

otros libros de Editorial ACRIBIA, S. A.,  
sobre **BIOLÓGIA MOLECULAR  
Y BIOTECNOLOGÍA**

C. M. y otros  
INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA

S. J. y otros  
BIOTECNOLOGÍA BÁSICA

er, D.  
FUNDAMENTOS DE BIOLÓGIA MOLECULAR

P. y Hubble, J.  
BIOTECNOLOGÍA DE LAS ENZIMAS

n, D. y Cove, S. N.  
BIOLÓGIA MOLECULAR DE LAS PLANTAS

J. S.  
BIOTECNOLOGÍA DE LA CERVEZA Y LA MALTA

G. y David, W.  
BIOTECNOLOGÍA (INTRODUCCIÓN CON EXPERIMENTOS MODELO)

W. y Primrose, S. B.  
PRINCIPIOS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA

J. R.  
INGENIERÍA GENÉTICA Y SUS APLICACIONES

M. D. y otros  
BIOTECNOLOGÍA: LOS PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

J. M.  
BIOLÓGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

C.  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

K. y Jones, M. G. K.  
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL AGRÍCOLA

A.  
PRINCIPIOS DE BIOTECNOLOGÍA

A.  
MANUAL DE BIOTECNOLOGÍA DE LOS ENZIMAS

W. A.  
BIOTECNOLOGÍA. MANUAL DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

# BIOTECNOLOGIA DE LA FERMENTACION

**OWEN P. WARD**



80025 75540

Biología  
de la Fermentación

# BIOTECNOLOGIA DE LA FERMENTACION

Principios, métodos y aplicaciones

*Handwritten:* Universidad de Pamplona

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA		
DIPLOMA		
NO. FOLIO	NO. DE CLASE	FECHA RECIBO
COMPRA	DIPLOMAS	28-III-98
PRECIO	NO. UNIVERSIDAD	NO. CLASIFICACION
\$ 103 500	21 347	

EJ: 2.

# **Biotecnología de la fermentación**

**Principios, procesos y productos**

*para Alice, Conor, Evelyn y David*

**Owen P. Ward**

Professor and Director of the  
Microbial Biotechnology Centre,  
University of Waterloo, Canada

Traducido por:

**Miguel Calvo Rebollar**

Profesor Titular  
Departamento de Tecnología y  
Bioquímica de los Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad de Zaragoza

**Emilia Sevillano Calvo**

Licenciada en Ciencias Químicas

Editorial ACRIBIA, S. A.  
ZARAGOZA (España)

Original: Fermentation Biotechnology  
Author: Owen P. Ward  
Publisher: Open University Press  
This edition is published by arrangement with Open University Press, Milton Keynes

---

Copyright © Owen P. Ward 1989  
© De la edición en lengua española  
Editorial Acribia, S. A. Apartado 466  
50080 ZARAGOZA (España)

---

L.S.B.N.: 84-200-0706-4

IMPRESO EN ESPAÑA

PRINTED IN SPAIN

Reservados todos los derechos para los países de habla española. Este libro no podrá ser reproducido en forma alguna, total o parcialmente, sin el permiso de los editores.

Código legal: Z-1.327-91

Editorial ACRIBIA, S.A. - Royo, 23 - 50006 Zaragoza

Tipo Linea, S.A. - Isla de Mallorca, s/n. - 50014 Zaragoza, 1991

## Indice de contenido

<i>Prólogo</i> .....	ix	
<i>Agradecimientos</i> .....	xi	
<b>Capítulo 1</b>	<b>Introducción</b> .....	1
	La fermentación como un antiguo arte .....	1
	La era moderna de la tecnología de la fermentación industrial .....	2
	Impacto de las tecnologías de híbridomas y de DNA recombinante .....	14
<b>Capítulo 2</b>	<b>Biología de los microorganismos de uso industrial</b> ....	17
	Introducción .....	17
	Microorganismos industriales .....	17
	Crecimiento celular .....	27
	Metabolismo .....	31
	Regulación del metabolismo .....	36
	Asimilación del sustrato/secreción del producto .....	41
<b>Capítulo 3</b>	<b>Sistemas de fermentación</b> .....	47
	Procesos continuos y discontinuos .....	47
	Diseño del fermentador .....	52
	Fermentaciones en sustratos sólidos .....	65
	Instrumentación y control .....	67

