo en cantidades mucho más altas que las observadas en cultivo sumergido (Barrios-González y Mejía, 1996).

4.3.2 Factores ambientales que afectan la FS

Un cuidadoso análisis de la literatura evidencia que los principios básicos, respecto a los factores que gobiernan la producción de metabolitos secundarios en FS, comienzan a conocerse de una mejor manera.

4.3.2.1 Contenido de humedad y actividad de agua

Como en los primeros trabajos con micotoxinas, los nuevos procesos confirman la importancia del contenido de humedad como un parámetro fundamental. No hay un estudio en el cual este factor no haya sido optimizado, y su importancia llega a ser evidente cuando se observan cambios en la producción, bajo diferentes valores de contenido de humedad inicial. Este es un hecho esperado desde el momento en que el agua tiene un papel importante en la difusión de enzimas, nutrientes y productos a través de la matriz sólida. Sin embargo, la importancia de esta variable parece ser más crítica para la formación de metabolitos secundarios, probablemente porque las condiciones iniciales deben generar un ambiente adecuado para la producción, después de la fase de crecimiento rápido (Barrios-González y Mejía, 1996).

La actividad de agua (A_w) está relacionada con la concentración de solutos en un medio líquido y representa la parte no ligada, y por lo tanto disponible, de agua. En la FS la determinación del agua disponible durante el cultivo es un problema importante. El contenido de humedad de un cultivo sólido en cualquier momento, está constituido por: 1) agua disponible, 2) agua ligada, y 3) agua constitutiva del micelio. A través del desarrollo del cultivo, esta última fracción aumenta, mientras que el agua disponible disminuye. Sin

embargo, el agua disponible es una cantidad desconocida, debido a que no existe un método preciso de cuantificación (Barrios-González y Mejía, 1996).

Los contenidos de humedad inicial óptima para el crecimiento de los microorganismos, dependen de la capacidad de retención de agua en el medio sólido y son menores en sistemas de FS en grano, con valores de aproximadamente 35%. En sistemas de harinas este parámetro es cercano al 50%, y en salvado de trigo entre 50 y 60% (Barrios-González y Mejía, 1996).

Una interesante visión de la naturaleza del metabolismo secundario en cultivos sólidos está surgiendo de la investigación realizada en sistemas de dos fases soporte-sustrato. Hasta qué punto estas conclusiones pueden ser extrapoladas a otros sistemas de FS aún queda por estudiarse.

Sato y *col.* (1983) desarrollaron un modelo matemático de crecimiento microbiano en FS usando pulpa de madera con medio líquido impregnado. Resultados con *Candida lipolitica* mostraron que un incremento en la velocidad específica de crecimiento está directamente relacionado con un incremento de la humedad del medio sólido, así como con la humedad relativa del flujo de aire. Después, Oriol y *col.* (1988) llevaron a cabo estudios con *Aspergillus niger* en FS usando bagazo de caña con medio líquido absorbido. Los autores encontraron que, cuando la humedad inicial varía entre 40 y 75%, pero manteniendo constante la concentración del medio (A_w de 0.97), la velocidad de crecimiento no se modificó ($\mu = 0.4/h$). Sin embargo, cuando la A_w (y la humedad inicial) se modificaron, entre 0.9 y 0.986, con diferentes concentraciones de glucosa, μ variaba entre 0.19 y 0.54/h. La cantidad total de biomasa generada fue mayor en el medio más concentrado, a pesar de que el consumo de

azúcares no cambia grandemente. El impacto más importante fue en el tiempo de germinación, el cual osciló entre 5 y 20 h.

Puede decirse entonces que la A_w controla el crecimiento en FS (al menos en FS de dos fases soportes sustrato), teniendo un efecto directo en la velocidad de crecimiento y un efecto inverso en la germinación.

Barrios-González y *col.* (1988), a través de estudios acerca de la producción de penicilina, encontraron que existe una necesidad de medios concentrados en FS para una producción alta de metabolitos secundarios, lo cual representa una diferencia sobresaliente entre la fisiología en medio sólido y líquido.

Estudios de respiración en cultivos con diferentes combinaciones de componentes (Barrios-González y *col.*, 1997) muestran que, al igual que en cultivos líquidos, la producción comienza cuando el crecimiento (evaluado como actividad respiratoria), está limitado. La producción está controlada a través de la proporción del soporte y los otros dos componentes en el medio sólido (nutrientes y agua). Las producciones más altas se obtuvieron, cuando el medio sólido tenía un bajo contenido de bagazo de caña (10.3-12.5%). Las cinéticas respiratorias sugieren que cuanto más bajo es el contenido de bagazo en el medio sólido más lenta es la actividad metabólica. Es posible que la presencia de contenidos más altos de bagazo facilite el transporte de nutrientes y agua en el medio sólido por capilaridad. Esto significa que, bajo condiciones de bajo contenido de soporte, la provisión de nutrientes es más lenta, de tal modo que genera mejores condiciones metabólicas (valores altos de μ durante la idiofase) para la producción de antibióticos (Pirt y Righelato, 1967), probablemente haciéndola durar más.

4.3.2.2 **Tamaño de partícula y densidad de empaque**

Oriol y *col.* (1988) estudiaron la cinética de crecimiento de *A. niger* en FS sobre bagazo impregnado. Encontraron que incrementos en el tamaño de partícula del soporte disminuían la velocidad de crecimiento al final de la fase de crecimiento y sugerían que este efecto depresivo podía estar causado por limitaciones debidas a la difusión intraparticular de nutrientes. Este efecto podría favorecer el metabolismo secundario ya que la limitación de nutrientes dispara y mantiene la idiofase (Barrios-González y *col.*, 1993).

4.3.2.3. **Aireación y mezclado**

El ambiente gaseoso puede afectar significativamente los niveles relativos de biomasa y producción de enzimas (Mudgett y *col.*, 1987). Han y Mudgett (1992) encontraron que los niveles de oxígeno y bióxido de carbono en el ambiente gaseoso tienen una influencia significativa sobre la producción de pigmentos y sobre el crecimiento, aunque en menor magnitud. Experimentos realizados en nuestro laboratorio acerca del efecto de diferentes velocidades de flujo de aire en la producción de aflatoxinas (Barrios-González y *col.*, 1990) utilizando harina de cassava como soporte-sustrato, mostraron un moderado efecto positivo cuando se incrementan las velocidades de aireación entre 0 y 0.3 l/h.g de medio humedecido.

Se considera que el mezclado previene la heterogeneidad de la composición del medio sólido y de la edad micelial, además de que se puede usar para mejorar el intercambio de gases y para remover el calor del medio sólido (Barrios-González y Mejía, 1996).

4.3.2.4 **Pretratamiento del sustrato o soporte**

Este es un factor físico importante. Esterilizar en autoclave el medio sólido humedecido puede causar cambios en el sustrato y hacerlo más susceptible a la degradación

durante la fermentación. En el caso de soportes inertes, el pretratamiento puede modificar su capacidad de retención de agua (Barrios-González y Mejia, 1996).

4.3.2.5 **Tamaño de inóculo**

En FS el inóculo debe estar distribuido homogéneamente y su concentración debe ser lo suficientemente alta para asegurar la predominancia de la cepa.

Entre los estudios donde se utilizaron esporas como inóculo, la producción de alcaloides sobre granos de centeno muestra datos interesantes acerca de la influencia del inóculo (Trejo, 1992). Estudiando tamaños de inóculo de entre 2×10^6 y 2×10^8 esporas/g de medio seco, los resultados mostraron que a través del incremento del tamaño de inóculo, la fase de germinación disminuía ligeramente, mientras que la velocidad de crecimiento se incrementaba. Sin embargo, la producción más alta de alcaloides fue obtenida con 2×10^7 esporas/g. Estudios con *Streptomyces viridifaciens* indican que al parecer con un actinomiceto, con una menor capacidad de colonizar el medio sólido que un hongo, se requiere un tamaño mayor de inóculo (Yang y Ling, 1989).

El efecto de un inocular con diferentes concentraciones de micelio (de 0.8 a 2.5 mg de biomasa seca/mL) fue también probado en la producción de cefamicina y cefalosporina en FS con cebada, donde se encontró que la producción de antibiótico se incrementaba proporcionalmente al tamaño de inóculo, y se concluyó que 2.5 mg/mL era la concentración óptima a utilizar (Jermini y Demain 1989).

4.3.3 **Mejoramiento de cepas para FS**

A pesar de que las cepas altamente productoras en cultivo líquido tienden a ser menos eficientes en cultivo sólido (Barrios-González y *col.*, 1993), algunas mutantes derivadas de estas cepas muestran muy buen desempeño en medio sólido en base a resultados de

producción relativa alta (definiéndose producción relativa como la relación entre la producción máxima en medio sólido y la producción máxima en medio líquido). Las características que permiten una producción relativa alta no parecen estar relacionadas con las rutas de biosíntesis de antibióticos, ya que solamente se expresan en FS. Sin embargo existen estudios (Ohno y *col.*, 1992) que apoyan la idea de que las cepas cercanas al tipo silvestre tienden a mostrar una producción relativa más alta.

4.4 Cultivos de *Acremonium chrysogenum* C10 para la producción de CPC

La cepa C10 de *A. chrysogenum* es conocida como una cepa de alta producción de cefalosporina. Shen y *col.* (1986) reportaron una producción de 18 g/L en fermentaciones agitadas usando un medio complejo. Rowlands (Panlabs. Inc.) estableció que bajo las mismas condiciones, la cepa C10 puede producir entre 10 y 13 g/L de CPC (Vialta y *col.*, 1997). Vialta y *col.* hicieron intentos exhaustivos para alcanzar los niveles antes mencionados, incluyendo pruebas en diferentes medios y condiciones de fermentación. Sin embargo la producción máxima obtenida fue de 1.5 g/L de CPC. Skatrud y Queener (1989), Smith y *col.* (1991), y Walz y Kück (1991), usando diferentes métodos, reportaron que las cepas industriales de *A. chrysogenum* tienen patrones cromosómicos claramente diferentes de las cepas originales. Esto indica que ocurren translocaciones de cromosomas y otras aberraciones durante el proceso de mejoramiento genético de esas cepas. Como C-10 es una cepa industrial, es posible que sus cromosomas tengan algunas translocaciones y que durante el almacenamiento hayan ocurrido rearrreglos que disminuyeron abruptamente el nivel de producción de la cepa (Vialta y *col.*, 1997).

4.4.1 Cultivos en medio líquido

Los trabajos más recientes que reportan la producción de CPC por cultivos de *Acremonium chrysogenum* C10 (ATCC 48272) utilizan medios que contienen dos fuentes de carbono, glucosa y sacarosa. El proceso de producción de CPC en biorreactores en lote muestra dos fases distintas: durante la primera fase, una fuente de carbono fácilmente metabolizable como la glucosa es rápidamente consumida y es cuando se realiza la mayor parte del crecimiento; mientras que en la segunda fase, una fuente de carbono que se consume lentamente como la sacarosa es asimilada y la síntesis de antibiótico empieza. Este es un típico efecto diauxico del consumo de dos carbohidratos. El lento metabolismo de la sacarosa en la producción de CPC puede ser explicado por la baja actividad de la enzima responsable de la hidrólisis del azúcar durante el proceso, y esto provee de buenas condiciones para la producción de altas concentraciones de antibiótico en procesos en lote convencionales (Vicik y col., 1990, Machado y col., 1997).

Algunos trabajos acerca de la producción de CPC en biorreactor en lote reportan el mejoramiento de la producción utilizando un medio de cultivo con glucosa y sacarosa (Chu y Constantinides, 1987; Basak y col., 1995), mientras que en otras investigaciones se trabaja con procesos de lotes alimentados, en los que la sacarosa y la metionina se adicionan lentamente, obteniéndose mejoras significativas. Sin embargo, la sacarosa es de por sí un azúcar lentamente metabolizable, y el mejoramiento obtenido por este tipo de aproximaciones debería ser explicado por la adición de metionina (Vicik y col., 1990).

La información acerca de los parámetros cinéticos para la producción de CPC es muy escasa en la literatura. Los parámetros de velocidad específica de crecimiento y de velocidad de consumo de sustrato ($\mu_{\text{máx.}}$ y $Y_{x/s}$) fueron estimados por Araujo y col. (1996) para esta

misma cepa en experimentos en lote siendo los valores calculados 0.0645 h^{-1} y 0.655 g de biomasa/g de sustrato, en experimentos con medio de cultivo con glucosa y sacarosa. Chu y Constantinides (1987) presentan un valor estimado igual a 0.02217 g de biomasa/g de sustrato h y Araujo y *col.* (1996) obtuvieron 0.036 g de biomasa/g de sustrato h, estos valores se refieren al consumo de sacarosa. No es posible comparar los diferentes valores presentados, debido a que han sido obtenidos bajo condiciones de cultivo significativamente diferentes.

En estudios más recientes (Cruz y *col.*, 1999), realizados con el objeto de modelar y optimizar la producción de CPC en biorreactor alimentado, durante la fase de crecimiento solamente se proporcionó glucosa como fuente de carbono y en la fase de producción solamente se adicionó sacarosa hidrolizada. Se estimaron los valores de diferentes variables del proceso y se desarrolló un modelo matemático para representar el proceso de producción de la CPC en el lote alimentado, el cual predice una producción de CPC máxima estimada de aproximadamente $2300 \text{ } \mu\text{g/mL}$ al final de un proceso de 5 días, lo cual es significativamente mayor a lo obtenido mediante la fermentación en lote bajo condiciones de cultivo lo más similares posible. Sin embargo, los autores no realizan ningún experimento para confirmar esta predicción, además de que considerando las proporciones de las dos fuentes de carbono del medio utilizado para realizar la alimentación del lote es difícil entender como el sustrato se dirige a la producción de CPC siendo la concentración de glucosa muy similar a la del medio inóculo donde la glucosa tiene como principal finalidad el crecimiento y no la producción de CPC.

4.4.2 Cultivos en medio sólido

Wang y *col.* (1984) investigaron la producción de CPC en FS con arroz como sustrato basal. Entre diferentes granos estudiados como sustrato basal, el arroz Tsailai fue el mejor. Se

determinó la mejor fórmula (Anexo 6A) para el medio de fermentación en la base de 10 gramos de arroz y utilizando la cepa M8650-R-3 de *Acremonium chrysogenum*, con una densidad de inóculo de 2.8×10^8 esporas/g de sustrato, humedad inicial de 49-51% y temperatura de fermentación de 25 °C. Después de 7 días de fermentación, la producción máxima de CPC fue de 6420 µg/g de sustrato. Resulta complicado el análisis del medio de cultivo en este caso debido a que se podría presumir una alta concentración de fuente de carbono aprovechable del soporte (arroz Tsailai), pero no existe evidencia de la proporción de ésta que realmente es accesible para el hongo, ya que no se realizan mediciones de biomasa o sustrato consumido.

En estudios en los que se utiliza como soporte cebada, y *Acremonium chrysogenum* C10 como microorganismo productor (Jermini y Demain, 1989), apenas se alcanza una producción máxima de 950 µg/g de sustrato después de 10 días de fermentación sólida.

Otros estudios acerca de la producción de CPC empleando *Acremonium chrysogenum* ATCC 48272 (cepa C-10) por cultivo en medio sólido, indican que los mejores resultados fueron observados con 10 g de trigo crudo adicionado con sustratos complementarios (Anexo 6B), obteniendo una producción de CPC de 22281 µg/g de sustrato después de un período de incubación de 5 días, a 30 °C, inoculado con 2×10^7 esporas/g de sustrato, con una humedad del 80% y un pH de 6.5. (Adinarayana y col., 2003). En este estudio también se observa la carencia de mediciones de producción de biomasa y consumo de sustrato, por lo que no se indican tampoco reportes acerca de la eficiencia del proceso, además de que no hay un seguimiento cinético de este.

5. Materiales y Métodos

5.1 Microorganismos utilizados

Acremonium chrysogenum ATCC 48272 (C10). Cepa de alta producción de CPC proporcionada por el Dr. Juan Francisco Martín (Universidad de León, España).

Escherichia coli ESS 2231 Cepa supersensible a antibióticos β -lactámicos utilizada para la cuantificación de CPC por bioensayo proporcionada por el Dr. Juan Francisco Martín (Universidad de León, España).

5.2 Medios de Cultivo y Reactivos

5.2.1 Medios de cultivo para *E. coli* ESS 2231

Medio Luria Bertani (LB; Miller, 1972)(g/L)

Bacto triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

Se ajusta a pH 7.5 con NaOH ó HCl

Medio TSA (Gutiérrez, 1994)(g/L)

Peptona de caseína	16
Peptona de soya	3
Glucosa	2.5
NaCl	6
K ₂ HPO ₄	2.5

Se ajusta a pH 7.0

Cuando se utiliza para crecimiento se añaden 20 g/L de agar bacteriológico y para bioensayo 10 g/L.

5.2.2 Medios de cultivo para *Acremonium chrysogenum*

LPE (Medio de Esporulación y Mantenimiento, modificado de Le Page y col., 1946)(g/L)

Glucosa	1
Extracto de Levadura	2
NaCl	1.5
CaCl ₂	10
Agar	20

Se ajusta a pH 6.8 con NaOH ó HCl

Medio Power de esporulación para *Penicillium chrysogenum* (Castillo, 1993)(g/L)

Sacarosa	15
Lactosa	15
NaNO ₃	1
K ₂ HPO ₄	0.25
CuSO ₄ .7H ₂ O	0.0005
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.0015
KH ₂ PO ₄	0.03
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.275
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005
Bactopeptona	2.5
Sólidos de Maceración de Maíz	0.25
NaCl	2
Agar Bacteriológico	20
pH= 6.4	

Agar Almidón (g/L)

Peptona de gelatina	5
Extracto de carne de res	3
Almidón	2
Agar	15
Ajustar a pH 7.0 con HCl ó NaOH	

MDIA Medio definido de inóculo de *Acremonium* (Shen y col., 1986)(g/L)

Glucosa	10
CaCO ₃	5
Sólidos de maceración de maíz	30
Almidón	30
Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH o HCl	

MSMA (Medio semilla modificado, Adinarayana y col., 2003)(g/L)

Glucosa	10
Sólidos de maceración de maíz	5
Almidón soluble	15
Extracto de levadura	4
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1
CaCO ₃	1
Se ajusta a pH 7.0 con NaOH ó HCl	

MCFA (Medio complejo de fermentación para *A. chrysogenum*, Caltrider y col., 1966.)(g/L)(1X)

CaCO ₃	1.5
Sólidos de maceración de maíz	5
Melazas de remolacha	30
Extracto de carne (Difco)	30

Se ajusta a pH 6.8 o al pH ensayado con NaOH ó HCl

MFAP 0.015 (Medio de fermentación para *A. chrysogenum* con amortiguador de fosfatos 0.015M)(g/L)(2X)

KH ₂ PO ₄	2.04
K ₂ HPO ₄	2.49
Sólidos de maceración de maíz	10
Melazas de remolacha	60
Extracto de carne (Difco)	60

Se ajusta a pH 5.8 con KOH ó H₃PO₄

MFAP 0.075 (Medio de fermentación para *A. chrysogenum* con amortiguador de fosfatos 0.075M)(g/L)(2X)

KH ₂ PO ₄	10.21
K ₂ HPO ₄	12.26
Sólidos de maceración de maíz	10
Melazas de remolacha	60
Extracto de carne (Difco)	60

Se ajusta a pH 5.8 con KOH ó H₃PO₄

MFAS (Medio de fermentación para *A. chrysogenum* con amortiguador de sulfato)(g/L)(2X)

CaSO ₄	12.5
Sólidos de maceración de maíz	10
Melazas de remolacha	60
Extracto de carne (Difco)	60

Se ajusta a pH 5.8 con NaOH ó HCl

5.2.3 Reactivos para determinación de glucosamina (Anexo 3)

5.3 Crecimiento de los microorganismos

5.3.1 Crecimiento de *E. coli* ESS 2231. Para el crecimiento en medio líquido se utilizó medio LB, y en medio sólido TSA al 2%.