<b>Capítulo 4</b>	<b>Materias primas utilizadas en fermentación</b> .....	73
	Criterios utilizados en la formulación del medio .....	73
	Medios de fermentación microbiana .....	81
	Medios de cultivo de células animales .....	83
	Medios de cultivo para el crecimiento de células vegetales .....	87
	Mantenimiento del medio de cultivo .....	88
<b>Capítulo 5</b>	<b>Procesado de la corriente de salida</b> .....	89
	Introducción .....	89
	Procesos de separación .....	91
	Ejemplo de procesos de recuperación .....	104
<b>Capítulo 6</b>	<b>Producción de biomasa</b> .....	111
	Introducción .....	111
	Producción de proteínas de organismos unicelulares ..	112
	Inóculos microbianos .....	126
<b>Capítulo 7</b>	<b>Fermentaciones de los alimentos</b> .....	133
	Bebidas alcohólicas .....	133
	Fabricación de queso .....	148
	Fabricación de pan .....	150
	Alimentos basados en soja fermentada .....	152
	Productos cárnicos fermentados .....	155
	Vinagre .....	155
<b>Capítulo 8</b>	<b>Compuestos químicos industriales</b> .....	159
	Compuestos químicos orgánicos .....	159
	Acido giberélico .....	177
	Biopolímeros .....	178
	Bioinsecticidas .....	181
<b>Capítulo 9</b>	<b>Aditivos alimentarios</b> .....	183
	Aminoácidos .....	183
	Nucleósidos .....	191
	Vitaminas .....	194
	Grasas y aceites .....	196
<b>Capítulo 10</b>	<b>Productos para uso médico</b> .....	199
	Antibióticos .....	199
	Obtención de esteroides por fermentación .....	207

	Alcaloides del cornezuelo .....	210
	Productos microbianos obtenidos con tecnología de DNA recombinante .....	212
	Vacunas .....	214
	Anticuerpos monoclonales .....	220
	Otros productos de cultivo de células de mamíferos ...	225
	Agentes anticancerosos .....	227
	Otros agentes farmacológicos microbianos .....	231
	Producción de shikonina por cultivo de células vegetales .....	231
<b>Capítulo 11</b>	<b>Enzimas industriales</b> .....	233
	Aplicaciones de los enzimas .....	233
	Nuevos avances .....	235
	Producción de enzimas .....	242
	Enzimas recombinantes .....	247
<b>Capítulo 12</b>	<b>Tratamiento de residuos</b> .....	249
	Introducción .....	249
	Sistemas de tratamiento de desechos .....	250
	Inóculos microbianos y enzimas para el tratamiento de desechos .....	255
	<i>Bibliografía</i> .....	257
	<i>Índice alfabético</i> .....	267

---

## Prólogo

En muchas formas, el proceso de la fermentación representa un eslabón o puente esencial, ya que vincula, por ejemplo, las antiguas artes de elaboración de queso, vino y alimentos fermentados orientales mediante el empleo de una flora microbiana natural con la moderna industria de fermentación de alimentos que utiliza cultivos puros y un sofisticado equipo de control del proceso, así como las prácticas antiguas de producción de algas para consumo alimentario en tanques alcalinos con el proceso de producción a gran escala de proteínas de organismos unicelulares, diseñado recientemente. El desarrollo con éxito del proceso de fermentación ha permitido, a partir de las observaciones de Alexander Fleming acerca de los efectos antagonistas del *Penicillium notatum* respecto al *Staphylococcus aureus*, evolucionar hasta la gran industria de los antibióticos. Existen además muchos otros ejemplos históricos. Recientemente, la fermentación ha emergido como una tecnología fundamental y vital, como la fuerza integrante de la biotecnología moderna. El desarrollo de la tecnología de la fermentación depende de los logros de los biólogos moleculares y celulares y de los ingenieros de procesos, lo que vincula la ingeniería genética con los procesos industriales a gran escala comercialmente viables. El espectacular avance de la tecnología de hibridomas y la comercialización del primer proceso en planta de cultivo de células han conducido a que el fermentador sea un instrumento de producción, no sólo para la manufactura de productos microbianos sino también para la de células obtenidas de mamíferos y plantas. La necesidad de controlar mejor el proceso de fermentación, de forma más automática, y el desa-

rollo de dispositivos de detección biológicos o biosensores ha unido la biología con la electrónica y la tecnología de computadoras. La expansión de la actividad comercial en las próximas décadas, resultante de las investigaciones en biología molecular y celular, asegura a la tecnología de fermentación un brillante futuro. A largo plazo, la fermentación de materias primas renovables puede reemplazar a los combustibles fósiles no renovables como fuente de compuestos químicos. Este libro, enfocado en los fundamentos, procesos y productos, intenta abarcar todos estos aspectos.