5.3.2 Crecimiento de *Acremonium chrysogenum*

5.3.2.1 Condiciones para la esporulación

Para la obtención de esporas se cultivó *A. chrysogenum* en los medios LPE, Power de esporulación de *Penicillium* y agar almidón, en cajas de Petri con aproximadamente 25 mL de estos medios durante 7 días a 28°C. A continuación, se colectó el contenido de cada caja con 5 mL de MSMA raspando, con una pipeta invertida para obtener una suspensión que sería utilizada para el medio semilla.

5.3.2.2 Condiciones para la producción de inóculo

Se inocula un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de MSMA con el contenido procedente de 3 placas de medio LPE. Se incuba a 25°C durante 38 horas a 200 rpm.

5.3.2.3 Producción de CPC

Condiciones generales

Temperatura: 25°C

pH inicial : 6.8 o variable de acuerdo al experimento.

Inóculo: 0.1% peso seco biomasa/peso de soporte humedecido, procedente de cultivo de 38 h de MSMA

Aireación: 1.4 L/h (columna), 5 minutos en campana de flujo laminar cada 24 h. (matraz)

% de Humedad: 70% en bagazo de caña y 75% en espuma de poliuretano o variable de acuerdo a experimento.

5.3.2.3.1 Cultivo en bagazo de caña

Pretratamiento del bagazo. El bagazo de caña se tamiza con malla N°30 y 50, utilizando la fracción que queda retenida entre estas dos mallas (para todo este trabajo se utilizó el mismo lote de bagazo de caña).

El bagazo tamizado se mezcla con aproximadamente el 35% del agua total a utilizar en el cultivo, se tapa con aluminio y se somete a vaporización en autoclave (válvula abierta) durante 30 minutos, procediéndose a la esterilización durante 15 min. a 15 lbs. de presión.

Preparación del medio. Se calculan los componentes del medio de acuerdo al agua total a utilizar en la fermentación, se disuelven en el 60% del agua total a utilizar, se ajusta el pH tomando en cuenta el volumen utilizado para luego agregar la cantidad necesaria de agua para completar el 64% del agua total (el 1% faltante es el que proporciona el inóculo).

Inoculación. Se centrifuga durante 3 minutos a 2700 rpm, un volumen de medio semilla de 38 horas que de acuerdo a la cinética de crecimiento (Sección 5.3) contenga la cantidad necesaria de micelio para inocular la fermentación al 0.1% peso seco de biomasa/peso de soporte humedecido. Se decanta el sobrenadante y el residuo se mezcla con el medio de fermentación, se agita 1 min. y se mezcla con el bagazo de caña estéril hasta lograr una coloración homogénea de la mezcla.

Empacado de las columnas. Se llena la columna de fermentación con 12 g de bagacillo de caña, estéril e inoculado de la manera indicada. Las columnas deben estar marcadas previamente en la longitud hasta donde se deben llenar para tener una densidad de empaque de 0.26g/cc.

5.3.2.3.2 Cultivo en espuma de poliuretano

Pretratamiento del poliuretano : Poliuretano de 24 kg/m^3 se corta en cubos de aproximadamente 1 cm^3 . Se sumergen en ácido clorhídrico 1M durante 10 minutos y se lavan con agua hasta neutralizar. Se repite la operación de inmersión, utilizando NaOH 0.1N. Se lavan los cubos nuevamente. Se secan a 60°C y se mezclan con aproximadamente el 35% del

agua total a utilizar en el cultivo, se tapa con aluminio y se esteriliza durante 15 min. a 15 lbs. de presión.

Se prepara el medio y se inocula de la misma forma en que se realiza para el bagazo de caña.

Empacado de las columnas. Se llena la columna de fermentación con 10g de poliuretano, estéril e inoculado de la manera indicada. Las columnas deben estar marcadas previamente en la longitud hasta donde se deben llenar para tener una densidad de empaque de 0.16 g/cc.

En todas las fermentaciones cada una de las mediciones se realizan por duplicado. Se evaluó: producción de CPC (procedimiento en 5.5.2); azúcares totales (procedimiento en 5.5.3), pH durante el proceso (procedimiento en 5.5.4), y humedad durante el proceso (procedimiento en 5.5.5). En el experimento final se realiza la medición de glucosamina para estimar el crecimiento (procedimiento en 5.5.7).

5.4 Mantenimiento de los microorganismos

E. coli ESS 2231: se conserva en glicerol a -20°C a una concentración final del 20%

A. chrysogenum C10: Conservación de micelio a -20° en glicerol en una concentración final del 40%.

5.5 Técnicas analíticas

5.5.1 Métodos de extracción de CPC

Se evalúa el porcentaje de recuperación del producto desde el medio sólido, mediante simulación de condiciones de cultivo además de la adición al medio sólido de cantidades

conocidas de cefalosporina. La cantidad recuperada nos indica la eficiencia del proceso. La extracción de la cefalosporina de cada uno de los soportes de fermentación se realiza por las técnicas indicadas en 5.5.1.1-3. La producción de cefalosporina se analiza por medio de bioensayo con *E. coli* ESS-2231 (Anexo 1).

5.5.1.1 Solvente de extracción: Agua destilada

Se toman 2 g de muestra del cultivo sólido, los cuales se tratan con 50 mL de agua destilada, agitándose completamente con agitador magnético durante 30 min. El contenido completo es filtrado a través de un filtro de nylon Nylal. El residuo es tratado nuevamente de la misma manera con agua destilada, filtrando posteriormente. Se mezclan los filtrados y se utiliza esta solución para el ensayo. Se hacen las diluciones necesarias para obtener halos de inhibición que se encuentren dentro de la línea dosis/respuesta del ensayo.

5.5.1.2 Solvente de Extracción: Amortiguador de Fosfatos pH 3.0

Se pesa 1 g de muestra del cultivo sólido se agita a 175 rpm por 60 min. con 3 mL de tampón de fosfatos 0.1 M (pH 3.0) a 25 °C. Al final del tiempo de centrifugación se repite la adición de extractante y la centrifugación dos veces más (volumen final de extractante: 9 mL). Se hacen las diluciones necesarias para que los halos de inhibición se encuentren dentro de los valores normales para la línea dosis/respuesta.

5.5.1.3 Solvente de Extracción: amortiguador de fosfatos pH 5.5

Se pesan 0.5 g de la muestra del cultivo sólido y se añaden 3 mL de amortiguador de fosfatos de potasio (pH 5.5, 0.01 M). Se agita y centrifuga a 2700 rpm, durante 20 min. Se separa el sobrenadante, el cual se utiliza para determinar la concentración de CPC. Se hacen las diluciones necesarias para que los halos de inhibición se encuentren dentro de los valores normales para la línea dosis/respuesta.

5.5.1.4 Método de extracción: Prensado (para espuma de poliuretano)

Se pesan 0.5 g de la muestra del cultivo sólido se exprime con una jeringa de 20 mL se hacen las diluciones necesarias para obtener halos de inhibición que se encuentren dentro de los valores normales de la curva de calibración.

5.5.2 Cuantificación de CPC. Con el extracto obtenido a través del procedimiento determinado de acuerdo al punto 4.5.1 se realiza la cuantificación de la CPC por bioensayo descrito en el Anexo 1.

5.5.3 Cuantificación de azúcares totales. Con el extracto obtenido a través del procedimiento determinado de acuerdo al punto 4.5.1 se realiza la cuantificación de la azúcares totales por el método de DNS modificado, descrito en el Anexo 2.

5.5.4 Determinación de pH. Se mezcla 1 g de muestra del cultivo con 10 mL de agua destilada agitando durante 10 min. (agitador magnético) antes de la determinación con potenciómetro.

5.5.5 Determinación de humedad. Se toma una muestra de 2 g del sistema de fermentación y se pesa, luego se seca en estufa a 60°C y se lleva a peso constante, se determina el porcentaje de humedad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso húmedo de la muestra} - \text{peso seco de la muestra}}{\text{peso húmedo de la muestra}} \times 100$$

5.5.6 Método de cilindros de agar para la selección de cepas de *Acremonium chrysogenum*.

Se prepararon cajas de Petri de 100 x 15 mm con medio MCFA (2X) y agar al 2% . Cuando el medio se solidificó completamente se hicieron los cilindros con un sacabocados de 8 mm de diámetro. Cada cilindro se inóculo en toda su superficie, con la ayuda de un palillo de madera, con una suspensión de micelio de *Acremonium chrysogenum* preparada

disolviendo una colonia pequeña del microorganismo en 20 μ L de solución salina . Se incubaron los cilindros a 25°C, se hicieron bioensayos a los dos, tres y cuatro días de incubación, de acuerdo al procedimiento descrito en 4.5.2.

5.5.7 Cuantificación de glucosamina.

De las muestras secas procedentes de la determinación de humedad, se pesan 0.3 g y se somete al pretratamiento y determinación de glucosamina, según se describe en el anexo 3.

6. Resultados

6.1 Extracción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano

Para estudiar la producción de CPC en medio sólido de dos fases, se consideró un elemento importante establecer primeramente el método de extracción de esta sustancia de los soportes propuestos para el trabajo.

Se añadió una cantidad conocida de CPC al medio de producción propuesto, de manera tal que al mezclarlo con los soportes éstos contuvieran una cantidad de CPC similar a la producción reportada en estudios previos de cultivos en medio sólido (Jermini y Demain, 1989). Se hicieron extracciones utilizando tres solventes de extracción: amortiguador de fosfatos pH 3.0 (Jermini y Demain, 1989), amortiguador de fosfatos pH 5.5 (Castillo, 1993), y Agua (Adinarayana y *col.*, 2003). En el caso de la espuma de poliuretano, se realizaron además extracciones por el método de expresión (Romero Gómez y *col.*, 2000).

En la tabla 6.1 se observan los porcentajes promedio de extracción en cada uno de los soportes utilizando los diferentes métodos de extracción acompañados de sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 6.1 Recuperación de CPC de los dos soportes estudiados utilizando diferentes métodos de extracción.

Técnica Soporte	Porcentaje de recuperación (media \pm desviación estándar)			
	Agua	Amortiguador de fosfatos pH 3.0	Amortiguador de fosfatos pH 5.5	Prensado
Bagazo de caña	71.60 \pm 5.24	65.02 \pm 7.76	82.39 \pm 9.90	
Espuma de poliuretano	101.22 \pm 6.99	78.14 \pm 14.56	96.56 \pm 14.54	98.37 \pm 7.01

Se realizó la prueba de análisis de varianza, complementada con la prueba de comparación múltiple de Tuckey Kramer a los resultados de cada uno de los soportes y se obtuvo que en el caso del bagazo de caña, solamente el porcentaje promedio de recuperación

con tampón de fosfatos pH 5.5 es mayor que el obtenido con amortiguador de fosfatos pH 3.0, mientras que ambos no difieren de manera considerable con el método de extracción con agua (a un nivel de significación muestral de 0.01).

En el caso de la espuma de poliuretano, el resultado de la extracción con agua es mayor aunque no significativamente diferente a los resultados obtenidos de las extracciones por expresión, con amortiguador de fosfatos pH 3.0, ni con amortiguador de fosfatos pH 5.5 (a un nivel de significación muestral de 0.023).

Se decide utilizar el método de extracción con amortiguador de fosfatos pH 5.5 en el caso del bagazo de caña, y para la espuma de poliuretano el método de extracción con agua.

6.2 Estudios de esporulación de *Acremonium chrysogenum* C10

Se eligieron tres medios indicados en la bibliografía para los estudios de esporulación de *Acremonium chrysogenum* C10 bajo las condiciones que se indican en la tabla 6.2. En

Condiciones	Medio de Cultivo	Observación
Temperatura 27°C 7 días	LPE (Gutiérrez, 1986)	No se observan esporas
	Power de Esporulación (Castillo, 1994)	No se observan esporas
	Agar Almidón (Adinarayana y col 2003)	No se observan esporas

los tres medios se observa la aparición de colonias blancas pequeñas que van de aproximadamente 1 a 4 mm de diámetro para el séptimo día de incubación (Figura 6.1a.).

Aunque lento, el crecimiento es notable desde aproximadamente el tercer día. Estas colonias al ser observadas con el microscopio de contraste de fases, teñidas con azul de metileno, presentan un micelio de paredes hialinas y delgadas (Figura 6.1b). En ninguno de los tres casos hubo diferenciación de elementos como conidióforos o esporas.

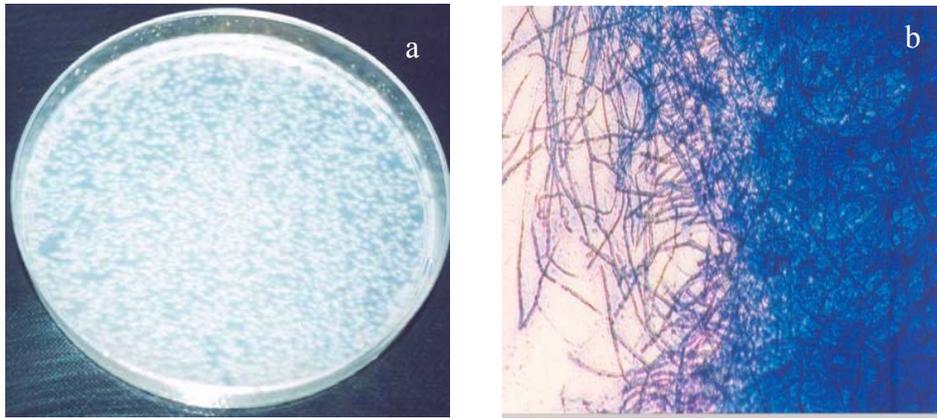


Fig 6.1 Morfología (a)macroscópica y (b) microscópica (20X) de *Acremonium chrysogenum* C10.

6.3 Cinética de *Acremonium chrysogenum* C10 en medio semilla

Debido a que no se obtuvieron esporas de *A. chrysogenum* bajo ninguna de las condiciones propuestas se consideró ineludible un inóculo de micelio por lo cual fue necesario estudiar el crecimiento de este microorganismo en medio semilla. Para ello se utilizó el medio semilla MSMA. Se realizó una cinética de crecimiento durante 60 horas.

Observando la figura 6.2 se aprecia que el pH tendió a disminuir en las primeras 28 horas del cultivo y aumentó el resto del tiempo del estudio; además, se detectó una fase de crecimiento rápido del hongo entre las 28 y 44 horas aproximadamente observándose después de ese tiempo un ligero descenso de la pendiente de la curva de crecimiento.

Simultáneamente se presentaron niveles bajos de producción de CPC desde las 20 horas, mostrándose un aumento de la producción de las 52 horas a las 60 h.

En base a los datos obtenidos se decidió inocular la FS con micelio de 38 horas, correspondiendo con una alta concentración de micelio en fase de crecimiento rápido (trofofase).

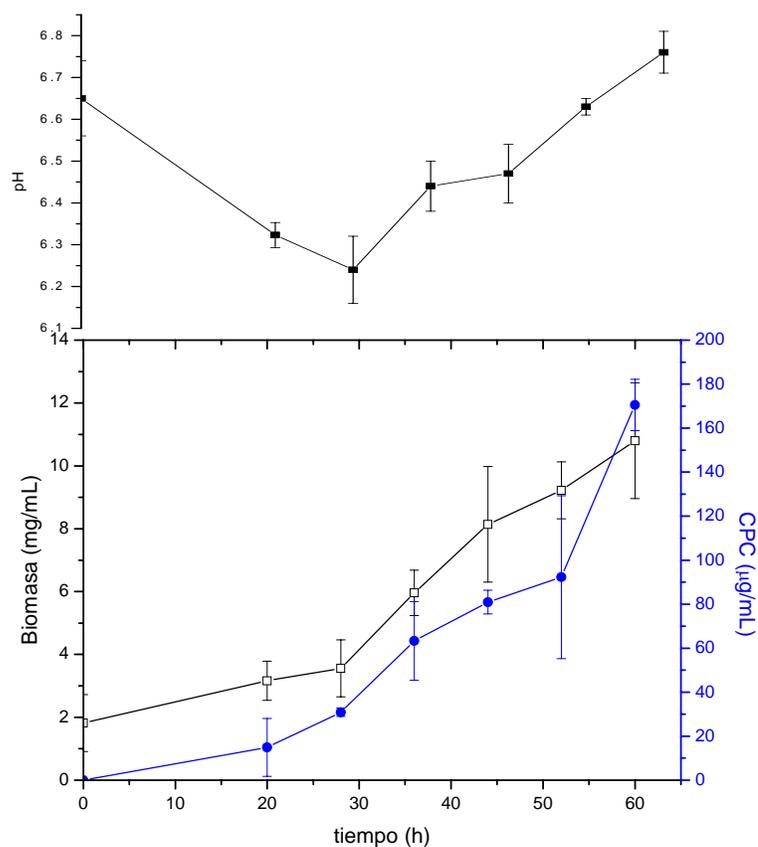


Fig 6.2 Cinética de crecimiento de *A. chrysogenum* C10 en MSMA (—■—)pH, (—□—) biomasa, (—●—) producción de CPC.

En base a los datos obtenidos se decidió inocular la FS con micelio de 38 horas, correspondiendo con una alta concentración de micelio en fase de crecimiento rápido (trofofase).

6.4 Experimentos preliminares de FS de *A. chrysogenum*: efecto de la aireación.

Cuando ya se habían determinado las condiciones necesarias de inóculo del medio semilla, se procedió a la realización de experimentos preliminares de cultivo de *A. chrysogenum* en FS, utilizando como soporte bagazo de caña y ensayando dos sistemas diferentes: columna aireada y matraz cerrado. Debido a que se observó contaminación del

cultivo en experimentos anteriores se tomó la decisión de estudiarlo en un sistema de matraz cerrado, considerando la posibilidad de que el aire disponible en el matraz fuera el suficiente para sus necesidades, lo cual había sido observado anteriormente en nuestro laboratorio para la producción de Lovastatina.

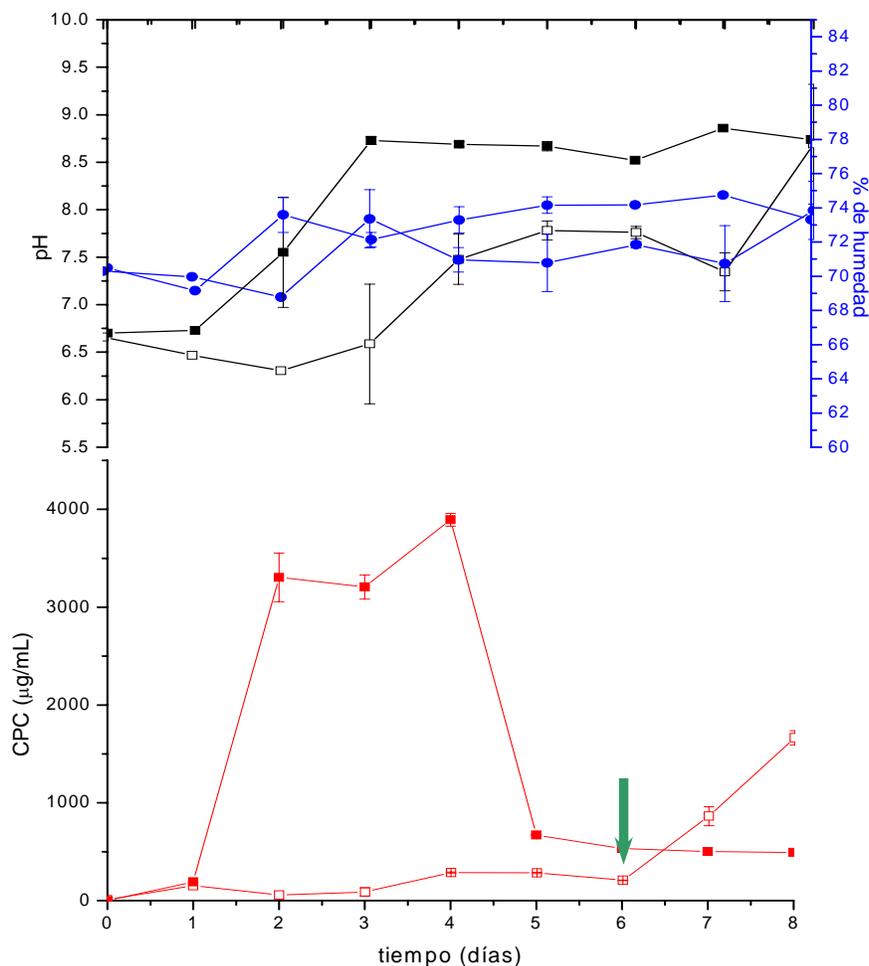


Fig 6.3 Cinéticas de cultivo de *A. chrysogenum* C10 en bagazo de caña utilizando dos sistemas: columna aireada 1.4 L/h. (símbolos cerrados) y matraces cerrados (símbolos abiertos) (—■—)CPC, (—■—) pH y (—●—) %de humedad. La flecha verde indica el momento en el que se hace el recambio de aire en los matraces.

Es importante observar (Fig 6.3) que el aumento de la producción de cefalosporina en el sistema en columna ocurre en un día (del día 1-2), para luego aproximadamente mantenerse

de los días 2 a 4. Por otro lado en el matraz al estar completamente cerrado se observa una producción mínima de cefalosporina. Sin embargo, cuando al sexto día se destapó el matraz durante 5 minutos para recambiar el aire (ver flecha), la biosíntesis de CPC se dispara, lo cual indica que el aire en el espacio de cabeza del matraz no es suficiente para lograr la producción de CPC con *A. chrysogenum* en medio sólido. Además de que si fue posible conservar la predominancia de este microorganismo en el sistema de columna aireada y lograr la producción de CPC.

El comportamiento del pH y de la humedad fue similar en la columna y en el matraz, aunque en el caso de los matraces los cambios son más lentos. El pH en la columna sube rápidamente a un valor de 8.8 para el tercer día y luego se mantiene aproximadamente constante el resto del tiempo de estudio. En el caso de la humedad, se observa que disminuye el primer día en columna y en matraz hasta el segundo, luego en ambos casos aumenta un día y finalmente se mantiene aproximadamente constante.

Se realizó también un experimento con espuma de poliuretano como soporte de fermentación, utilizando condiciones como las del experimento en bagazo de caña. Debido a la pérdida de humedad observada en el laboratorio en experimentos anteriores con este sistema, el estudio se inició con una humedad de aproximadamente el 85%, además de que se decidió airear los matraces en campana de flujo laminar cada 24 h.

Al igual que lo observado en bagazo de caña, en poliuretano (Fig 6.4) el aumento en la producción CPC en columna se observa del primero al segundo día. Y un aumento similar se observa en el sistema en matraz del segundo al tercer día (es decir, siempre de forma más lenta), lo que nos indica nuevamente la importancia de la aireación en la producción de CPC.

Es necesario establecer una diferencia muy importante entre los dos soportes: en el caso del bagazo de caña, el nivel de producción se mantiene en el nivel alto aproximadamente

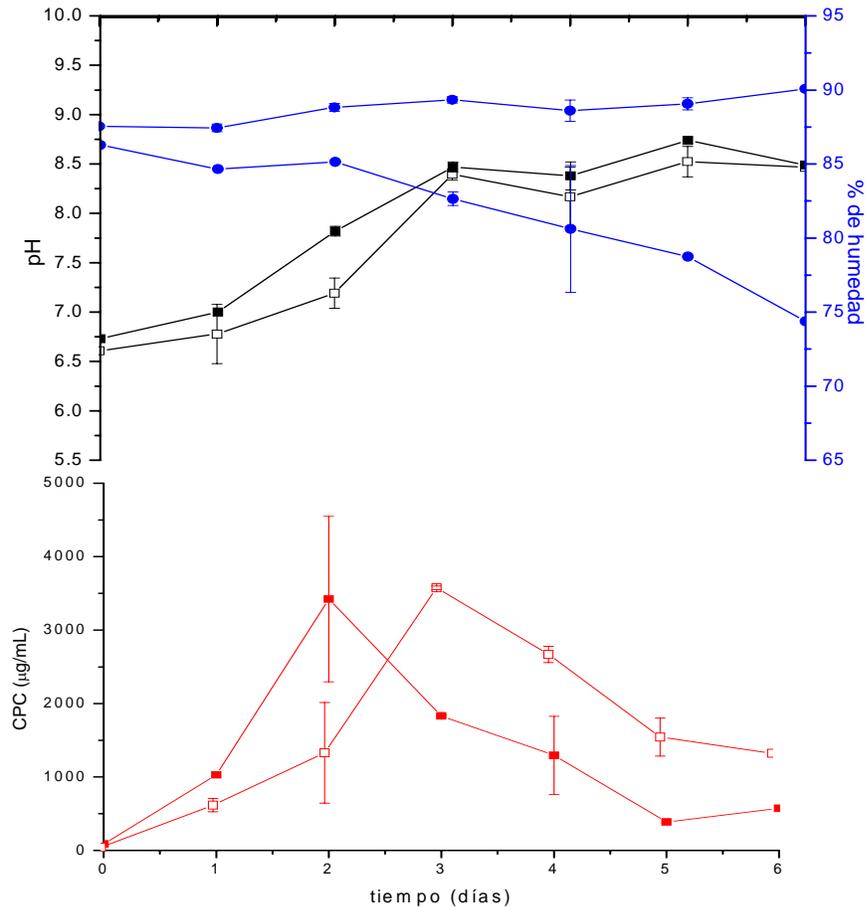


Fig 6.4 Cinéticas de cultivo de *A. chrysogenum* C10 en espuma de poliuretano utilizando dos sistemas: columna aireada (símbolos cerrados) y matraz con aireación periódica (símbolos abiertos) (—■—)CPC, (—■—) pH y (—●—) %de humedad.

constante durante tres días, mientras que en la espuma de poliuretano, la máxima producción solamente es observable durante uno de los días de cultivo, siendo en ambos casos mejores los resultados de la fermentación en columna.

Además, en espuma de poliuretano se observó que, al igual que en bagazo, el pH aumenta al inicio de la fermentación, llegando a un valor de 7.9 para el segundo día en las

columnas y de 8.4 en ambos sistemas para el tercer día. Después de esto el pH se mantiene aproximadamente constante el resto del cultivo.

La humedad, por su parte, mostró un ligero aumento en el sistema en matraz mientras que en la columna se observó una disminución de aproximadamente el 10% del contenido de humedad. Además, con ayuda de la coloración que el medio le confería al soporte se observaba mucha heterogeneidad de éste en el sistema aireado, aunado a un cierto grado de escurrimiento. Es por esta razón que se decidió realizar un nuevo experimento bajo condiciones similares de humedad en ambos soportes, poniendo especial atención a las variaciones en el pH, humedad y consumo de azúcares.

6.5 Producción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano

Se realizaron cultivos de *A. chrysogenum* en medio sólido, utilizando como soporte bagazo de caña y poliuretano. En ambos casos se establecieron las mismas condiciones para el cultivo con excepción de la humedad inicial que es del 70% para el bagazo y del 75% para el poliuretano. La razón de la diferencia radica en la distinta capacidad de retención de agua en cada uno de los soportes y en resultados observados en los experimentos preliminares.

En ambos casos se midieron los siguientes parámetros: pH, humedad, consumo de azúcares reductores y producción de CPC (Fig. 6.5).

Se observó una mayor producción de CPC en bagazo de caña que en poliuretano. La producción de CPC se realizó principalmente del primero al segundo día en ambos sistemas, llegando a niveles de producción relativamente elevados: 2973.6 ± 689.8 µg/gss en bagazo de caña, 1787.6 ± 106.9 µg/gss en la espuma de poliuretano. Es importante destacar que en el

sistema de bagazo de caña se mantuvo casi estable el nivel de producción de los días 2 al 4 mientras que en espuma de poliuretano se tuvo un descenso bastante drástico para el tercer día.

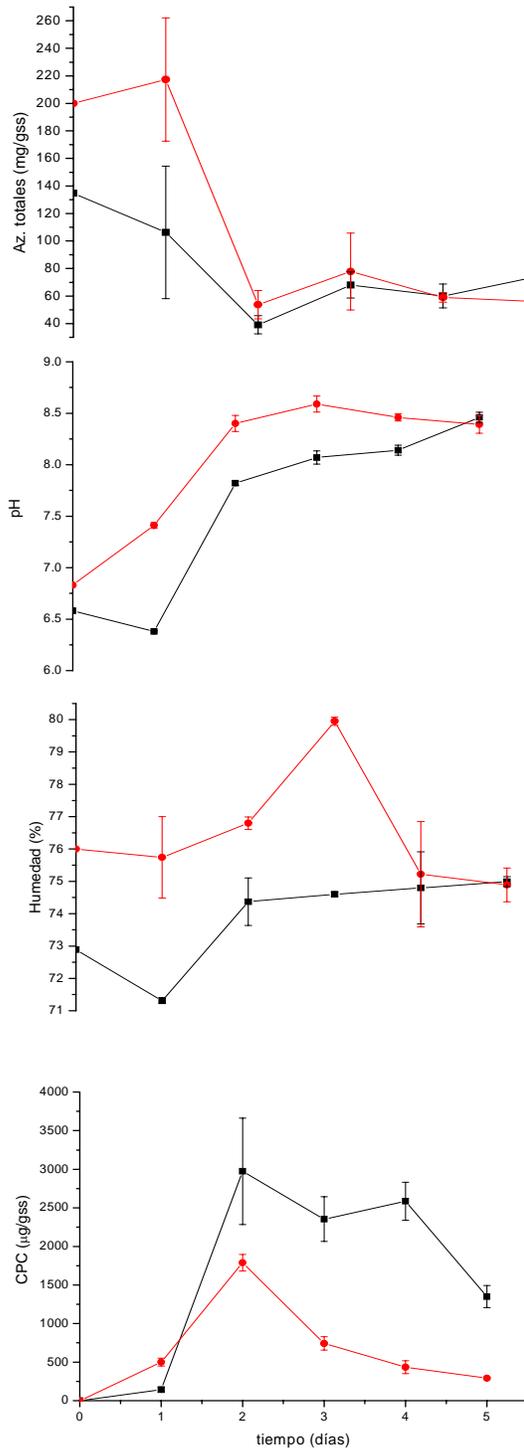


Fig 6.5 Cinética del cultivo de *A. chrysogenum* en (—■—) bagazo de caña y (—●—) espuma de poliuretano.

Se puede observar (Fig. 6.5) que en el principio de los cultivos (tiempo cero) la cantidad de azúcares totales detectada fue mayor en la espuma de poliuretano que en el bagazo de caña, esto se debe a la diferencia en los contenidos de humedad inicial, lo que hace variar la formulación del contenido de sólidos del medio del sistema por gramo de soporte seco (aumentando en la fermentación con mayor humedad).

En ambos sistemas el consumo de azúcares se realizó rápidamente hasta el segundo día, aunque es notable que la velocidad de consumo de azúcares fue más lenta en el bagazo de caña que en el poliuretano.

Tanto en el bagazo como en el poliuretano se detectó un aumento de la humedad a lo largo de la fermentación,

sin embargo en el bagazo de caña ésta se mantuvo aproximadamente constante del segundo al quinto día mientras que en el poliuretano cayó drásticamente para el cuarto y quinto día.

En los dos sistemas se observa que no hubo variación significativa en los azúcares totales presentes de los días dos al cinco, es decir que no hay un consumo significativo de estos durante esos días, llegando a valores finales de 73.88 ± 9.68 y 56.06 ± 21.33 mg de glucosa/gss para el bagazo de caña y el poliuretano respectivamente.

En la cinética de pH de la figura 6.5 se observa un aumento rápido de esta variable del primero al segundo día similar a la variación en el consumo de azúcares.

Un punto importante es que en ambos soportes se alcanzan valores de pH altos desde el segundo día, 7.84 para el bagazo de caña y 8.04 para la espuma de poliuretano.

Debido al mayor nivel de producción y estabilidad se seleccionó la FS en bagazo de caña para continuar los estudios.

6.6 Efecto del pH inicial en la producción de CPC

Se consideró que la biosíntesis de CPC cesó al segundo día en el experimento anterior, probablemente por el valor tan alto de pH en el medio. En los siguientes experimentos se estudió la estrategia de disminuir el pH inicial en el cultivo de *A. chrysogenum* en bagazo de caña, con el fin de llegar al segundo día con un pH más bajo y ver si esto alargaba la fase de producción.

En uno de los experimentos se iniciaron los cultivos con valores de pH de 5.85, 6.17 y 6.25, y en otro se iniciaron con valores de 5.47, 5.77 y 6.69. En la figura 6.6 se observan las cinéticas de pH, humedad, azúcares totales y producción de CPC de los experimentos mencionados.

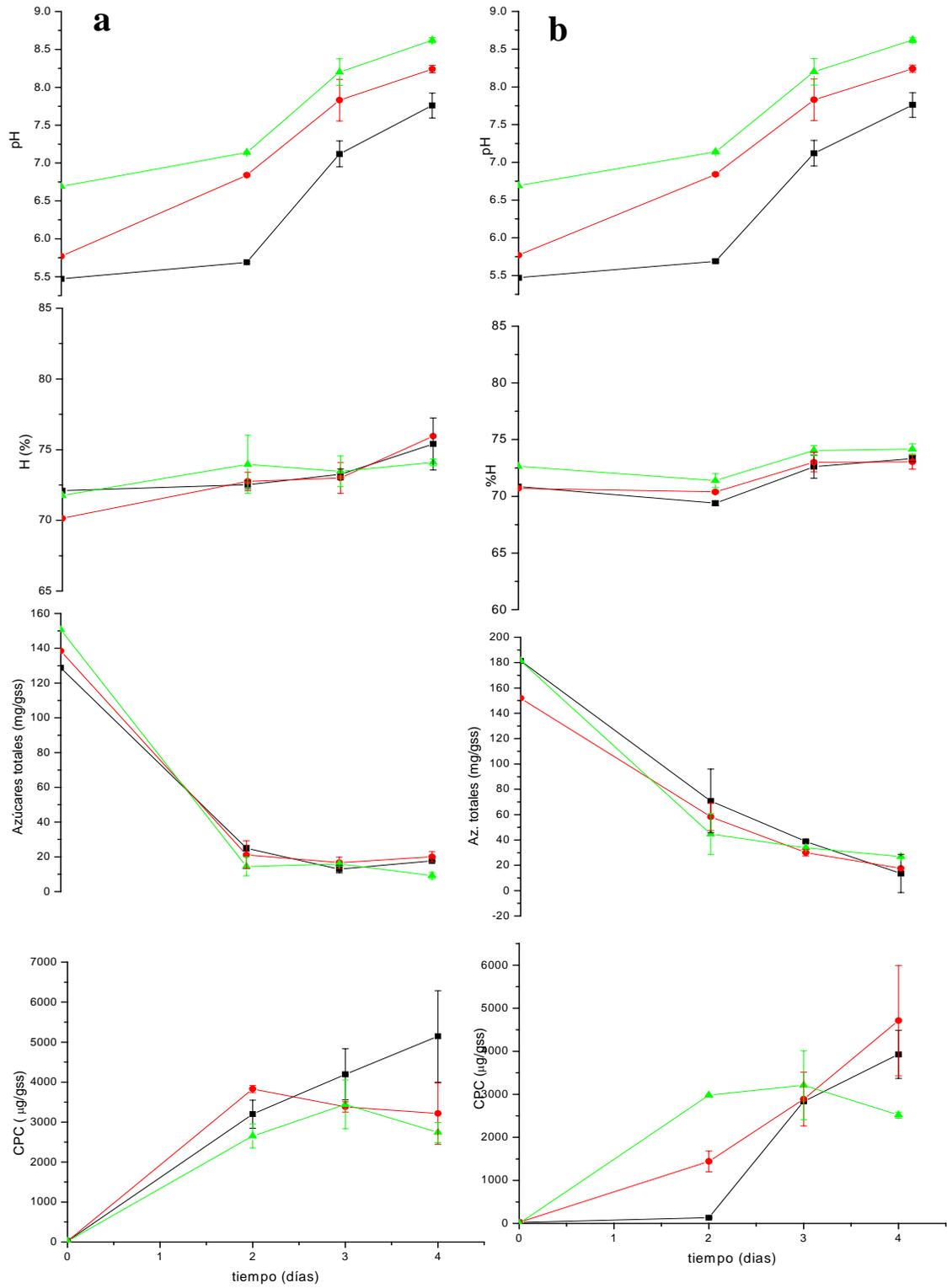


Fig 6.6 Efecto del pH inicial en la producción de CPC. a) Experimento que inicia a valores de pH de (—■—) 5.85, (—●—) 6.17, (—▲—) 6.25. b) Experimento que inicia a valores de pH de (—■—) 5.47, (—●—) 5.77 y (—▲—) 6.69

Es notable (figura 6.6a) que con el pH inicial de 5.85 se logró prolongar la producción hasta el cuarto día, llegando hasta un nivel un poco mayor a 5000 $\mu\text{g/gss}$ (tabla 6.3).