Agradezco especialmente a mis colegas el Dr. C. W. Robinson, del Departamento de Ingeniería Química, y al Dr. B. R. Glick, del Departamento de Biología de la Universidad de Waterloo y a mi ex-colega, el Dr. M. Clynes, de la Escuela de Ciencias Biológicas, N.I.H.E. de Dublín, el haber revisado cada una de las secciones del libro y haberme aconsejado experta y críticamente. También agradezco a mis colegas Val Butler, Kathy Clarke, Kitty Hain y Shelley Stobo que me han ayudado en la preparación del manuscrito.

Owen P. Ward

## Agradecimientos

Deseo agradecer a los autores, editores y empresas listadas el permiso concedido para reproducir material de su propiedad.

### Autores

Abson, J.W. & Todhunter, K.H. (Figure 12.1); Bauer, K. (Figure 10.7); Furuya, A. *et al.* (Figure 9.6); Greenshields, R.N. (Figure 7.8); McGregor, W.C. (Figure 5.13); Miller, T.L. & Churchill, B.W. (Table 4.2); Ng, T.K. *et al.* (Figure 8.1); Pirt S.J. (Figure 6.7); Porubscan, R.S. & Sellars, R.L. (Figure 6.8); Queener, S.W. & Swartz, R.W. (Figure 10.4).

### Editores y fabricantes

Academic Press Inc., Orlando, Florida: Figure 6.8 from Porubscan, R.S. & Sellars, R.L. (1979). Lactic Starter Culture Concentrates. *Microbial Technology*, Vol. 1, 59-61; Figure 12.1 from Abson, J.W. & Todhunter, K.H. (1967). Effluent Disposal. *Biochemical and Biological Engineering Science*, Vol. 1, 310-343; Figure 7.8 from Greenshields, R.N. (1978). Acetic Acid: Vinegar. *Economic Microbiology*, Vol. 2, 121-186; Figure 10.4 from Queener, S.W. & Swartz, R.W. (1979). Penicillins: Biosynthetic and Semisynthetic. *Economic Microbiology*, Vol. 3, 35-123.

Agricultural Chemical Society of Japan: Table 10.2 from Fujita, Y. and Hara, Y. (1985). *Agric. Biol. Chem.* 49 (7), 2071-2075.

American Chemical Society: Figure 5.14 from Pandrey, R.C. *et al.* (1985). Process Developments in the Isolation of Largomycin F-II, a Chromoprotein Antitumour Antibiotic. *Purification of Fermentation Products*, ACS Symposium Series 271, 133-153.

American Society for Microbiology: Figure 9.6 from Furuya A. *et al.* (1968).

Production of nucleic acid related substances by fermentative processes. XIX. Accumulation of 5'inosinic acid by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Applied Microbiology*, 16, 981-987; Table 4.2 from Miller, T.L. & Churchill, B.W. (1986). Substrates for Large-Scale Fermentations. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 122-136.

American Association for the Advancement of Science: Figure 6.3 from Litchfield, J.H. (1983). Single-cell proteins. *Science*, 219, 740-746; Figure 8.1 from Ng, T.K. *et al.* (1983). Production of feedstock chemicals. *Science*, 219, 733-740.

Ametek/Process Equipment, California: Figure 5.6.

Bio/Technology: Figure 3.12 from Wilson, T. (1984). Bioreactor, synthesizer, biosensor markets to increase by 16 percent annually. *Bio/Technology*, 2, 869-873; Figure 5.1 from Dwyer, J.L. (1984). Scaling up biproduct separation with high performance liquid chromatography. *Bio/Technology*, 2, 957-964; Figures 5.2 and 5.12 from Fish, N.M. & Lilly, M.D. (1984). The interactions between fermentation and protein recovery. *Bio/Technology*, 2, 623-627; Figure 10.14 from Van Brunt (1986b). Immobilized mammalian cells: the gentle way to productivity. *Bio/Technology*, 4, 505-510; Figure 10.15 from Posillico, E.G. (1986). Microencapsulation technology for large-scale antibody production. *Bio/Technology*, 4, 114-117; Figure 10.16 from Klausner, A. (1986). 'Single chain' antibodies become reality. *Bio/Technology*, 4, 1041-1043; Table 10.1 from Ratafia, M. (1987). Mammalian cell culture: worldwide activities and markets. *Bio/Technology*, 5, 692-694.

Blackwell Scientific Publications, Oxford: Figures 2.1 and 2.5 from Deacon, J.W. (1984). *Introduction to Modern Mycology*.

British Mycological Society: Figure 8.7 from Bu'Lock, J.D. *et al.* (1974). Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Transactions of the British Mycological Society*, 62, 377-389.

Butterworth Scientific Ltd., England: Table 9.4 from Sinden K.W. (1987). The production of lipids by fermentation within the EEC. *Enzyme and Microbial Technology*, 9, 124-125.

Cambridge University Press: Figure 6.6 from Anderson, C. & Solomons, G.L. (1984). Primary metabolism and biomass production from *Fusarium*. *The Applied Mycology of Fusarium*, 231-250; Figure 7.1 from Hough, J.S. (1985). *The Biotechnology of Malting and Brewing*.

Churchill Livingstone, Edinburgh: Figures 10.8, 10.9, 10.10, 10.11, 10.12 and 10.13 from Van Hemert, P. (1974). Vaccine Production as a Unit Process. *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 13, 151-271.

CRC Press Inc., Boca Raton, Florida: Table 6.1 from Solomons, G.L. (1983). Single Cell Protein. *Critical Reviews of Biotechnology*, 1 (1), 21-58.

Edward Arnold, London: Figure 3.7 from Kristiansen, B. and Chamberlain, H.E. (1983). Fermenter Design. *The Filamentous Fungi*, Vol. IV, 1-19.

Gulf Publishing Co., Texas: Figure 6.2 from Laine, B.M. (1974). What proteins cost from oil. *Hydrocarbon Processing*, 53, (11), 139-142.

Intercept Ltd., England: Figures 3.10, 12.2 and 12.3 from Wheatley, A.D. (1984). Biotechnology of Effluent Treatment. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol. 1, 261-310.

John Wiley & Sons Inc., New York: Figure 6.5 from Bernstein, S. *et al.* (1977). The Commercial Fermentation of Cheese Whey for the Production of Protein and/or Alcohol. *Single Cell Protein from Renewable and Nonrenewable Resources, Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 7, 1-9.

Leonard Hill Books, London: Figure 5.5 from Purchas, D.B. (1971). *Industrial Filtration of Liquids*.

McGraw Hill Book Company, New York: Figure 5.3 from Bailey, J.E. & Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Edition*.

New York Academy of Science: Figure 5.13 from McGregor, W.C. (1983). Large-Scale Isolation and Purification of Recombinant Proteins from Recombinant *E. coli*. *Annals of the New York Academy of Science*, 413, 231-236.

Penwalt Corporation, Sharples-Stokes Division, Pennsylvania: Figure 5.4.

Pergamon Press Ltd., Oxford: Figure 5.9 in Tutunjian, R.S. (1985). Ultrafiltration Processes. *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2, 411-437; Figure 7.6 in Irving, D.M. & Hill, A.R. (1985). Cheese Technology. *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, 523-565; Figure 9.3 in Nakayama, K. (1985). Lysine. *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, 607-620; Figures 10.18 and 10.19 from Flickinger, M. (1985). Anticancer Agents. *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, 231-273.

Springer-Verlag, New York: Figure 2.14 from Demain, A.L. (1971). Overproduction of Microbial Metabolites and Enzymes Due to Alteration of Regulation. *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 1, 113-142.

Van Nostrand Reinhold (UK) Ltd: Figure 2.17 from Priest, F.G. (1984). *Extracellular Enzymes*. Figure 3.8 and 3.9 from Smith, J.E. (1985). *Biotechnology Principles*.

---

# Capítulo 1

## *Introducción*

### **La fermentación como un antiguo arte**

En términos generales, la fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas. La fermentación ha sido realizada como un arte durante muchos siglos; por ejemplo, la elaboración del vino se cree que se practicaba ya al menos 10.000 años a.C. mientras que los historiadores creen que los egipcios producían cerveza en los años 5000-6000 a.C., dejando germinar la cebada en vasijas de barro y después estrujándola, amasándola y finalmente remojándola con agua para obtener la bebida. Hacia el año 4000 a.C. los egipcios utilizaron las levaduras de la cerveza para la producción de dióxido de carbono para el hinchamiento de la masa del pan. En Méjico, los antiguos aztecas recogían algas del género *Spirulina* de estanques alcalinos para el consumo alimentario. Los orígenes de una gran variedad de alimentos y salsas fermentadas procedentes del Oriente y de otras partes del mundo, que actualmente se sabe que están basados en procesos de fermentación, producción de enzimas e hidrólisis enzimática mediante métodos de cultivo de superficie, se remontan claramente a muchos miles de años. Los datos acerca de la transformación de la leche en derivados lácteos, por ejemplo queso, se remontan al año 5000 a.C. cuando se observó que la leche contenida en los estómagos de las terneras (que tienen enzimas que coagulan la leche) se cuajaba. El vinagre probablemente se conociera desde el mo-

mento en el que se obtuvo vino, aunque los datos más tempranos referidos a este compuesto se hallan en el Antiguo y Nuevo Testamento. Las primeras referencias para destilar alcohol para bebidas datan del año 10000 a.C. en China.