De la misma forma, en el otro experimento, en el cultivo que empieza con un pH de 5.77, se inició la producción desde el segundo día y se prolongó hasta el cuarto, alcanzándose nuevamente un alto nivel de producción (Tabla 6.3).

Se observa en la gráfica de producción de CPC de la figura 6.6a que tanto para el pH de 6.25 como el de 6.17, la producción de los días dos al cuatro fue similar a la observada en el experimento anterior en bagazo de caña: producción máxima en el segundo día que aproximadamente se mantiene hasta el cuarto día. Un comportamiento similar se observa en la figura 6.6b, cuando se inició el cultivo a un pH de 6.69.

Tabla 6.3 Producción y productividad en experimentos con diferentes valores de pH inicial y condiciones de pH observadas el día de producción máxima.

Condición (pH inicial)	Producción máxima (μg de CPC/gss)	Productividad (μg de CPC/gss/h)	Día de máxima producción	pH en el día de máxima producción.
5.47	3927 ± 559	40.9	4	7.8 ± 0.16
5.77	4711 ± 1281	49.1	4	8.2 ± 0.04
5.85	5143 ± 1146	53.57	4	8.0 ± 0.11
6.17	3828 ± 92	79.75	2	7.4 ± 0.06
6.25	3443 ± 608	47.8	3	8.0 ± 0.23
6.69	3210 ± 799	44.6	3	8.6 ± 0.03

También es interesante apreciar que con un pH inicial de 5.47 hubo un retraso en el inicio de la producción del segundo al tercer día aunque si se alcanzó un nivel de producción alto (que no presenta diferencias significativas con el alcanzado cuando el cultivo se inició a 5.77). Las otras variables del perfil de fermentación (pH, humedad y consumo de azúcares)

también indican muy baja actividad metabólica en los primeros 2 días, hasta que el pH subió a más de 5.6.

En general, se puede observar (Tabla 6.3) que la cantidad de CPC producida es mayor cuando el cultivo se inicia a valores de pH menores a 6 que cuando se inicia a valores de pH mayores a este valor. Por otro lado se observa que los valores de productividad son mayores cuando el cultivo se inicia entre valores de pH 5.77 y 6.17, sin embargo se conservan durante más tiempo al iniciar en 5.77 y 5.85.

En el perfil de pH del experimento correspondiente a la figura 6.6a. podemos ver que cuando se inició el cultivo a un pH mayor a 6, ya para el tercer día se obtuvieron valores de pH mayores a 7.9 mientras que cuando se inicia a valores menores a 6, no se alcanza dicho valor hasta el cuarto día. Estos resultados son confirmados por las observaciones resumidas en la figura 6.6b.

Tabla 6.4 Comparación del pH de inicio del cultivo con el observado en el momento de producción máxima de CPC.

Condición (pH inicial)	Primer día de alta producción	pH primer día de alta producción	Día de máxima producción	pH en el día de máxima producción.
5.47	3	7.12 ± 0.17	4	7.76 ± 0.16
5.77	2	6.84 ± 0.21	4	8.24 ± 0.04
5.85	2	7.2 ± 0.53	4	7.98 ± 0.11
6.17	2	7.35 ± 0.06	2	7.35 ± 0.06
6.25	2	7.61 ± 0.04	3	7.96 ± 0.23
6.69	2	7.14 ± 0.01	3	8.62 ± 0.03

En la tabla 6.4 se resume la relación observada entre la evolución del pH y la producción de CPC. Se puede decir que la producción alta de CPC pudo realizarse desde que el cultivo se encontraba en un pH cercano a 6.8 hasta un pH aproximado a 8.0.

Pese a las diferencias en los valores de pH en el inicio de la síntesis de CPC, los valores encontrados en los días de máxima producción fueron bastante similares en todos los casos con la única diferencia de que el día de esta producción máxima fue el cuarto para valores de inicio menores a 6, y el segundo o tercer día para valores de pH inicial mayores a 6

6.6.1 Efecto del pH inicial sobre el consumo de azúcares .

Los resultados de contenido de azúcares totales del experimento de la figura 6.6a indican que en los cultivos con pH inicial mayor a 6 los niveles de azúcares bajaron hasta el segundo día, manteniéndose aproximadamente constantes el resto del tiempo. Por otro lado, en el cultivo que inició en 5.85 todavía se apreció un ligero descenso de los azúcares del segundo al tercer día, llegando en las tres condiciones de dicho experimento a niveles un poco más bajos que en experimentos anteriores.

La cinética de azúcares totales del experimento de la figura 6.6b confirma lo anterior, ya que el cultivo que inició a 6.69, para el segundo día llegó a un nivel de azúcares totales menor que el de los cultivos iniciados a valores de pH más bajos. Estos niveles se mantuvieron durante los siguientes días, mientras que seguía descendiendo en los cultivos iniciados a 5.47 y 5.77.

Al estudiar la variación del pH inicial y la velocidad de consumo de azúcares, se detecta que existe cierta relación entre ellas, por lo que se hizo un calculo aproximado de la velocidad de consumo de azúcares en el período de consumo rápido. La tabla 6.5 muestra que ambos experimentos coinciden en cuanto a las diferencias observadas en las velocidades de consumo de azúcares para cada una de las condiciones de pH inicial. En condiciones de pH inicial mayor a 6 la velocidad de consumo fue muy alta hasta el segundo día, después del cual ya no se observó disminución en los azúcares presentes en el medio. Para los cultivos

iniciados a valores de pH menores a 6 la velocidad de consumo no fue muy alta y se mantuvo durante más tiempo.

Tabla 6.5 Velocidades de consumo de azúcares y tiempo de producción bajo diferentes condiciones de pH inicial.

Condición (pH inicial)	Velocidad de consumo de azúcares (mg de glucosa/gss/día)	Tiempo (días)
5.47	41.34	4
5.77	53.58	4
5.85	38.62	3
6.17	58.62	2
6.25	68.10	2
6.69	68.32	2

El comportamiento de la humedad en el experimento de la figura 6.6a. es de aumento desde los primeros días del cultivo, cuando se inició a valores de pH mayores a 6. Sin embargo, al iniciar a 5.85 la humedad no empezaba a aumentar hasta el tercer día. Por otro lado, los cambios en la humedad del experimento de la figura 6.6b indicaron que esta variable aumentó, en las tres condiciones, solamente del segundo al tercer día. Por estas razones, no se pudo obtener un patrón definido de comportamiento de la humedad en estos experimentos.

6.7 Efecto de diferentes amortiguadores en la producción de CPC

De acuerdo a los resultados del experimento anterior, amortiguar el pH permitiría un cierto control en la velocidad de consumo de azúcares, lo que a su vez se traduciría en un efecto de aumento en el nivel de la producción de CPC en los cultivos. Por esta razón se decidió realizar experimentos con diferentes sustancias amortiguadoras para evaluar su efecto en el pH del cultivo.

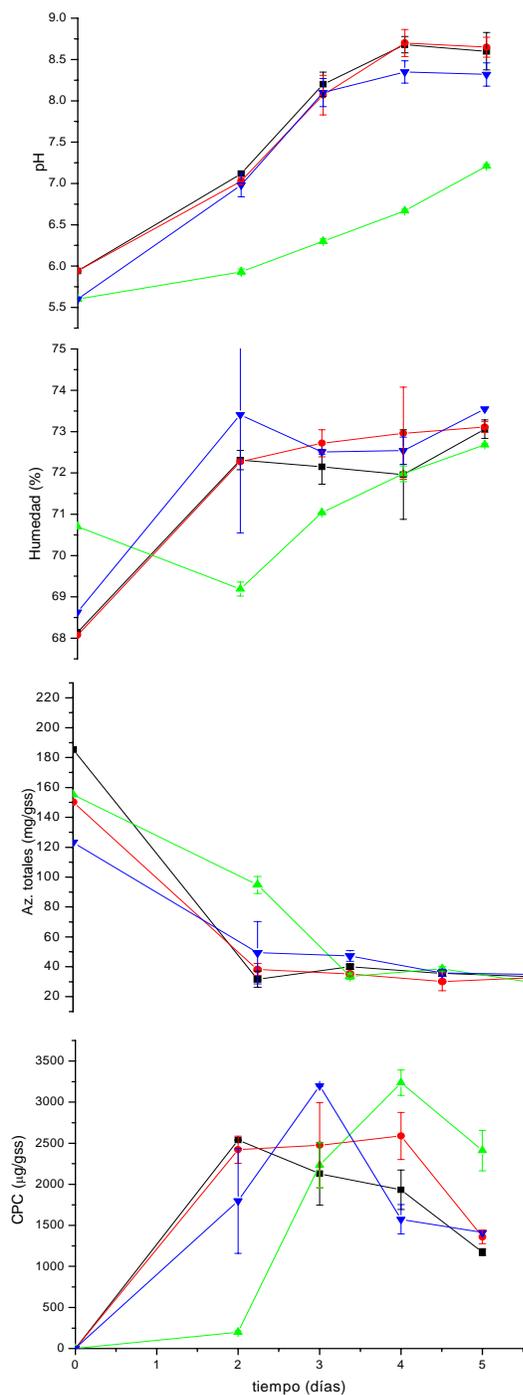


Fig 6.7 Evaluación de la capacidad amortiguadora de: (—■—) control, (—●—) amortiguador de fosfatos 0.015 M, (—▲—) amortiguador de fosfatos 0.075 M y (—▼—) sulfato de calcio (0.09M) en FS de *A. chrysogenum* C10.

Todos los experimentos se inician con valores de pH entre 5.5 y 6, independientemente de la sustancia estudiada para controlar el pH.

En un experimento preliminar se probó el efecto amortiguador de: mayor concentración de carbonato de calcio (2X) y amortiguador de fosfatos pH 6.4 (en concentraciones de 0.0015 M y 0.015 M).

Se observó (Fig. 6.7) que incrementando la concentración de carbonato de calcio, o con la concentración baja de amortiguador de fosfatos en el medio, el pH subía prácticamente de igual forma que en experimentos anteriores. En cambio sí se logró un ligero efecto amortiguador de esta variable cuando se utilizó el tampón de fosfatos 0.015 M.

Dada la ligera mayor capacidad amortiguadora observada con la concentración más alta de tampón de fosfatos, se realizó otro experimento donde se probó el efecto de este amortiguador en dos concentraciones (0.015 y 0.075 M), además del posible efecto del sulfato

de calcio (0.09M) en la regulación del pH de nuestro cultivo.

Los experimentos realizados con fosfato 0.015M y sulfato de calcio como amortiguadores del pH (Figura 6.7), no mostraron ninguna influencia significativa de estas sustancias sobre el comportamiento de esta variable (al menos hasta el tercer día), en comparación con las condiciones control, llegando a un valor mayor a 8 para este tiempo en las tres condiciones.

Cuando se utilizó el amortiguador de fosfatos 0.075 M se evidenció una mayor regulación del pH en el sistema, ya que ni siquiera el cuarto día se alcanza un pH mayor a 7.5.

En el caso del sulfato de calcio se observó regulación del pH pero a un valor muy alto, mayor a 8, lo cual podría ser limitante en futuras condiciones donde se buscara un mayor crecimiento.

En cuanto a la producción de CPC, durante este experimento se advierte que ésta empezó rápidamente en los cultivos cuyo pH aumentaba más rápidamente. En el caso del cultivo en el cual se utilizó amortiguador de fosfatos 0.075 M como amortiguador se observó que la producción empezó entre valores de pH de 5.9 y 6.3. Es necesario agregar que cuando se tiene el mejor control del pH del sistema se observa retraso en el inicio de la producción, similar a lo observado cuando se realizó el experimento con pH inicial de 5.47, iniciándose la producción del segundo al tercer día.

A pesar de que en todos los casos se iniciaron los cultivos a valores de pH menores a 6, la producción en el control y los sistemas menos amortiguados es bastante diferente a la observada en los experimentos en los que se probó el efecto del pH inicial, además es importante notar que en ningún caso se llega a los niveles de producción alcanzados en experimentos anteriores. Todas las irregularidades mencionadas en el párrafo anterior

posiblemente se debieron a los cambios observados en la cepa, los cuales se detallan en la sección 6.9.

Las cinéticas de humedad de los experimentos con sulfato de calcio, fosfato 0.015 M y control, indicaron un aumento rápido de esta variable los primeros día (similar al comportamiento del pH). Sin embargo cuando la regulación del pH fue mayor (como en el caso del fosfato 0.075 M), inicialmente la humedad disminuyó, para luego aumentar al alcanzarse un pH de 5.93 en el cultivo. Estos resultados confirman que a valores de pH menores a 6 la actividad metabólica es menor.

De forma parecida al comportamiento de la humedad y del pH, el consumo de azúcares fue más rápido los primeros días en los cultivos en los que el cambio de pH está menos controlado, mientras que se observó un consumo más lento cuando el cambio de pH estaba más controlado. Es decir que a valores de pH menores a 6 el consumo de azúcares se realiza más lentamente.

6.8 Evaluación de 2 niveles de nutrientes, con y sin amortiguador, en la producción de CPC.

Se consideran factores importantes en los procesos de fermentación sólida el contenido de nutrientes y el nivel de humedad.

Preliminarmente se realizó un experimento factorial (resultados no mostrados) en el que se estudiaron los efectos de 2 niveles de nutrientes (2X y 2.5X) y tres niveles de humedad (65, 70 y 75%) durante los días cuatro y cinco, en la producción de CPC; utilizando la composición del medio de cultivo de los experimentos anteriores sin amortiguador; en este experimento se observaron mejores niveles de producción al 65 y 70% de humedad que al

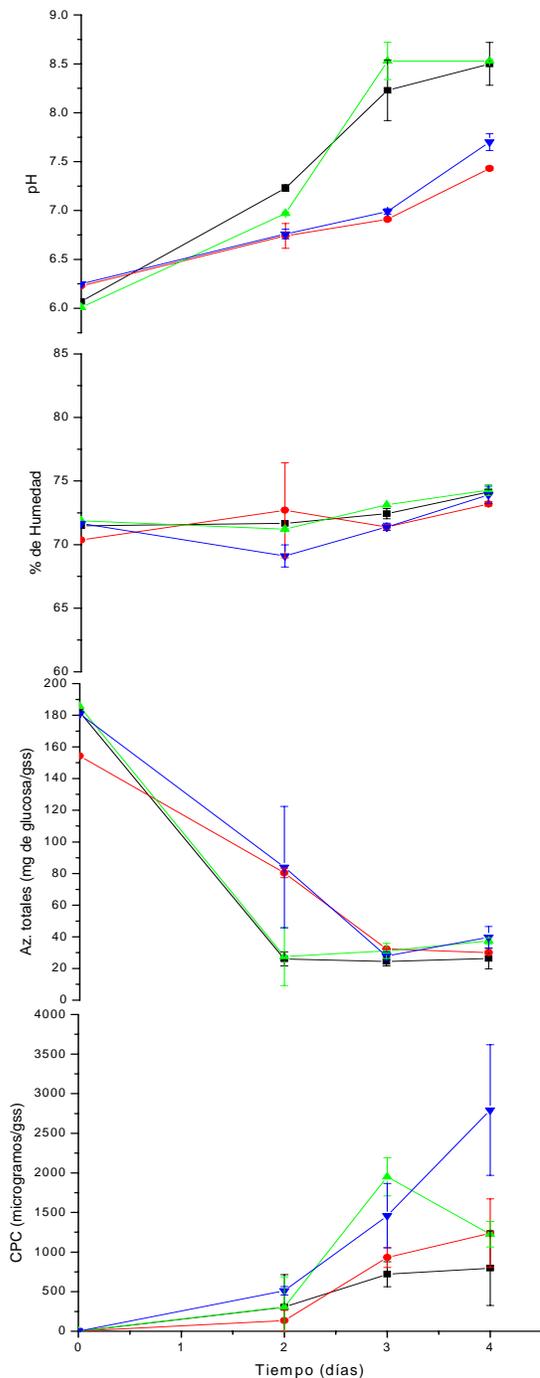


Fig 6.8 Cinética de cultivo de *A. chrysoygenum* C10 . Dos niveles de nutrientes y verificando el efecto del amortiguador de fosfatos para el control del pH. Condiciones: (—■—) 2X sin amortiguador (—●—) 2X con amortiguador, (—▲—) 2.5X sin amortiguador, (—▼—) 2.5X con amortiguador.

las condiciones amortiguadas.

75%, apreciándose en esta última condición, un escurrimiento considerable del medio de cultivo desde el soporte.

Posteriormente, se realizó un experimento en el cual se probaron solamente los dos niveles de nutrientes al 70% de humedad que fueron los que mostraron los mejores resultados en el experimento anterior. Además, se verificó el uso de un amortiguador comparando cinéticas con medio original y medio con buffer de fosfatos 0.075 M pH 6.4.

Se observa en la gráfica de producción de CPC de la figura 6.8, que tanto para los experimentos con una concentración de nutrientes 2X como 2.5X se obtuvieron valores de producción ligeramente mayores en los cultivos con tampón de fosfatos que en los de contenido correspondiente de nutrientes con la fórmula original del medio. Se destaca un velocidad de producción más paulatina en

En este experimento, siguiendo la cinética completa de los cultivos, se observó que en el caso de los medios con amortiguador, se obtuvo una mayor concentración de CPC en el medio 2.5X. En ambos casos, una mayor concentración de nutrientes dio lugar a una producción más rápida de CPC, pero también a un aumento más rápido en el pH desde el inicio de la síntesis de este producto (Tabla 6.6).

Estudiando los resultados de la figura 6.8, en especial la cinética de pH, se comprobó la eficiencia del tampón de fosfatos 0.075 M. pH 6.4 para amortiguar el cultivo. Es así que en el caso de las condiciones control, se alcanzó un valor mayor a 8 para el tercer día; en cambio en las condiciones con amortiguador de fosfatos se alcanzaron valores de 7.87 ± 0.03 en concentración 2X y 7.84 ± 0.09 en concentración 2.5X de nutrientes, es decir valores menores a 8.

Tabla 6.6 Valores de producción máximos observados en cada una de las condiciones del experimento de dos niveles de nutrientes y dos elementos de control de pH.

Condición	Producción máxima (μg de CPC/gss)	Día de máxima producción	pH en el día de máxima producción.	Azúcares totales en día de máxima producción (mg de glucosa/gss)
Normal (2X sin control de pH)	798.0 ± 471.7	4	8.5 ± 0.21	26.26 ± 6.45
Amortiguada (2X con control de pH)	1238.4 ± 431.7	4	7.43 ± 0.02	29.95 ± 0.84
Normal (2.5X sin control de pH)	1950.4 ± 241.6	3	8.53 ± 0.19	31.05 ± 4.72
Amortiguada (2.5X con control de pH)	2794.7 ± 823.9	4	7.7 ± 0.08	39.7 ± 6.74

En general, se observó mayor producción en las condiciones 2.5X que en las condiciones 2X, como se detalla en la tabla 6.6. Además se apreciaron valores de pH más altos en las condiciones no amortiguadas.

Examinando los resultados del contenido de azúcares totales, se observa claramente que en los cultivos con buffer de fosfatos el consumo de azúcares se realizó más lentamente del día 2 al 3 en comparación con los cultivos con carbonato de calcio. Sin embargo, en las 4 condiciones se llegó a niveles bastante similares de azúcares residuales de entre 26 y 38 mg de glucosa/gss. Se hizo un calculo aproximado de la velocidad de consumo de azúcares en el período de consumo rápido. La tabla 6.7 muestra que en los experimentos con amortiguador existe una mayor contención del consumo de azúcares. Esta limitación parece ser importante para alargar la fase de producción, pues al consumirse más lentamente los azúcares, duran más tiempo, logrando además que la producción rápida ser realice hasta un día después de que aparentemente se llega al nivel mínimo estacionario de azúcares.

Tabla 6.7 Velocidades de consumo de azúcares y tiempo de producción bajo diferentes condiciones de contenido de nutrientes y control de pH

Condición	Velocidad de consumo de azúcares (mg de glucosa/gss/día)	Tiempo (días)
Normal (2X sin control de pH)	77.93	2
Amortiguada (2X con control de pH)	40.66	3
Normal (2.5X sin control de pH)	79.03	2
Amortiguada (2.5X con control de pH)	51.02	3

En cuanto a los cambios en la humedad de este experimento, se observa que (Fig 6.8) esta variable se mantuvo aproximadamente constante hasta el segundo día, a partir del cual empezó a aumentar levemente.

Por otro lado, estos experimentos mostraron niveles de producción muchísimo más bajos que los alcanzados en experimentos de verificación del efecto del pH inicial, seguramente

debido a los cambios observados en la cepa. El deterioro de la cepa era tal que se realizó un proceso de purificación genética, descrito en la siguiente sección.

6.9 Purificación genética de la cepa *Acremonium chrysogenum* C10

En vista de los diferentes cambios percibidos en la cepa traída de la Universidad de León de España (llamada **cepa original** de aquí en adelante) durante el desarrollo del presente trabajo, especialmente en términos del nivel de producción máximo alcanzado, se procedió a realizar una purificación genética de ésta.

En este proceso también se incluyó la purificación genética de una cepa comercial (ATCC 48272 equivalente a cepa C10), la cual se intentó a utilizar al momento de empezar a detectar las anomalías de la cepa original. Sin embargo, no se logró la realización de ningún experimento exitoso con este microorganismo debido a que presentaba características desfavorables en comparación con las observadas para su homóloga, las cuales se describen en la tabla 5.8.

Los cambios detectados en la cepa original se explican detalladamente (Tabla 5.8), considerando tres experimentos en los que se notan las diferencias observadas más importantes.

Para realizar la purificación genética de la cepa se seleccionaron 45 colonias aisladas de la cepa comercial y 37 colonias aisladas de la cepa original.

Se realizó un ensayo en cilindros de agar como se indica en la sección 5.5.6 de este trabajo. Se interpolaron los valores de los halos de inhibición formados por los cilindros, con los obtenidos en la curva de calibración y se construyeron los histogramas de distribución de frecuencia que se muestran en la figura 6.9. Se observa que tanto de las colonias

seleccionadas de la cepa comercial como de la original, pocas mostraron un promedio de producción más alto que el resto.

Tabla 6.8 Características de *A. chrysogenum* C10 en diferentes etapas del estudio de producción de CPC en FS.

Experimento (Fecha)	Descripción (Séptimo día de incubación)	Produc - ción máx. de CPC en FS ($\mu\text{g/gss}$)	pH en produc- ción máx. en FS	pH en medio semilla al tomar inóculo	CPC en medio semilla ($\mu\text{g/mL}$)
Comparación de la producción de CPC en 2 soportes (Oct 2003-Enero 2004)	Morfología: Colonias blancas pequeñas planas, muy condensadas al centro y algunas con micelio de aspecto hialino a las orillas de la colonia	2973.6 ± 689.8	7.82	6.5	72.1
	Tamaño: 0.5 a 2 mm. de diámetro para 7° día de incubación (Figura 6.1a.), crecimiento lento, notable desde aprox. 3er. día. Concentración: abundantes: 200-400 ufc/caja de Petri	5142.9 ± 1145.8 con pH inicial: 5.85	± 0.02		
Efecto de nutrientes y humedad en la producción de CPC. (marzo 2004)	Morfología: Colonias blancas medianas cóncavas., de aspecto general hialino Tamaño: 1 a 4 mm de diámetro para el 7° día de incubación, crecimiento muy lento, notable desde aprox. 4° día. Concentración: Poco abundantes 50-70 ufc/caja de Petri.	2724.6 ± 654.45 (pH inicial 5.85)	7.96 ± 0.33	6.9	120.5
Comparación de cepas de <i>A. chrysogenum</i> C10 (original y comercial) (mayo de 2004)	Original Morfología: Colonias blancas medianas, cóncavas de aspecto general hialino. Tamaño: 1 a 6 mm de diámetro para 7° día de incubación, crecimiento muy lento, notable desde aproximadamente el quinto día, Concentración: Escasas 5-15 ufc/caja de Petri	1939.7 ± 424.36 (pH inicial 6 amort. de fosfatos y nutrientes 2.5X)	6.75 ± 0.064	6.16	16.6
	Comercial Morfología: Colonias blancas, al inicio del crecimiento son cóncavas y luego se rompen de su concavidad y son huecas, micelio no observable a simple vista. Tamaño: 0.5-2 mm de diámetro. Crecimiento lento observable desde 3er. día. Concentración: Abundantes 200-500 ufc/caja de Petri. No hay crecimiento significativo en medio semilla	No se detecta producción de CPC	No se detecta producción de CPC	6.0	31.9

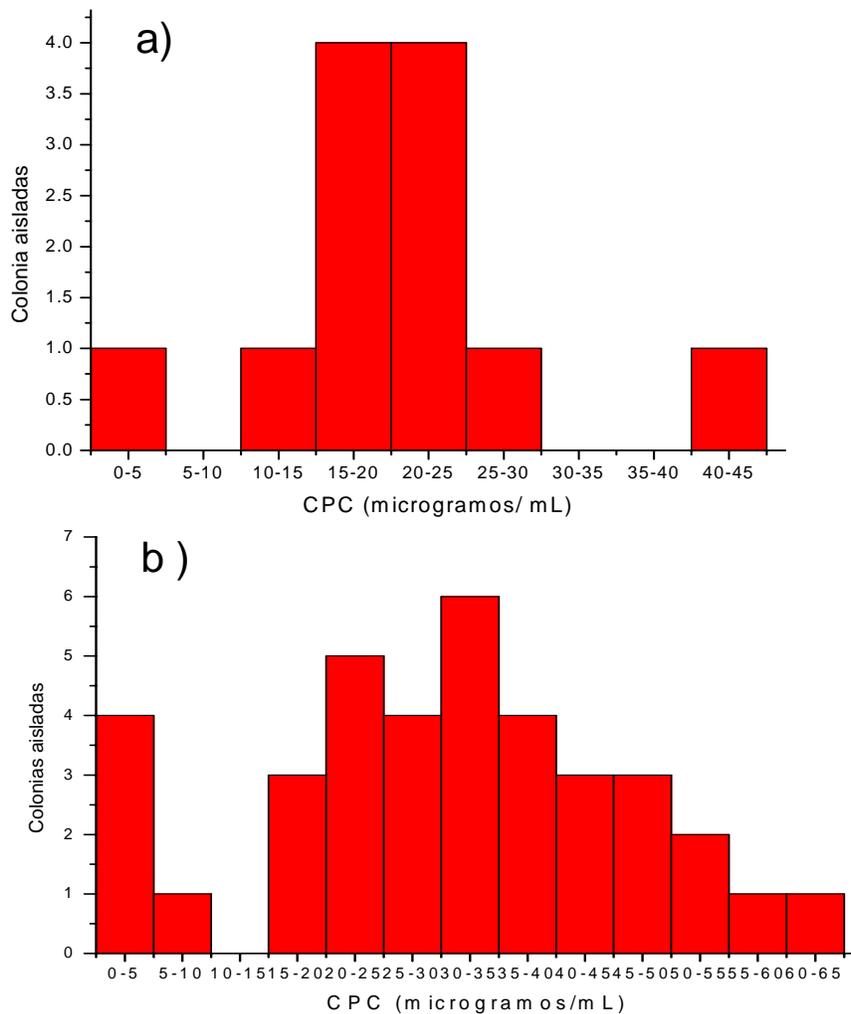


Fig 6.9 Histogramas de frecuencia de la producción de CPC de colonias analizadas para purificación de *A. chrysogenum* C10. a) cepa comercial y b) cepa original.

Se seleccionaron las 12 colonias con nivel de producción más alto y que además mostraron desviación estándar pequeña en sus repeticiones. Se codificaron las colonias como: N las procedentes de la cepa comercial y V las de la cepa original. Las colonias seleccionadas fueron: N7, N16, N28, N31, N41, V12, V15, V23, V24, V35, V36 y V37.

Se realizó nuevamente un bioensayo de cilindros de agar, para hacer una selección final. De ésta se obtendrían al menos dos cepas que tuvieran un buen nivel de producción, para ser ensayadas en una fermentación en medio sólido bajo las mejores condiciones ya determinadas mediante los experimentos descritos anteriormente.

Se presentan los resultados del último ensayo en cilindro de agar en la figura 6.10.

Solamente 2 cepas mostraron un nivel de producción de CPC superior, la N28 (25.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la V24 (44 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Se procedió a la realización de una fermentación sólida para verificar la efectividad del proceso de purificación genética, y sus resultados se presentan en la figura 6.11.

En esta cinética de producción (Fig 6.11) se puede observar la eficiencia del método de purificación, mediante el cual se obtuvo la cepa V24 que alcanzó un nivel de producción de $4581 \pm 292 \mu\text{g}$ de CPC/gss, aproximadamente 1.5 veces más que lo observado en el experimento anterior a la purificación. Por otro lado la cepa N28 solamente produjo $573 \pm 25 \mu\text{g}$ de CPC/gss; que, aunque es una producción baja contrasta favorablemente frente a la nula producción que se había conseguido con esta cepa (Tabla 5.8).

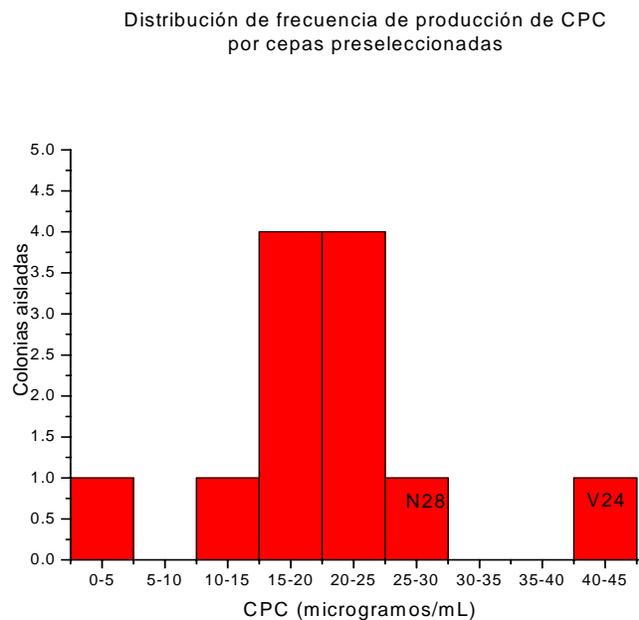


Fig 6.10 Histograma de frecuencias de la producción de CPC de colonias preseleccionadas en purificación de *A. chrysogenum* C10

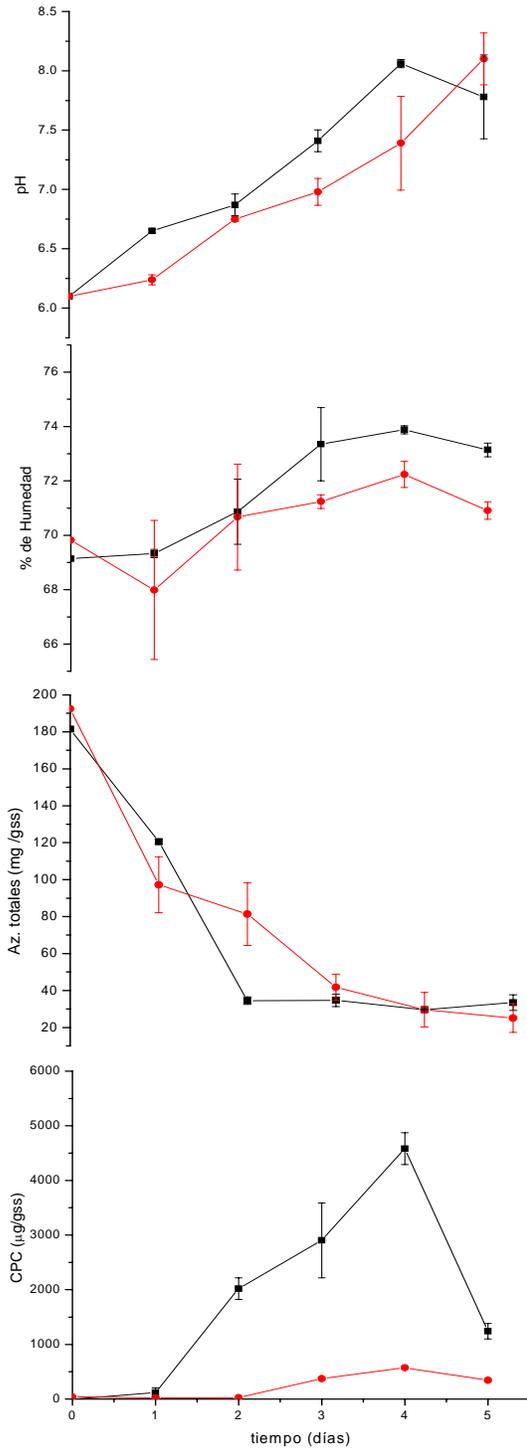


Fig 6.11 Cinéticas de cultivo de *A. chrysogenum* C10 utilizando dos cepas obtenidas del procedimiento de purificación genética : (—■—) V24 y (—●—) N28.

Estos resultados indican una producción muy baja de CPC de la cepa purificada obtenida a partir de la cepa comercial.

Los resultados de la medición de azúcares totales de la figura 6.11 muestran que aún se realizaba un consumo muy rápido de estos especialmente en el caso de la cepa de más alto nivel de producción (V24). Esta observación aunada a que también se muestra un aumento más rápido del pH, que llevó a un valor de pH de aproximadamente 6.9 en el segundo día, nos podría estar indicando cambios importantes en las características generales de la cepa original.

A pesar del aumento rápido de pH, todavía se detectó el efecto del amortiguador, dado que solamente para el cuarto día se llegó a un valor ligeramente

superior a 8.

En el caso de la cepa N28 se apreció un consumo más lento de azúcares, más acorde a lo esperado después de los experimentos con amortiguadores. Además de que los cambios en el pH de esta cepa fueron más lentos, sin embargo, ni estos resultados ni el consumo lento de azúcares dieron lugar a un nivel de producción de CPC mayor al observado en los experimentos de evaluación del pH inicial, seguramente debido al lento crecimiento de la cepa que se observa desde el medio semilla.

En la cinética de humedad de la figura 6.11 se observa que las dos cepas aproximadamente muestran un comportamiento similar a lo largo del cultivo. Sin embargo los niveles alcanzados sugieren un crecimiento más bajo de la cepa comercial que de la cepa original.

En cuanto a la morfología se puede decir que la cepa original recuperó las características de los primeros experimentos, mientras que no se puede considerar que la cepa comercial sea diferente morfológicamente después de la purificación genética.

6.10 Efecto de la temperatura en la producción de CPC y crecimiento de *A. chrysogenum*.

Durante la realización del proceso de purificación, la incubación del bioensayo se realizó a 30°C, observándose un crecimiento notable de todas las colonias estudiadas de *Acremonium chrysogenum* C10. Por ello se decidió realizar un experimento con temperaturas de 25°, 27.5° y 30°C, y así verificar el efecto de esta variable en el crecimiento del microorganismo. Se utilizó una de las cepas preseleccionadas en el procedimiento de purificación, con un medio a 2.5X de concentración de nutrientes y amortiguado con tampón de fosfatos 0.075M. pH 6.4.

Los resultados de este experimento se presentan en la figura 6.12. La producción de CPC en este experimento, al igual que el consumo de azúcares recuperó, el comportamiento observado en los primeros experimentos. Se observó que a 30°C la producción llegó a un nivel máximo al tercer día y luego descendió, posiblemente debido al pH alto alcanzado más rápidamente en esta condición; de manera similar a 27.5°C, la rapidez con que se realizó la síntesis de CPC disminuyó, de los días 2 al 4. Finalmente, a 25° se observa una producción bastante aceptable desde el día uno al dos, que siguió aumentando al menos hasta el día 4.

A pesar de que no se puede considerar que haya diferencias significativas entre las tres condiciones, ni que el nivel de producción alcanzado sea el óptimo, sí se apreció una mejora en la tendencia y el nivel de producción de los experimentos, posiblemente debido a la primera fase de purificación de la cepa.

Las mediciones de glucosamina (como estimaciones de biomasa) indican que para las condiciones de 25° y 27.5°C es posible que se tenga crecimiento en el primer día. En cambio, a 30°C se observa algo similar a una fase de adaptación en el primer día, para luego ver una tendencia indicativa de crecimiento del primero al segundo día. En las tres condiciones se observa que la glucosamina disminuyó los últimos tres días de estudio, es decir que no se puede decir que existiera crecimiento en esos días, en los cuales si se tuvo producción bajo las tres condiciones estudiadas.

Es necesario mencionar que en ninguno de los experimentos realizados, se observó un crecimiento evidente al microscopio de *A. chrysogenum*, y que aún los resultados de glucosamina se encuentran en niveles muy por abajo a los observados en cultivos de otros hongos estudiados en el laboratorio (*Aspergillus terreus* y *Amylomyces rouxii* por ejemplo).

En cuanto al contenido de humedad se observa que esta variable se mantiene aproximadamente constante a 25°C, mientras que muestra un ligero aumento en las condiciones de 27.5° y 30°C.