La producción de alimentos y bebidas modificadas mediante procesos de fermentación es operativa desde aproximadamente 10.000 años antes de que se reconociera la existencia de los microorganismos, siendo también evidente que estas tecnologías tradicionales han ido mejorando gradualmente. El examen microscópico de los sedimentos de las urnas de cerveza excavadas que datan del 3400 al 1440 a.C. demuestra claramente que la mayoría de las veces contienen levaduras, observándose también que en los sedimentos más recientes su pureza es mayor.

Desde el punto de vista farmacéutico, los quesos, la carne y el pan enmohecidos se han empleado en la medicina popular durante miles de años para curar heridas y tratar las infecciones. Retrospectivamente, los efectos beneficiosos de tales tratamientos se debían indudablemente a su actividad antibiótica.

### La era moderna de la tecnología de la fermentación industrial

#### TECNOLOGIA MICROBIANA

Antonie van Leeuwenhoek, un holandés pionero en el uso del microscopio, fue el primero en observar las levaduras al examinar gotas de cerveza fermentada con un microscopio primitivo en 1680, aunque este descubrimiento pronto fue olvidado y la fermentación continuó siendo estudiada casi exclusivamente por los químicos, como había ocurrido hasta entonces, quienes no consideraron que en este proceso estuviese implicada la materia viva. Posteriormente entre 1836 y 1837 tres investigadores, Cagniard-Latour, Schwann y Kützing manifestaron independientemente su opinión de que las levaduras eran una «cosa» viva, idea que fue ridiculizada por un cierto número de químicos eminentes, entre ellos Berzelius, Wholer y von Liebig. En 1847, Blondeau, profesor de física, estudió las fermentaciones que implicaban a los ácidos láctico, butírico y acético y a la urea y parece que fue el primero en manifestar que las diferentes fermentaciones eran llevadas a cabo por distintos «hongos». A pesar de estas observaciones, no fue hasta 1856-7 cuando Louis Pasteur, habiendo llevado a cabo investigaciones detalladas acerca de las fermentaciones de la cerveza y el vino, concluyó finalmente que las levaduras vivas fermentaban el azúcar en etanol y dióxido de carbono, cuando eran obligadas a vivir en ausencia de aire. Pasteur también estudió muchas otras fermentaciones. Por ejemplo, observó que

un organismo (probablemente un *Penicillium*) fermentaba selectivamente el D-tartrato amónico en una mezcla racémica de D y L-tartrato; también observó cómo unos organismos cilíndricos producían ácido butírico sólo en condiciones anaerobias y además investigó la producción de ácido acético por fermentación. En los años setenta del siglo pasado Pasteur, junto con otros investigadores, observó los efectos antagonistas de un microorganismo frente a otros y predijo sus aplicaciones terapéuticas potenciales. Otro hito importante en el avance de la microbiología industrial y médica data del 1881, cuando Robert Koch, médico, exploró el desarrollo de técnicas de cultivo puro así como otros métodos bacteriológicos clásicos utilizados hasta la fecha.

Dos elementos vitales condicionaron el inicio de la era moderna de la tecnología de la fermentación industrial: el empleo tradicional de mohos y levaduras en la modificación de alimentos y bebidas y los estudios microbiológicos pioneros de científicos como Pasteur y Koch. La tecnología de los procesos de fermentación en superficie o semisólidos ha sido desarrollada a través de la producción de alimentos orientales; la capacidad de los mohos para hidrolizar el almidón y las proteínas, por ejemplo, en la producción de salsa de soja, ha preparado el camino hacia la producción de enzimas industriales. Las fermentaciones anaerobias, particularmente la producción de bebidas alcohólicas, habían sido ya desarrolladas y caracterizadas en alguna extensión. El cultivo de algas y mohos ha cimentado el proceso industrial de obtención de proteínas alimentarias microbianas (proteínas de organismos unicelulares, SCP) y de inoculos de microorganismos. La producción tradicional de vinagre y más recientemente los estudios de Pasteur acerca de la producción de ácidos han preparado el camino hacia el desarrollo de fermentaciones que produzcan ácidos orgánicos. El desarrollo de la metodología de cultivos puros por Koch ha proporcionado técnicas para estudiar las aplicaciones industriales de cepas microbianas individuales y ha dado paso al empleo de cultivos puros, medios esterilizados y condiciones asépticas en las fermentaciones industriales.