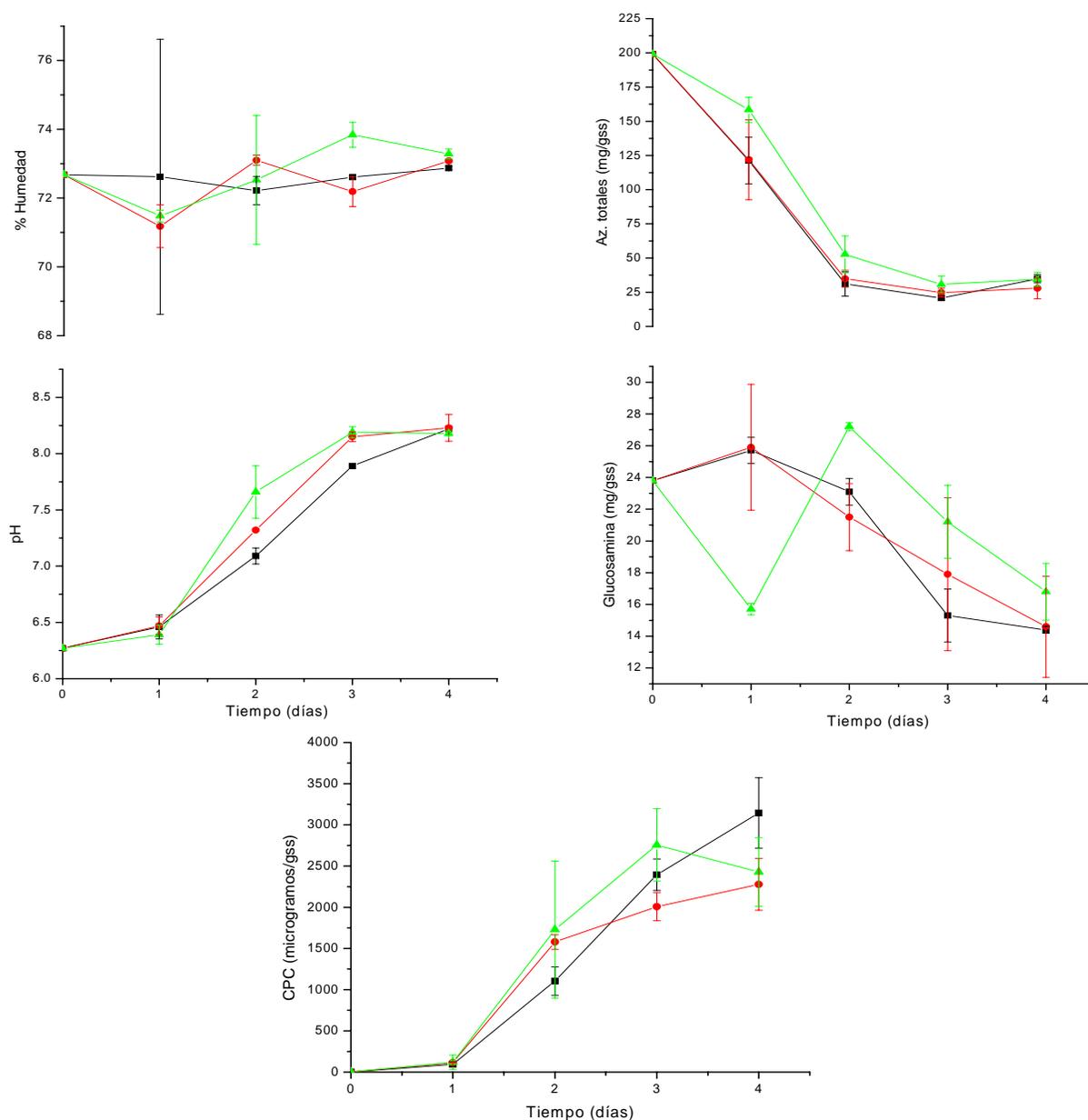


Fig 6.12 Cinéticas de cultivo de *A. chrysogenum* C10 verificando el efecto de la temperatura en el crecimiento y producción de CPC. Condiciones: (—■—) 25°, (—●—) 27.5° y (—▲—) 30°C.

En la cinética de pH se puede observar que los cambios son más rápidos en el cultivo a 30°C que en el que se realiza a 27.5°C. y en éste a su vez se eleva el pH más rápidamente que en el cultivo a 25°C. Para el tercer día tanto a 30° como a 27.5°C, ya se observan valores de pH mayores a 8. En cambio para el cultivo a 25° solamente se alcanza ese valor en el cuarto día.

La cinética de azúcares totales indica que no hay diferencias significativas en el consumo de azúcares en las tres condiciones, consumiéndose más rápidamente desde el día cero hasta el día 2, luego más lentamente hasta el día tres para mantenerse después aproximadamente estable. No obstante, se observa un consumo ligeramente menor del día cero al tercer día en la condición a 30°C .

7. Discusión

7.1 Extracción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano

Para establecer un método de extracción de CPC del cultivo sólido con una alta eficiencia de extracción (% de recuperación) se estudiaron tres solventes en el caso del bagazo de caña. Se eligió el método de extracción con amortiguador de fosfatos pH 5.5 debido a que presentó la más alta eficiencia de recuperación ($82.39\% \pm 9.90\%$), además de que es el método que utiliza menor cantidad de solvente de extracción (lo que permitiría la detección de cantidades pequeñas de producto).

Para la espuma de poliuretano se eligió el método de extracción con agua ($101.22\% \pm 6.99\%$) por presentar una menor desviación estándar y un mayor promedio de recuperación que los métodos por expresión ($98.37\% \pm 7.01\%$) y con tampón pH 5.5 ($96.56\% \pm 14.54\%$). Sin embargo, en términos prácticos se observó que el volumen de solvente utilizado con agua es muy grande, por lo que finalmente se utiliza el método por expresión para la extracción de CPC.

7.2 Estudios de esporulación de *Acremonium chrysogenum* C10

La cepa de *Acremonium chrysogenum* C10 proporcionada por el Dr. Juan Francisco Marín traída de la Universidad de León de España (cepa original), presenta en términos de la forma del de micelio las características propias de la cepa tal y como se describe en la bibliografía (Peberdy, 1987). Sin embargo, no se logró distinguir ningún tipo de esporulación de la cepa, aún cambiando los diferentes medios de cultivo y bajo las condiciones indicadas para su esporulación en medio LPE (Gutiérrez, 1994) ni en agar almidón (Adinarayana y *col.*,

2003), ni bajo condiciones similares a las de esporulación de *Penicillium chrysogenum* (Castillo, 1992).

Por lo tanto se decidió utilizar micelio como inóculo para la fermentación en medio sólido.

7.3 Cinética de crecimiento de *Acremonium chrysogenum* C10 en medio semilla

Debido a que se eligió el inóculo en forma de micelio para la fermentación en medio sólido es importante conocer el comportamiento del microorganismo en el medio semilla líquido, por lo que se realizó el estudio cinético en MSMA. Se eligieron las 38 h como el tiempo más adecuado para tomar el inóculo de este medio para la fermentación sólida debido a que en ese momento se observa crecimiento rápido del hongo y la producción de CPC observada aún no es muy alta ni muy rápida.

Respecto a la producción de CPC observada en medio semilla (a pesar de la presencia de una concentración de glucosa relativamente alta), podría ser explicada si nos referimos a un estudio publicado por Jekosch y Kück en 2000 donde concluyen que el mejoramiento en la producción de CPC de las cepas de *A. chrysogenum* está correlacionado con una reducida respuesta de la expresión del gen *pcbC* a la glucosa.

Por otro lado, también existen reportes (Shen y col., 1986) acerca de reducción de la actividad de la Isopenicilina N sintasa en una cepa tipo silvestre en presencia de glucosa, mientras que no se detecta ningún cambio en la actividad de dicha enzima en la cepa C10 considerada altamente productora.

7.4 Experimentos preliminares de FS de *A. chrysogenum*: efecto de la aireación.

A diferencia de los resultados reportados en los antecedentes de FS de *A. chrysogenum* para la producción de cefalosporina (Wang y *col.*, 1984; Jermini y Demain, 1989; Adinarayana y *col.*, 2003), por primera vez se tiene una producción relativamente alta de CPC en el segundo día de cultivo, es decir una producción rápida de esta sustancia en sistema de columna aireada.

Debido a la contaminación observada en experimentos previos se planteó la posibilidad de estudiar el cultivo en un sistema en matraz cerrado, pensando que el aire en el espacio de cabeza del matraz podría ser suficiente para el desarrollo de todos los procesos en el cultivo. Sin embargo los resultados indicaron que la mencionada suposición no era correcta, mostrando además que en matraces aireados periódicamente la biosíntesis de CPC se retrasaba un día en comparación con el sistema de columnas aireadas. Esta influencia de la aireación parece no ser privativa del medio sólido ya que en estudios en medio líquido se ha determinado que la influencia de la disponibilidad de oxígeno es importante para lograr niveles altos de producción de antibióticos β -lactámicos (Hilgendorf y *col.*, 1987; y Swartz , 1985). Además es necesario mencionar que es posible que bajos niveles de oxígeno afecten directamente a la ruta biosintética de la CPC, la cual incluye tres reacciones de oxidación (DeModena y *col.*, 1993).

Se consideró que en espuma de poliuretano se tuvo una pérdida importante de medio debido al escurrimiento por el excesivo contenido de humedad establecido para el experimento, que con seguridad afectó el contenido de nutrientes disponibles. Además, al observar un mejor comportamiento de producción en el sistema de columnas aireadas se

propuso realizar el estudio de los cultivos en ambos soportes bajo condiciones similares de humedad, poniendo especial atención a la evolución del pH, que había alcanzado valores altos en ambos sistemas, y a los azúcares disponibles.

7.5 Producción de CPC en bagazo de caña y espuma de poliuretano

En ambos sistemas, bagazo de caña y poliuretano, se observa una producción relativamente alta por esta cepa para el segundo día, siendo de 2973.6 ± 689.8 $\mu\text{g/gss}$ en el bagazo de caña y de 1787.6 ± 106.9 $\mu\text{g/gss}$ en el poliuretano. Además, analizando los intervalos de confianza de los valores máximos de producción en ambos sistemas se tiene que el de bagazo de caña además de ser significativamente mayor se observa más estable (no disminuye al tercer día) por lo que se decide seguir realizando los estudios posteriores en este soporte.

Llama la atención la alta tasa de producción, que permite alcanzar altas concentraciones de CPC en 2 días. Sin embargo, la producción no continúa después del segundo día.

Al plantearse la pregunta de cuál será la razón por la que la producción no continúa después del segundo día, y observar los resultados, llama la atención el pH sumamente alto que alcanzan los sistemas (siendo mayor de 8 para el poliuretano en el segundo día, y para el bagazo también pero hasta para el cuarto día). Estas observaciones pueden explicarse mediante el análisis del medio de cultivo utilizado, el cual además de tener una relación carbono nitrógeno muy baja (ver anexos 4 y 5); contiene extracto de carne como fuente de

nitrógeno, que al ser consumido libera grupos amino al medio volviéndolo altamente alcalino (Moat y Foster, 1995).

Además de interferir con la producción, es posible que el alto pH esté contribuyendo con la degradación de la CPC, ya que la inestabilidad del anillo β -lactámico en condiciones básicas acoplada a la presencia de otros sitios reactivos en esta sustancia, ha sido reportada por Peberdy (1987), resultando en la completa degradación de la molécula a pH alto.

Observando el perfil de la fermentación, debe destacarse el alto valor de pH en ambos sistemas a partir del segundo día (7.8 en bagazo de caña y 8.0 en espuma de poliuretano).

La hipótesis que se formuló en este punto fue que el pH alto estaba afectando la producción desde el segundo día, por lo tanto se planearon experimentos que iniciasen a diferentes valores de pH inicial, más bajos, para ver su efecto sobre la producción de CPC.

7.6 Efecto del pH inicial en la producción de CPC

Estudiando el efecto del pH inicial en la producción de CPC, los resultados indicaron que con un pH inicial de 5.85 la biosíntesis del antibiótico continuó después del segundo día. En ese contexto, en el segundo día de cultivo el valor de pH fue de 7.2, mientras que en las otras condiciones simultáneas (pH 6.17 y 6.25) se obtuvieron valores promedio de pH mayores a 7.3. De esta forma en el cultivo iniciado a pH menor a 6, no se llegó a alcanzar (ni siquiera para el cuarto día) un pH mayor a 8; mientras que en los otros dos cultivos se obtuvieron valores de pH cercanos a 8 desde el tercer día. En otro experimento, además de confirmarse estos resultados, se detectó que iniciando a un pH menor (5.5) ocurre un retraso

de un día en el inicio de la producción (en el segundo día apenas se alcanza un pH de 5.7), lo que explica la inhibición del crecimiento y de la producción a valores bajos de pH.

En los experimentos realizados a valores de pH menores a 6 se observa, además, disminución en la velocidad de consumo de azúcares, indicando que existe limitación del consumo de azúcares en valores bajos de pH, y posiblemente una relación entre el consumo y la producción de CPC en FS.

Los resultados indican que existe un intervalo de valores de pH dentro del cual la producción de CPC es favorecida, lo cual concuerda con los de estudios del regulador de la transcripción PACC realizados en una cepa silvestre y en una semiproductora de *Acremonium chrysogenum*, los cuales mostraron que la transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis de CPC está regulada en respuesta al pH del ambiente. En dicho trabajo se observó que dos cepas distintas respondían de manera diferente frente a diversos valores de pH ambiental: mientras que una cepa silvestre expresaba los más altos niveles de transcripción a pH alcalino, una cepa semiproductora presentaba niveles altos de transcripción aún a pH ácido (Schmitt y col., 2001)

En la presente tesis se demostró que existe un intervalo de pH dentro del cual se favorece la continuidad de la producción de CPC bajo las condiciones propuestas para este estudio. Dicho intervalo se encuentra aproximadamente dentro de valores de 6.4 a 7.8. También se comprobó que iniciando el cultivo con un pH de alrededor de 5.8 se logra que éste se mantenga dentro del intervalo de valores de pH deseados.

Un pH menor afecta el crecimiento y la producción, y se pensó que condiciones que incrementaran la biomasa en FS sacarían de rango el pH del cultivo, aún iniciando a valores bajos de esta variable. Por lo anterior, se consideró que el uso de amortiguadores nos ofrecía la

posibilidad de regular el pH del cultivo, lo cual podría beneficiar el comportamiento de la producción.

7.7 Efecto de diferentes amortiguadores en la producción de CPC.

A causa de los resultados observados en los experimentos de evaluación del pH inicial, se consideró conveniente realizar los experimentos con amortiguadores, iniciando a valores de pH de alrededor de 5.8.

Se encontró que una concentración doble de carbonato de calcio no ejerce ningún efecto amortiguador, debido a que es posible que su función sea más bien la de amortiguar la acidez que puede ser causada por la melaza de caña y los sólidos de maceración de maíz (ver anexo 4).

Se utilizó buffer de fosfatos que debido a una de sus constantes de ionización ($K_{ion} = 6.2 \times 10^{-8}$) puede ofrecer una capacidad amortiguadora de valores de pH alrededor a 7 (Benson, 1996).

Se formuló el medio de cultivo de tal forma que contuviera las sales del amortiguador en proporciones adecuadas para obtener un pH de 6.4 en solución, debido a que éste es el valor más bajo donde se observó una buena producción de CPC (Sección 5.6). Se usaron dos concentraciones bajas de amortiguador de fosfatos debido, a los reportes encontrados acerca del papel del fosfato como regulador negativo en la producción de CPC por una cepa silvestre de *A. chrysogenum* (Küenzi, 1980). En dicha observación, el fosfato incrementaba la velocidad de consumo de glucosa, incrementando la represión catabólica. Además, en experimentos con células en reposo de este microorganismo en ausencia de glucosa, el fosfato mismo disminuía el flujo completo para la formación de CPC (Martín y *col.*, 1982).

Los resultados obtenidos no indicaron represión de la síntesis de CPC en ninguna de las condiciones estudiadas, al realizar una producción rápida y de niveles similares en todos los casos del primero al segundo día. Si existe, por el contrario una ligera regulación del pH en la concentración 0.015M de este tampón.

Debido a la ligera regulación del pH observada por el amortiguador de fosfatos 0.015 M se decide incluir, en un nuevo experimento, una concentración más alta de este; también se incluye el estudio del efecto del sulfato de calcio que debido a su valor de constante de ionización ($K_{i\text{ón}} = 1.2 \times 10^{-2}$) podría amortiguar como una base débil (Benson, 1996).

El amortiguador de fosfatos 0.075 M ejerció definitivamente una mejor regulación de la variación del pH en el sistema, que simultáneamente se reflejó en una disminución en la velocidad de consumo de azúcares, llegando apenas a un pH de 7.21 en el quinto día de cultivo. Lo anterior confirmó la relación existente entre el pH y la velocidad de consumo de azúcares en la FS.

Adicionalmente se observó que a pesar de que existió retraso en el inicio de la producción en el experimento con el pH más regulado, este posiblemente se debió al bajo pH en el que se inicia el cultivo (pH = 5.6), y a pesar de esto sí se observó aumento en la producción de CPC durante al menos dos días. El menor nivel de producción alcanzado y el descenso de la CPC en el quinto día son difíciles de explicar, pero podrían deberse a los cambios negativos que empezaba a mostrar la cepa (Sección 6.10), o a variaciones pequeñas en el tamaño de inóculo que pudieran resultar significativas durante el desarrollo de la FS.

A pesar de que inicialmente no hubo regulación del pH en el cultivo utilizando sulfato de calcio como amortiguador, se tuvo un buen nivel de producción, el cual se realizó muy rápidamente aún iniciando a un valor muy bajo de pH (5.6). Este dato indica el nulo efecto

como amortiguador por parte del sulfato de calcio. Para el cuarto día ya la producción había descendido significativamente, aún cuando ya se pudo observar un efecto regulador del sulfato sobre el pH del medio (días 3-5).

Considerando que se tenía como uno de los objetivos de estudio el efecto de la concentración nutrientes en el sistema, y al observarse en otros experimentos que algunas modificaciones en esta variable ocasionaban aumento del pH, se decidió que era conveniente continuar los estudios con el uso de buffer de fosfatos 0.075 M como el amortiguador más adecuado para el sistema.

7.8 Evaluación de 2 niveles de nutrientes, con y sin amortiguador, en la producción de CPC.

Para evaluar el efecto de diferentes niveles de nutrientes y humedad en la producción de CPC se estableció un experimento preliminar de diseño factorial en el cual se utilizó el medio de cultivo sin amortiguador en solamente 2 días de estudio, lo cual no permitió que se tuviera una panorámica general de la cinética de todas las condiciones estudiadas.

El experimento preliminar reveló mejores niveles de producción con 65 y 70% de humedad (1850-2724 μg de CPC/gss) que al 75% (427 μg de CPC/gss) posiblemente debido tanto a problemas de escurrimiento del medio de cultivo desde el soporte, en esta última condición, como a problemas de difusión de oxígeno; que como se mencionó la sección 7.4 es un elemento influyente en la producción de antibióticos β -lactámicos.

Los valores de pH alcanzados con el nivel de 2.5X de nutrientes fueron muy altos, lo que sugiere la posibilidad de que estos se hayan dado por un acelerado metabolismo (debido al

alto contenido de nutrientes y humedad), de tal manera que no estuvieran permitiendo mejores niveles de producción.

Si se considera que a mayor humedad hay mayor actividad de agua en el medio, estos resultados pueden relacionarse con lo observado en otros estudios de FS (Oriol y *col.*, 1988), en los que se indica que la reducción en la actividad del agua tiene un marcado efecto en el crecimiento microbiano, disminuyendo la velocidad de crecimiento específica. En el caso de nuestros resultados podría también inferirse que la mayor actividad de agua, que se dio en los casos de mayor contenido de nutrientes y humedad, contribuyó a un aumento de la actividad metabólica.

Otros estudios de FS realizados en nuestro laboratorio (Barrios González y *col.*, 1997) indicaban que bajo una condición que generara un consumo lento de los nutrientes en el sistema, se obtendría mejores condiciones metabólicas (valores adecuados de μ durante la idiofase) para la producción de antibióticos (Pirt y Righelato, 1967). Para nuestro estudio se podría considerar al pH como esa condición que controla la forma en que se consumen los nutrientes en el sistema.

Es así que a través de los resultados de este experimento se confirmó la importancia del control del pH en la síntesis de CPC en FS, por lo que se decidió darle continuidad a los experimentos con amortiguadores.

El efecto de la concentración del medio, en el experimento preliminar, estaba enmascarado por los cambios de pH. Con el uso de medio amortiguado, se pudo demostrar que, con un contenido mayor de nutrientes (2.5X) se obtiene una mayor producción de CPC.

Amortiguar el pH por debajo de 8 permitió alargar la fase de producción hasta el cuarto día. Además, la ampliación de los días de estudio en este experimento, en comparación con el experimento factorial de nutrientes y humedad, permite mostrar que sí había una mayor producción en los sistemas con mayor contenido de nutrientes y sin amortiguador de fosfatos, sin embargo ésta aumentó rápidamente hasta el tercer día y descendió también precipitadamente para el cuarto día de cultivo. Estos resultados se debieron posiblemente a la contribución del mayor contenido de nutrientes a una mayor actividad metabólica, llevando rápidamente el sistema a altos valores de pH, que no permitían la continuidad de la síntesis de CPC durante más tiempo.

La suposición anterior se confirmó cuando se apreció que en los dos niveles de nutrientes estudiados, la producción de CPC siempre fue, aunque ligeramente, mayor en los sistemas en los cuales había un mejor control de pH ejercido por el amortiguador de fosfatos 0.075M.

El efecto del amortiguador se notó en la cinética de pH, donde se pudo ver que los cambios en esta variable fueron más lentos en los sistemas correspondientes.

En la cinética de consumo de azúcares se evidenció claramente la disminución en la velocidad de consumo de los azúcares en los sistemas amortiguados. Este comportamiento constituyó una evidencia de la importancia del control de la velocidad en la que se consumieron los nutrientes en FS, para mejorar la producción de CPC. No se sabe si el pH influye directamente sobre el consumo de azúcares (disponibilidad del sustrato a ese pH, cambios en la permeabilidad de las membranas) o si afecta el crecimiento y por lo tanto es indirecto.

Al parecer el consumo de sustrato es extremadamente rápido en FS por lo que es necesario tener sistemas de contención como el descrito para penicilina, que indica el uso de medios con baja proporción de bagazo (Domínguez y *col.*, 2000), lo cual restringe y dosifica los nutrientes. Esto da lugar a una idiofase larga y con mayor velocidad de producción. El pH es otro sistema de contención del consumo de nutrientes y probablemente las melazas no sean la mejor fuente de carbono para este sistema, debido a su rápida utilización.

Sin embargo, verificando los valores máximos de producción de CPC, se encontraron muy por debajo de los valores observados (aprox. 60% menos) aún en los experimentos preliminares donde no se habían realizado las mejoras en cuanto a las condiciones de pH y nutrientes. Esta disminución podía deberse a los cambios en las características de la cepa utilizada, por lo que se decidió ejecutar un procedimiento de purificación genética.

7.9 Purificación genética de la cepa de *Acremonium chrysogenum* C10

Los cambios de morfología y crecimiento en todos los medios utilizados, evolución del pH en los medios de estudio y niveles de producción de la cepa indicaban que se estaba degenerando. Es decir que la población de células con las que contábamos estaba adquiriendo una heterogeneidad tal que la mayoría de ellas ya habían perdido diferentes capacidades importantes para nuestros propósitos (entre las que se encontraba la de producir niveles altos de CPC). Por ello se diseñó un método de purificación genética de la cepa con el objeto de obtener una población homogénea con las características originales de la cepa.

El método de cultivo en cilindro de agar demostró ser efectivo para purificar genéticamente la cepa, es decir, fue una herramienta útil para seleccionar de entre las

poblaciones de *A. chrysogenum* disponibles, individuos que contaban con las características deseables.

Por este método se logró un mayor nivel promedio de producción entre las colonias elegidas de la cepa original que las de la cepa comercial, desde el bioensayo en cilindro de agar, indicando deficiencias de origen en la segunda cepa. Además de las diferencias en el bioensayo, también las hubo en el nivel de producción en FS, pero en este caso posiblemente debido también a la deficiencia observada en el crecimiento en medio semilla, siendo mejor el crecimiento desarrollado por la cepa original que por la comercial.

La eficiencia del método de purificación permitió seleccionar una cepa que al menos supera en un 50% la producción de CPC, en comparación con lo observado bajo las mismas condiciones en el experimento previo a la purificación.

A pesar de todo, el nivel de producto alcanzado aún es muy bajo en comparación con experimentos anteriores, además de que la variación del pH se mostró muy acelerada. Estas observaciones muestran la importancia de considerar el hecho de que no se haya detectado la formación de esporas por el microorganismo en estudio y se haya utilizado una suspensión de fragmentos de micelio en este proceso, lo cual podría estar implicando una desventaja que no permite una mejor eficacia del proceso de purificación. La degeneración de la cepa está relacionada con la inestabilidad genética de los núcleos presentes en el micelio, dentro de los cuales posiblemente existían algunos que podían generar una alta producción de CPC y otros baja, siendo estos últimos los que posiblemente iban aumentando en la población.

Existen antecedentes de disminución drástica de los niveles de producción en esta cepa (Vialta y *col.*, 1997), mencionándose la posibilidad de que eventos genéticos, como la translocación de cromosomas, sean los responsables de esta disminución.

7.10 Efecto de la temperatura en la producción de CPC y crecimiento de *A. chrysogenum*.

Los resultados de este experimento ilustran satisfactoriamente la efectividad de la primera fase del proceso de purificación, observándose en el caso de la condición a 25°C una síntesis paulatina de CPC del segundo al cuarto día, con un nivel de aproximadamente un 40% mayor al observado en experimentos anteriores a la purificación (casi como se observaba en experimentos de evaluación del efecto del pH inicial).

No se observan diferencias significativas en cuanto a los valores máximos de producción de CPC en las 3 temperaturas estudiadas (25°, 27.5° y 30°C). Por otro lado sí hay diferencias en términos del día de producción máxima: el día tres en la condición a 30°C y el día 4 en las otras 2 condiciones. Es importante hacer notar que en esta condición de mayor temperatura, el aumento del pH es más rápido, alcanzando valores más altos que las otras condiciones desde el segundo día, lo cual podría ser la causa del descenso de la producción el cuarto día (desde el tercer día en esta temperatura ya se tiene un pH mayor a 8). Además, es posible que la interacción entre pH y temperatura altos haya contribuido a una disminución en el consumo de azúcares.

Los resultados de la prueba de glucosamina (como estimación de la biomasa) no muestran tendencias claras de crecimiento en ninguna de las temperaturas estudiada, debido posiblemente a que el inóculo se realiza en forma de micelio. De esta forma se obtiene un incremento de glucosamina menor que en el caso clásico del inóculo de esporas, por lo que se considera que el método muestra poca sensibilidad en este caso. Además, se apreció claramente que la estimación del crecimiento en este caso, a través del método de glucosamina no funcionó como se ha observado con otros hongos estudiados en el laboratorio (*Aspergillus*

terreus y *Amilomyces rouxii*), ya que se obtuvieron valores tan bajos que sugieren su utilización solamente en experimentos que supongan cambios grandes de biomasa. Lo anterior confirma que el bajo crecimiento de *A. chrysogenum* aún es un parámetro a mejorar para su utilización como microorganismo productor de CPC.

8. Conclusiones

- Es posible producir CPC con *Acremonium chrysogenum* C10 en FS de dos fases soporte sustrato utilizando bagazo de caña como soporte, MFAF 0.075 2.5X, con 70% de humedad, inóculo de 1% peso seco de biomasa/peso de soporte húmedo, en columnas con una densidad de empaque de 0.6 g/cc, aireadas a 1.4 L/h, a temperaturas entre 25 y 30°C.
- Los mejores métodos de extracción de CPC de los soportes de FS estudiados son: El de amortiguador de fosfatos pH 5.5 para el bagazo de caña y, el de extracción por expresión para la espuma de poliuretano.
- La producción de CPC en FS, en los dos soportes estudiados (bagazo de caña y espuma de poliuretano), muestra una alta velocidad; que se desarrolla principalmente del primero al segundo día de cultivo cuando no se utiliza ningún sistema amortiguador.
- La producción de CPC es más alta y más estable en bagazo de caña que en espuma de poliuretano bajo las condiciones iniciales de este estudio, en las cuales no se utiliza amortiguador de fosfatos en el medio de cultivo.
- La aireación es un elemento que influye de manera importante en el nivel y velocidad de producción de CPC en FS.
- Mantener el cultivo de *A. chrysogenum* en bagazo de caña dentro de ciertos valores de pH (6.4-8.0) durante los días de producción, alarga el tiempo y nivel de producción de CPC. Influye, además, en la velocidad de consumo de azúcares.
- Se logró mantener el pH de la FS de *A. chrysogenum* en un rango favorable para la continuidad de la producción de CPC con 2 estrategias: disminuyendo el pH inicial a 5.8 y usando amortiguador de fosfatos 0.075M.

- Se obtienen mejores niveles de producción de CPC en FS con bagazo de caña a una concentración de nutrientes 2.5X usando amortiguador de fosfatos en el medio de cultivo.
- No se detecta represión de la producción de CPC por fosfatos en FS en bagazo de caña.
- Temperaturas de cultivo entre 25 y 30° C no dan lugar a diferencias significativas en el nivel de producción de CPC en FS con bagazo de caña, pero sí en el tiempo en el que se observa la producción máxima.
- El método de purificación genética de *A. chrysogenum* C10 diseñado, permite encontrar individuos que alcanzan mejores niveles de producción que el mostrado por la cepa problema.
- No se logra un buen crecimiento de *A. chrysogenum* en las condiciones estudiadas por lo que aún es un parámetro a mejorar en estudios posteriores.

9. Bibliografía

- Adinarayana K, Prabhakar T, Srinivasulu V, Anitha V y Jhansi Lakshmi P. 2003. Optimization of process parameters for cephalosporin C production under solid state fermentation from *Acremonium chrysogenum*. *Process Biochem.* 39 (2):171-177.
- Araujo MLGC, Oliveira RP, Giordano RC y Hokka CO. 1996. Comparative studie on cephalosporin C production process with free and inmobilized cells of *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272. *Chem. Eng. Sci.*; 51(11): 2835-2840.
- Baldwin JE y Abraham EP. 1988 The biosynthesis of penicillins and cephalosporins *Nat. Prod. Rep.* 5:129-145.
- Baldwin JE, Adlington RM, Coates B, Crabbe MJC, Crouch NP, Keeping JW, Knight GC, Schofield CJ, Ting HH, Vallejo CA, Thorniley M y Abraham EP. 1987. Purification and initial characterization of an enzyme with deacetoxycephalosporin C synthetase and hidroxyylase activities. *Biochem. J.* 245: 831-841.
- Barrios-González J, Tomasini A, Viniestra-González G y López J. 1988. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 10(11): 793-798.
- Barrios-González J, Rodríguez GM y Tomasini A. 1990. Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid-state fermentation. *J. Ferment. Bioengin.* 70: 329-333.
- Barrios-González J, Castillo TE y Mejía A. 1993. Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotechnol Adv.* 11: 539-547.
- Barrios-González J y Mejía A. 1996. Production of secondary metabolites by solid state fermentation. *Biotechnology Annual Review Volume 2.* pp 85-121. MR El-Gewely editor. Elsevier Science B.V.
- Barrios-González J, Domínguez M, Flores V y Mejía A. 1997. Factors controlling the levels of penicillin in solid state fermentation. En: *Advances in Solid State Fermentation.* pp-407-415. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Basak, S, Velayudhan, A, y Ladish, MR. 1995. Simulation of diauxic production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*: Lag Model for fed-batch fermentation. *Biotechnol. Progr.* 11: 626-631.
- Behmer CJ y Demain AL. 1983. Further studies on carbon catabolite regulation of β -lactam antibiotic synthesis in *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Microbiol.* 8: 107-114.
- Benson SW. 1996. *Cálculos Químicos.* Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México D.F.
- Brakhage A. 1998. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 547-585.
- Brotzu G. 1948. *Lavori dell'Istituto D'Igiene di Cagliari.* Ricerche Su di un Nuovo Antibiótico. 1-11.
- Caldtriger PG y Niss HF. 1966. Role of methionine in cephalosporin synthesis. *Appl. Microbiol.* 14:746-753.
- Chang LT y Elander RP. 1979. Rational selection for improved cephalosporin C productivity in strains of *Acremonium chrysogenum* Gams. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:367-379.
- Chapman JL, Skatrud PL, Ingolia TD, Samson SM, Kaster KR y Queener SW. 1987. Recombinant DNA studies in *Cephalosporium acremonium*. *Dev. Ind. Microbiol.* 27:165-174.
- Chu, W-B y Constantinides A. 1987. Modelling, optimization, and computer control of the cephalosporin C fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 277-288.
- Cortés J, Martín JF, Castro JM, Láiz L y Liras P. 1987. Purification and characterization of a 2-oxoglutarate linked ATP independent deacetoxycephalosporin C synthase of *S. lactamdurams*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3165-3174.
- Cruz AJG, Silva AS, Araujo MLGC, Giordano RC y Hokka CO. 1999. Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. *Chem. Eng. Sci.* 54:3137-3142.

- Curtin LV. 1983. Artículo extraído de: Molasses in animal nutrition. National Feed Ingredients Association. West Des Moines, Iowa.
- Demain AL, Kennel YM y Aharonowitz Y. 1979. Carbon catabolite regulation of secondary metabolism. pp.163-185. In Bull AT, Ellwood DC, Ratledge (eds), Microbial Technology: Current State, Future State, Future Prospects, vol. 29. Cambridge University Press, Cambridge.
- Demain AL. 1983. Biosynthesis of β -Lactam antibiotics. Antibiotics Containing the β -Lactam structure. pp. 189-228. AL Demain y NA Solomons, eds. Springer Verlag, Berlín.
- Demain, AL y Elander RP. 1999. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. Antonie van Leeuwenhoek. 75: 5–19. Kluwer Academic Publishers.
- DeModena, JA, Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ, Fachini RA, Galazzo JF, Hughes DE, y Martín JF. 1993. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin. Bio/Technology 11:926-929.
- Dotzlaf JE y Yeh WK. 1987. Copurification and characterization of deacetoxycephalosporin C synthetase/hidroxylase from *Cephalosporium acremonium*. J. Bacteriol. 169: 1611-1618.
- Elson LA y Morgan WTJ. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. Biochem. J. 27:1824-1828.
- Espeso EA y Peñalva MA. 1996. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. J. Biol. Chem. 271: 28825-28830.
- Fawcett PA, Usher JJ, Huddleston JA, Bleaney RC, Nisbet JJ y Abraham EP. 1976. Synthesis of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valine and its role in penicillin biosynthesis. Biochem. J. 157:651-660.
- Fierro F, Barredo JL, Díez B, Gutiérrez S, Fernández FJ y Martín JF. 1995. The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6200-6204.
- Filipović SS, Ristić MD y Sakać MB. 2002. Technology of Corn Steep Application in Animal Mash and their Quality. Roum. Biotechnol. Lett. 7(3): 705-710.
- Florey HM, Abraham EP, Newton GGF, Burton HS, Kelly BK, Hale CW y Miller GA. 1956. Improvements relating to the production of an antibiotic substance by a *Cephalosporium* species. Brit. Patent. 745.208.
- Fujisawa Y, Shirafuji H, Kida M, Nara K, Yoneda M y Kanzaki T. 1973. New findings on cephalosporin C biosynthesis. Nature New Biol. 246: 154-155.
- Fujisawa Y, Shirafuji H, Kida M, Nara K, Yoneda M y Kanzaki T. 1975. Accumulation of deacetylcephalosporin C by cephalosporin C negative mutants of *Cephalosporium acremonium*. Agr. Biol. Chem. 39:1295-1301.
- Gams W. 1971. Cephalosporin-artige Schimmelpilze (Hiphomycetes). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Gutiérrez S, Díez B, Alvarez E, Barredo JL y Martín JF. 1991. Expresión of the *penDE* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding isopenicillin N acetyltransferase in *Cephalosporium acremonium* production of benzylpenicillin by the transformants. Mol. Gen. Genet. 225:56-64.
- Gutiérrez S, Velasco J, Fernández FJ y Martín JF. 1992. The *cefG* gene of *Cephalosporium acremonium* is linked to the *cefEF* gene and encodes a deacetylcephalosporin C acetyltransferase closely related to homoserine O-acetyltransferase. J. Bacteriol. 174: 3056-3064.
- Gutiérrez S. 1994. Caracterización de los genes *pcbAB* y *cefG* y análisis de las regiones del genoma de *A. chrysogenum* que contienen los genes *pcbC* y *cefEF* implicados en la biosíntesis de Cefalosporina C. Memoria par optar al grado de Doctor en Biología. Universidad de León. España.
- Gutiérrez S, Casqueiro J., Martín J.F. 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. Rev. Iberoam. Micol. 17: S54-S60.