#### CULTIVO DE CELULAS DE ANIMALES Y PLANTAS

Aunque las técnicas de cultivo de células de mamíferos *in vitro* se vienen practicando desde hace un siglo, en general los avances en este área han tenido lugar más recientemente que los de la tecnología microbiana. Roux, en 1885, llevó a cabo los primeros experimentos de «explantación» utilizando tejidos vivos de embrión de pollo. Hacia 1910, Harrison y Carrel desarrollaron muchas de las técnicas clásicas de cultivo de células de mamíferos, definiendo la composición de sales y aminoácidos del medio de cultivo, usando por primera vez como suplemento plasma o linfa coagulada para estimular el crecimiento y di-

señando biorreactores para la producción de virus y otros productos. En 1950 Morgan y sus colegas desarrollaron el primer medio definido químicamente capaz de mantener el crecimiento de embriones de pollo durante 4-5 semanas. Entre 1955 y 1960, Eagle y colaboradores definieron muchas de las necesidades nutritivas de las células de mamífero cultivadas. Las exigencias de vitaminas y aminoácidos específicas determinadas por este grupo para el crecimiento reproducible de células L han servido de base para la mayoría de las formulaciones habituales para el cultivo celular de líneas específicas. Estos avances han permitido a partir de los años cincuenta el desarrollo de las vacunas víricas mediante técnicas de cultivo celular y han dado paso a una mayor expansión en el uso industrial de cultivos de células para la producción de anticuerpos monoclonales y otros productos hacia mitades de los ochenta.

El primer cultivo con éxito de células vegetales fue llevado a cabo por Gautheret en 1934. Durante los años cincuenta y sesenta las técnicas de cultivo de células vegetales se desarrollaron hasta una etapa en la que sus aplicaciones en horticultura y agricultura para el desarrollo de cepas resultaron ubicuas. En los últimos años de la década de los cincuenta y los primeros de la de los sesenta se logró el cultivo a gran escala de tabaco y de una gran variedad de células vegetales. También ha ganado interés el empleo de cultivos de células vegetales para producir plantas con metabolitos secundarios de gran valor. En 1985, Mitsui Petrochemical Company de Japón comenzó la producción de shikonina utilizando *Lithospermum erythrorhizon*, siendo éste el primer caso de producción comercial de un metabolito secundario vegetal mediante cultivo de células.

#### FERMENTACIONES EN ALIMENTOS

Mientras que las fermentaciones alimentarias industriales modernas se desarrollaban a partir de procesos de fermentación tradicionales, las fermentaciones alimentarias por sí mismas también continuaban su avance tecnológico. Procesos tales como la fabricación de pan, queso y cerveza así como la de bebidas alcohólicas, se han desarrollado hasta satisfacer las exigencias comerciales modernas de producción a gran escala, calidad constante y elevada, costos competitivos y variedad de productos. Las preparaciones normalizadas de levaduras de panadería y cultivos «starter» para productos lácteos y el empleo de enzimas industriales han mejorado la eficacia así como la automatización y control de calidad de los modernos procesos de fabricación de pan y de fermentación de la leche.

La fermentación de la masa de pan se acelera mediante el empleo de una mayor proporción de levaduras a temperaturas más elevadas. El uso de amilasas microbianas libera azúcares fermentables a partir de los granos de almidón,

proporcionando así azúcares a las levaduras para que fermenten liberando burbujas de CO<sub>2</sub>, lo que eleva la masa y da al pan su textura característica. Las proteasas microbianas se utilizan frecuentemente para hidrolizar parcialmente las proteínas del gluten del trigo, facilitando así la manejabilidad de la masa, incrementando el volumen de la hogaza y mejorando su forma.

El empleo de cultivos «starter» en la elaboración del queso es uno de los factores que han contribuido al desarrollo de una gran variedad de quesos de alta calidad. La elaboración del queso ya no se basa en la infección espontánea de la leche, al perfeccionarse el proceso mediante el empleo de microorganismos cultivados y otros auxiliares tecnológicos combinados con un moderno equipo de manejo de la leche. No obstante, pueden presentarse graves problemas de infección de los cultivos por bacteriófagos, que pueden evitarse mediante el empleo de cultivos mixtos, rotación de las cepas «starter» no asociadas con fagos y el uso de inhibidores de fagos. A partir de los primeros años de la década de los ochenta se han desarrollado con éxito cepas insensibles a los bacteriófagos.