- Hale CW, Newton GGF y Abraham EP. 1961. Derivatives of cephalosporin C formed with certain heterocyclic tertiary bases: The cephalosporin C family. *Biochem. J.* 79:403-408.
- Han YW y Mudgett RE. 1992. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid-state fermentations. *Biotechnol. Prog.* 8: 5-10.
- Heim J, Shen Y-Q, Wolfe S y Demain AL. 1984. Regulation of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase by carbon source during fermentation of *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:232-236.
- Hilgendorf, P, Heiser V, Diekmann H, y Thoma M. 1987. Constant dissolved oxygen concentrations in cephalosporin C fermentation: applicability of different controllers and effect on fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* XXVII:247-251.
- Hinnen A y Nüesch J. 1976. Enzymatic hydrolysis of cephalosporin C by an extracellular acetylhydrolase of *Cephalosporium acremonium*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 9:824-830.
- Hodgkin DC y Maslen EN. 1961. The X-ray structure of cephalosporin C. *Biochem. J.* 79: 393-402.
- Hoskins JA, O'Callaghan N, Queener SW, Cantwell CA, Wood JS, Chen VJ y Skatrud PL. 1990. Gene disruption of the *pcbAB* gene encoding ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *Curr. Genet.* 18:523-530.
- Jayatilake GS, Huddleston JA y Abraham EP. 1981. Conversión of isopenicillin N into penicillin N in cell free extracts of *Cephalosporium acremonium*. *Biochem. J.* 194: 645-648.
- Jekosch K y Kück U. 2000. Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* β -lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the *cre1* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:556-563.
- Jensen SE, Westlake DWS y Wolfe S. 1982. Cyclization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cisteinyl-D-valine to penicillins by cell-free extracts of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.* 35: 483-490.
- Jensen SE, Westlake DWS y Wolfe S. 1985. Deacetoxycephalosporin C synthetase and deacetoxycephalosporin C hydroxylase are two separate enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Antibiot.* 38: 263-265.
- Jermini MFG y Demain AL. 1989. Solid State fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *cephalosporium acremonium*. *Experientia.* 45:1061-1065.
- Knihinicki RD, Day RO y Williams KM. 1991. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs--II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)-ibuprofen-CoA thioesters. *Biochem Pharmacol.* 42(10):1905-11.
- Künzi MT. 1980. Regulation of cephalosporin synthesis in *Cephalosporium acremonium* by phosphate and glucose. *Arch. Microbiol.* 128: 78-81.
- Lancini, G y Lorenzetti R. 1993. *Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites.* Plenum Press, New York.
- Le Page GA y Campbell E. 1946. Preparation of streptomycin. *J. Biol. Chem.* 162: 163-171.
- Lonsane BK, Ghildyal NP, Budiartman S y Ramakrishna SV. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 258-265.
- Lübke, C, Jensen SE, y Demain AL. 1984. Prevention of phosphate inhibition of cephalosporin synthetases by ferrous ion. *FEMS Microbiol. Lett.* 25:75-79.
- Luengo JM y Peñalva MA. 1993. Penicillin biosynthesis. "Aspergillus: 50 years on". *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 29 . pp. 603-638. SD Martinelli y JR Kinghorn, eds. Elsevier, Amsterdam.
- Machado JR., Araujo MLGC y Hokka, CO. 1997. Estudo cinético da hidrólise da sacarose no processo de producao de cefalosporina C. *Anais XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (p. 200).
- Martín JF y Aharonowitz Y. 1983. Regulation of biosíntesis of β -Lactam antibiotics. En: *Antibiótics Containing the β -Lactam Structure I.* pp. 229-254. AL Demain y NA Solomons, eds. Springer Verlag, Berlín.

- Martín JF y Liras P 1989a. Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Vol 39. pp. 153-187. A. Fiechter, ed. Springer Verlag, Berlin.
- Martín JF y Liras P 1989b. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 173-206.
- Martín JF, Revilla G, Zanca M y López Nieto MJ. 1982. Carbon catabolite regulation of penicillin and cephalosporin biosynthesis, p.258-268. In Umewaza H, Demain AL, Hata T, Hutchinson CR (ed.) *Trends in Antibiotic Research*. Japanese Antibiotics Research Association, Tokyo, Japan.
- Mathison, L, Soliday C, Stepan T, Aldrich T y Rambossek J. 1993. Cloning, characterization, and use in strain improvement of the *Cephalosporium acremonium* gene *cefG* encoding acetyl transferase. *Curr. Genet.*23:33-41.
- Matsuda A, Sugiura H, Matsuyama K, Matsumoto H, Ichikawa S y Komatsu K-I. 1992. Cloning and disruption of the *cefG* gene encoding acetyl coenzyme:deacetylcephalosporin C O-acetyltransferase from *Acremonium chrysogenum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:40-46.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.* 31:426-429.
- Miller J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Mudgett RE, Nash J y Rufner R. 1982. Controlled gas environments in solid substrate fermentation. *Devel Ind. Microbiol.* 23: 397- 405.
- Newert RW, Barton B, Greaves P, Harper J y Turner G 1997. Analysis of a commercially improved *Penicillium chrysogenum* strain series: involvement of recombinogenic regions in amplification and deletion of the penicillin biosynthesis gene cluster. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:18-27.
- Newton GGF y Abraham EP. 1955. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid. *Nature.* 175:548.
- Newton GGF y Abraham EP. 1956. Isolation of cephalosporin C, a penicillin like antibiotic containing D- α -aminoadipic acid. *Biochem. J.* 62: 651-658.
- Ohno A, Ano T, Shoda M. 1992. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* nb 22 using wheat bran as a substrate. *Biotechnol. Lett.* 14:817-822.
- Oriol E, Raimbault M, Roussos S y Viniegra-González G. 1988a. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27:498-503.
- Oriol E, Schettino B, Viniegra-González G y Raimbault M.1988b. Solid state culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.* 66: 57-62.
- Página Web Departamento de Microbiología, Universidad de Salamanca 2003. <http://webcd.usal.es/web/transgen00/Unidades/Documen00/lactamicos/lactamicos.htm>
- Park H-J y Khang Y-H. 1995. Production of cephalosporin C by immobilized *Cephalosporium acremonium* in polyethyleneimine-modified barium alginate. *Enzyme and Microbial Technology.* 17:408-412.
- Peberdy, JF. 1987. Genetics of *Acremonium*. In: *Penicillium and Acremonium - Biotechnology Handbooks* (Peberdy, J.F., ed.). Vol 1. Plenum Press, New York.
- Pirt SJ, and Righelato RV. 1967. Effect of growth rate on the synthesis of penicillin by *P. chrysogenum* in batch and chemostat culture. *Appl. Microbiol.* 15: 1284-1290.
- Queener SW y Neuss N. 1982. The biosynthesis of β -Lactam antibiotics. *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*. Vol 3(pp. 181) EB Morin y M Morgan, eds. Academic Press, Londres.
- Samson SM, Belagaje R, Blankenship DT, Chapman JL, Perry D, Skatrud PL, van Frank RM, Abraham EP, Baldwin JE, Queener SW e Ingolia TD. 1985. Isolation, sequence determination and expression in *Escherichia coli* of the isopenicillin N synthetase gene from *Cephalosporium acremonium*. *Nature* 318:191-194.

- Sánchez S, Paniagua L, Mateos RC, Lara F, Mora J. 1981. Nitrogen regulation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*, pp 147-154. In C. Vezina and K. Singh (eds.), *Advances in Biotechnology, col. III*. Pergamon Press, Toronto.
- Sanchez S, Flores ME, y Demain AL. 1988. Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations, pp. 121–136. In S. Sanchez-Esquivel (ed.), *Nitrogen source control of microbial processes*. CRC Press. Inc., Boca Raton, Fla.
- Sándor E, Fekete, E y Karaffa L. 2003 Regulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Food Technol. Biotechnol.* 41(1):43-47.
- Sato K, Nagatani M, Nakamura K y Sato S. 1983. Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in solid state fermentation with forced aeration. *J. Ferment. Technol.* 61:623-629.
- Schmitt EK, Kempken R y Kück U. 2001. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics.* 265:508-518.
- Schmitz W, Fingerhut R y Conzelmann E. 1994. Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver. *Eur. J. Biochem.* 222: 313-323.
- Schmitz W, Albers C, Fingerhut R y Conzelmann E. 1995. Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur. J. Biochem.* 231(3):815-22.
- Sheidegger A, Kuenzi MT y Nuesch J. 1984. Partial purification and catalytic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of beta-lactams in *Cephalosporium acremonium*. *J. Antibiot.* 37:522-531.
- Shen Y-Q, Heim J., Solomon NA, Wolfe S y Demain AL. 1984. Repression of β -lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37:503-511.
- Shen Y-Q, Wolfe S y Demain AL. 1986. Levels of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. *Bio/Technology* 4:61-64.
- Skatrud PL y Queener SW. 1989. An electrophoretic molecular karyotype for an industrial strain of *Cephalosporium acremonium*. *Gene.* 79:331-338.
- Skatrud PL, Tietz AJ, Ingolia TD, Cantwell CA, Fisher DL, Chapman JL y Queener SW. 1989. Use of recombinant DNA to improve production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. *Bio/Technology* 7:477–485.
- Smith AW, Collins K, Ramsden M, Fox HM, y Peberdy JF. 1991. Chromosome rearrangements in improved cephalosporin C-producing strains of *Acremonium chrysogenum*. *Curr. Genet.* 19:235-237.
- Smith AW, Ramsden M y Peberdy JF. 1992. Analysis of promoter activity by transformation of *Acremonium chrysogenum*. *Gene.* 114: 211-216.
- Smith DJ, Bull TH, Edwards J y Turner G. 1989. Amplification of the isopenicillin N synthetase gene in a strain of *Penicillium chrysogenum* producing high levels of penicillin. *Mol. Gen. Genet.* 216: 492-497.
- Suárez T y Peñalva MA. 1996. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* 20: 529-540.
- Treichler HJ, Liersch M, Nüesch J y Döbeli H. 1979. Role of sulfur metabolism in cephalosporin C and penicillin biosynthesis. pp. 97–104. En OK Sebeck y AI Laskin (ed.), *Genetics of industrial microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Trejo MR. 1992. These de Doctorat Biologie Cellulaire-Microbiologie. Université de Provence. Aix-Marseille I. France
- Tomaselli S, Vergoignan C, Feron G y Durand A. 2001. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochem. Eng. J.* 7:1-5.
- Turgay K, Krause M, Marahiel MA. 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.* 6(4):529-46.

- Ullan RV, Liu G, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S y Martín JF. 2002. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of Isopenicillin N into Penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *The Journal of Biological Chemistry* 277(48):46216-46225.
- Velasco J, Gutiérrez S, Fernández FJ, Marcos AT, Arenos C y Martín JF. 1994. Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* 176:985-991.
- Vialta A, Ferreira Catani C, Bonatelli Junior R y Azevedo J. 1997 Cephalosporin C production and genetic improvement of the fungus *Acremonium chrysogenum* based on morphological mutant isolation. *Braz. J. Genet.* 20 (2) 165-170.
- Vicik, SM, Fedor, AJ y Swartz RW. 1990. Defining an optimum carbon source/methionine feed strategy for growth and cephalosporin C formation by *Cephalosporium acremonium*. *Biotechnol. Prog.* 6(5):333-340.
- Viniegra-González G. 1997. Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. En *Advances in Solid State Fermentation*. pp-5-18. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- Walz M y Kück U. 1991. Polymorphic karyotypes in related *Acremonium chrysogenum* strains. *Curr. Genet.* 19: 73-76.
- Walz M y Kück U. 1993. Targeted integration into the *Acremonium chrysogenum* genome: disruption of the *pcbC* gene. *Curr. Genet.* 24:421-427.
- Wang HH, Chiou JY, Wang JY, Hong CY y Tsen WC. 1984. Cephalosporin C production by solid state fermentation with rice grains (Article in Chinese). *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* 17(1):55-69.
- Wang NS. 2003. Sucrose assay by the dinitrosalicylic colorimetric method. Department of Chemical Engineering. University of Maryland. nsw@eng.umd.edu.
- Yang SS y Ling MY. 1989. Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation. *Biotechnol Bioeng* 33: 1021-1028.
- Zanca DM y Martín JF. 1983. Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiot (Tokyo)* 36: 700-708.
- Zhang J y Demain AL. 1992. Regulation of the ACV synthetase activity in the β -lactam biosynthetic pathway by carbon sources and their metabolites. *Arch. Microbiol.* 158: 364-369.
- Zhang J, Wolfe S y Demain AL. 1989. Carbon source regulation of the ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium* C-10. *Curr. Microbiol.* 18: 361-367.

Anexos

Anexo 1.

Ensayo General de Potencia de Cefalosporina C

Condiciones Generales para el Ensayo

Medio de cultivo:	TSA 1%
Microorganismo de prueba:	<i>Escherichia coli</i> ESS 2231
Absorbancia de inóculo a 600 nm:	1
Concentración de inóculo en el medio de cultivo:	1 mL por cada 15 mL de medio
Medio inoculado a verter en placa (150 X 15 mm):	50 mL
Medio inoculado a verter en bandeja:	202.7 mL
Concentraciones de estándar :	25, 15, 10, 5, 2.5 µg /mL
Diámetro de las perforaciones en el agar:	8 mm
Volumen de st. o muestra a inocular en cada perforación:	60 µL

Técnica

Pesar exactamente una cantidad de estándar equivalente a 100 mg de Cefalosporina C sal de zinc (base seca). Colocar en matraz volumétrico de 100 mL, disolver en EDTA 0.01M y llevar a volumen.

De la solución anterior tomar una alícuota de 25 mL colocarla en matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con agua destilada. Esta solución stock tiene una concentración de 500 microgramos de Cefalosporina C, sal de zinc/mL

Curva de calibración

De la solución stock tomar una alícuota de 5 mL, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración final: 25 microgramos/mL)

Tomar una alícuota de 3 mL de la solución stock, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración final: 15 microgramos/mL)

De la solución stock tomar una alícuota de 1 mL colocarla en un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración final: 10 microgramos/mL)

Tomar una alícuota de 1 mL de la solución stock, colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración final: 5 microgramos/mL)

De la solución stock tomar una alícuota de 0.5 mL colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con agua destilada. (Concentración final: 2.5 microgramos/mL)

Una vez cargadas las placas de bioensayo, se incuban a 4°C durante al menos 1h, tiempo en el que el antibiótico difundirá a través del medio. Después las placas de bioensayo se incubarán durante 12-15 h a 37 °C. El antibiótico presente en el medio inhibirá el crecimiento del microorganismo inoculado, dando lugar a halos de inhibición de crecimiento. Los halos de inhibición obtenidos se encuentran entre 15 y 28 mm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de Cefalosporina C sal de zinc nos permitirán realizar una recta patrón que relaciona directamente el logaritmo de la concentración de Cefalosporina con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en el bioensayo. La interpolación en esta recta de los diámetros de los halos de inhibición de las muestras problema permitirá determinar la concentración de antibiótico en los caldos de fermentación.

Anexo 2.

Ensayo para la determinación de azúcares totales (DNS modificado)

(Miller GL, 1959; y Wang NS, 2003)

Curva Patrón

Tubo	Volumen de solución estándar de glucosa (1g/Lt) (ml)	Volumen de agua destilada (ml)	Concentración de glucosa en el tubo (mg/ml)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

Cada uno de estos tubos se hacen por duplicado.

Procedimiento

1. Colocar 1 ml de muestra en un tubo de ensayo
2. Agregar 20 microlitros de HCl concentrado a la muestra (1), agitar en el vortex
3. Permitir la hidrólisis a 90°C durante 5 minutos
4. Agregar 50 microlitros de KOH 5N para neutralizar el ácido, agitar en el vortex
5. Adicionar 1 mL de reactivo DNS, agitar en el vortex
6. Llevar a ebullición en Baño María durante 5 minutos
7. Enfriar inmediatamente con hielo o agua helada
8. Agregar 8 mL de agua destilada
9. Agitar en vortex y leer a 575 nm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de glucosa nos permitirán realizar una recta patrón que relaciona directamente la concentración de glucosa con la absorbancia. La interpolación en esta recta de las absorbancias de las muestras problema permitirá determinar la concentración de glucosa en los caldos de fermentación.

Anexo 3.

Prueba de Glucosalina

Elson y Morgan, 1933; y Tomaselli y *col.*, 2001

Curva Patrón

Tubo	Volumen de solución estándar de glucosamina (1mg/mL) (ml)	Volumen de agua destilada (ml)	Concentración de glucosamina en el tubo (mg/ml)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

Cada uno de estos tubos se hacen por duplicado.

Reactivos para determinación de glucosamina

Solución A: 1 mL de acetilacetona en 50 mL de carbonato de sodio 0.5 N (de preparación reciente)

Solución B: 0.8 g de PDBA disuelto en 30 mL de HCl 12 N + 30 mL de etanol.

Procedimiento

1. Pesar 0.3 g de soporte cultivado secado a 60° durante 48 h.
2. Agregar 5 mL de ácido sulfúrico al 72%
3. Incubar a 25° C a 130 rpm durante 30 minutos
4. Diluir con 54 mL de Agua destilada
5. Calentar en autoclave la mezcla a 121 °C y 15 lbs de presión durante 1 hora.
6. Neutralizar a pH 7.0 con hidróxido de sodio 10 M y 0.5 M (Anotar volúmenes)
7. Centrifugar
8. Tomar 2 mL de muestra hidrolizada (Sobrenadante del centrifugado)
9. Agregar 1 mL de solución A (de preparación reciente).
10. Agregar 1 mL de agua destilada
11. Llevar a Baño María durante 15 minutos
12. Enfriar los tubos y adicionar 4 mL de etanol
13. Adicionar 1 mL de reactivo B
14. Adicionar 1 mL de etanol
15. Agitar y dejar reposar 30 minutos en la oscuridad
16. Determinar la DO a 530 nm.

Cálculos

Los controles con diferentes concentraciones de glucosamina nos permitirán realizar una recta patrón que relaciona directamente la concentración de glucosamina con la absorbancia. La interpolación en esta recta de las absorbancias de las muestras problema permitirá determinar la concentración de glucosamina en las muestras de fermentación.

Anexo 4

Composición general de los elementos complejos del medio

	Melaza de caña (Curtin, 1983)			Producto de maceración de maíz (Filipovic y col., 2003)		Extracto de carne
	Min.	Méd.	Máx.	LMM	SMM	
PESO ESPECÍFICO	1,39	1,42	1,44			
pH (dilución 2:1)	4,5	5,55	6,0	3.94	4.25	
Agua %	16	19	23	94.73	50.26	
Sustancia Seca %	77	81	84	5.27	49.74	
Azúcar total invertida como glucosa %	52	56	65	5.65	3.31	
N-total %.	0,4	0,7	1,5	0.90	4.78	6
Ceniza %	7	9	11			
P₂O₅, %.	0,6	0,9	0,2			
CaO, %	0,1	0,5	1,1			
MgO, %	0,03	0,07	0,10			
K₂O, %	2,6	3,6	5,0			
Calcio%		0.8		0.01	0.09	
Fósforo%		0.08		0.16	1.07	
Potasio %		2.4		3.80	3.17	
Sodio %.		0.2		0.14	0.10	
Cloro %		1.4				
Azufre %		0.5				
Carbono %	20.8	22.4	26	2.26	1.32	

Anexo 5.**Relación C/N en el MCFA**

Peso Molecular de CaCO₃: 100g/mol, peso de carbono presente: 12 g/mol

% de Carbono presente en CaCO₃ : 12%

Componente	g/L	% Carbono	% Nitrógeno	g de carbono/L de medio de cultivo	g de nitrógeno/L de medio de cultivo
Sólidos de Maceración de Maíz	10	1.32	4.78	0.13	0.48
Extracto de Carne	60		6		3.6
Melazas de caña	60	22.4	0.7	13.44	0.42
				13.57	4.50
				Relación C/N	3.02

Anexo 6

A. Medio de Cultivo para producción de CPC sobre arroz Tsalai. (Wang y col., 1984)

(g/100g de soporte)

Peptona	0.65
Sulfato de amonio	0.65
Inositol	2.6
Carbonato de calcio	0.65
Sulfato de calcio	0.65
Sulfato de potasio	0.065
Sacarosa	1.3
DL-Metionina	0.13
Oleato de metilo	2.6
Solución. de elementos traza	1.3% (v/p)

B. Medio de Cultivo para producción de CPC sobre trigo crudo (Adinarayana y col., 2003)

(g/100g de soporte)

Extracto de levadura	1 g	Solución de Sales (g/L)	
Almidón soluble	1 g	KH ₂ PO ₄	0.5
Solución de sales	15 mL	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Finalmente se ajusta a pH 6.5 con NaOH ó		FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
HCl 1N		NaCl	0.5