Desde los tiempos de Pasteur se han producido muchos avances en la industria de las bebidas alcohólicas. La pasteurización ha permitido que la cerveza haya pasado de una escala de producción local a nacional e internacional. Las industrias cerveceras y de fabricación de vinos y licores han pasado rápidamente de ser unidades artesanales a grandes complejos cuyo objetivo es el mantener un producto de características uniformes aún cuando las materias primas, la planta y la escala de operación estén cambiando continuamente. Para conseguir un producto reproducible, el proceso de fermentación se ha normalizado mediante el control de parámetros tales como la velocidad de inoculación, la viabilidad y condiciones de almacenamiento de las levaduras, las concentraciones de oxígeno disuelto, los contenidos de nitrógeno soluble y de azúcares fermentables del mosto y la temperatura del proceso. Se han llevado a cabo innovaciones como el uso de procesos de fermentación continuos, la obtención de cerveza con concentraciones de mosto elevadas, el empleo de cereales no maltados y enzimas microbianos y la producción de cervezas bajas en carbohidratos, obteniéndose diversos niveles de éxito. También se han aplicado las técnicas genéticas convencionales para mejorar las propiedades deseables de las levaduras y eliminar sus características indeseables.

#### LEVADURAS DE PANADERIA Y PROTEINAS DE ORGANISMOS UNICELULARES

En el siglo XVII, los panaderos obtenían sus levaduras de las fábricas de cerveza locales, aunque, debido a su sabor amargo y a las actividades de fermentación variables, estas levaduras fueron substituyéndose gradualmente por las procedentes de las industrias de elaboración de bebidas alcohólicas, que a

su vez lo fueron por las de panadería. Las primeras levaduras prensadas de panadería se obtuvieron aproximadamente en 1781 utilizando un proceso denominado «Holandés», y posteriormente en 1846 mediante el proceso denominado de «Viena». Ambos procesos obtenían unos rendimientos de levadura bajos, del 5 % y 14 % respectivamente, referido a las materias primas, y aproximadamente un 30 % de alcohol. Entre 1879 y 1919 se consiguieron avances substanciales en las fermentaciones industriales de biomasa de levadura que condujeron a la producción industrial de levaduras de panadería de forma independiente a la de las bebidas alcohólicas. En 1879, Marquardt introdujo la aireación de la pasta de cereales, lo que aumentaba el rendimiento y disminuía la producción concomitante de alcohol al 20 %. Las mejoras posteriores como el aporte gradual del azúcar, primer ejemplo de los procesos de fermentación con retroalimentación, elevaban la eficacia hasta situarla en un valor próximo al del máximo teórico y sin la formación concomitante de alcohol.

En Alemania, durante la Primera Guerra Mundial, las levaduras de panadería, hechas crecer en melazas, se producían como suplemento proteico para el consumo humano, siendo éste el primer proceso de fermentación moderno destinado a la producción de proteínas de organismos unicelulares. Posteriormente, también en Alemania, durante la Segunda Guerra Mundial, se empleó *Candida utilis*, cultivada en caldos de desecho procedentes de la manufactura de papel y pulpa al sulfito y en derivados de azúcares obtenidos por hidrólisis ácida de la madera, como fuente proteica para alimentación humana y animal. Este proceso se ha utilizado en USA, Suiza, Taiwán y Rusia. A partir de 1968 diversas compañías de Europa, USA y Japón han construido plantas destinadas a la producción de proteínas de organismos unicelulares, algunas de ellas ya cerradas por los problemas de regulación o los elevados costos mientras que otras continúan sus programas de desarrollo. Por ejemplo, en 1981, ICI en Inglaterra, aumentó la escala de producción usando la bacteria aerobia *Methylophilus methylotrophus* hasta producir 3.000 Tm/mes de «Pruteen», un producto destinado a la alimentación animal. La primera proteína microbiana nueva producida por fermentación y aprobada por el gobierno inglés para consumo humano, la «Micoproteína», se produce a partir del hongo *Fusarium graminearum* por la compañía Rank Hovis McDougall, en Inglaterra. Su morfología filamentosa confiere a la «Micoproteína» una textura natural similar a la de la carne, permitiendo que el producto se venda a un precio de mercado remunerador y que logre la aceptación por parte de los consumidores.

PRODUCTOS QUIMICOS Y ADITIVOS ALIMENTARIOS

### Acidos orgánicos

La producción comercial de ácido láctico por fermentación se inició en 1881 y aún hoy el 50 % del ácido láctico utilizado a nivel industrial se produce por este método usando *Lactobacillus delbrückii*.

El ácido cítrico se produjo inicialmente por extracción del zumo de limón y posteriormente fue sintetizado a partir de glicerol y otros compuestos químicos. En 1923 se obtuvo citrato mediante fermentación industrial y diez años después, la producción mundial anual sobrepasaba las 10.000 Tm, de las cuales más del 80 % se obtenían por fermentación. Actualmente se estima que el mercado anual es de más de 350.000 Tm, producidas exclusivamente por fermentación. Inicialmente, se emplearon métodos de cultivo en superficie con *Aspergillus niger* como organismo productor. Después de la Segunda Guerra Mundial se introdujo un proceso que utilizaba *A. niger* sumergido y hacia 1977 se comercializó otro proceso sumergido que empleaba *Candida*, más eficaz.

Otros ácidos orgánicos manufacturados de forma económicamente rentable por fermentación son el ácido glucónico y el itacónico. El ácido acético para uso alimentario (vinagre) se obtiene exclusivamente por oxidación del etanol mediante *Acetobacter aceti*, en tanto que el ácido acético industrial se manufactura únicamente por métodos químicos.

### Alcoholes y cetonas

Durante la Primera Guerra Mundial el suministro de aceites vegetales importados utilizados para la producción de glicerol se cerró para Alemania, que rápidamente diseñó un proceso de fermentación para producir glicerol, usado en la fabricación de explosivos, basado en el descubrimiento de Neuberg de que este compuesto era producido por las levaduras a expensas del etanol, en presencia de bisulfito sódico. Durante la guerra los ingleses satisficieron sus necesidades de acetona por el desarrollo de un proceso de fermentación acetona-butanol anaerobio con *Clostridium acetobutylicum*, siendo el primer proceso de fermentación a gran escala que necesitaba métodos de cultivo puro para prevenir la contaminación. Después de la Primera Guerra Mundial la demanda de acetona disminuyó pero la de *n*-butanol aumentó, por lo que este producto continuó produciéndose por fermentación hasta los años cincuenta en los que el precio de los derivados del petróleo cayó por debajo del precio del almidón y de los substratos a base de azúcar. La fermentación acetona-butanol operó comercialmente hasta hace muy poco tiempo, en una planta de la National Chemical Products, de Sudáfrica, debido a la escasez de petróleo originado por los embargos internacionales.

El alcohol industrial producido químicamente fue utilizado extensamente en USA a partir del año 1800. La industria de la fermentación alcohólica se inició una vez revocada la prohibición, y en 1941 acaparaba el 77 % del mercado del alcohol industrial. Durante los años cincuenta y sesenta, el etileno era barato, por lo que se diseñaron procesos de hidratación eficaces para su conversión en etanol que hicieron que la producción de etanol sintético fuera más competitiva económicamente que los métodos de fermentación. En 1973 la crisis del petróleo, con el consiguiente incremento de los precios hizo que el mundo entero se interesase por combustibles renovables alternativos. Por ejemplo, Brasil se embarcó en un programa nacional sobre el alcohol que apuntaba hacia el desarrollo de la capacidad de fermentación que produjese en 1987 tres billones de galones de etanol anuales a partir de caña de azúcar. El gobierno federal de USA alentó el desarrollo de la producción de alcohol a partir de la fermentación del maíz mediante el Gasohol Program, reduciendo los impuestos del «gasohol» (gasolina con un 10 % de alcohol), por lo que se establecieron un número considerable de plantas de fermentación de pequeña y gran escala que producían alcohol mediante procesos de fermentación continuos y discontinuos; el objetivo de este programa era conseguir un volumen de producción anual de 1,8 billones de galones a mitades de los ochenta. También se obtiene etanol por la fermentación del suero de leche con *Kluyveromyces fragilis*, aunque el volumen de producción obtenido por este procedimiento es minúsculo comparado con el producido por *S. cerevisiae* a partir de maíz o caña de azúcar. La fermentación del lactosuero (que solo tiene aproximadamente un 5 % de lactosa en peso/volumen) debe llevarse a cabo en lugares próximos a las fábricas de quesos, puesto que si no los costos de transporte serían prohibitivos.

Actualmente solo un pequeño número de productos químicos de gran volumen de consumo se obtienen por fermentación, ya que prácticamente todos ellos se manufacturan a partir del petróleo y del gas natural. Las fluctuaciones del costo y el incierto suministro de petróleo, así como la inquietud frente al agotamiento definitivo de las fuentes no renovables han intensificado el interés del empleo de recursos no petrolíferos para la producción de energía y de compuestos químicos.

### Aminoácidos

Durante los últimos treinta años, la producción de aminoácidos mediante procesos de fermentación aerobia ha experimentado una rápida expansión. El glutamato monosódico y la lisina son los que se producen en cantidades mayores, con niveles de producción mundial anuales de 370.000 Tm y 40.000 Tm, respectivamente. Los procesos de fermentación son el resultado de un elegante trabajo de investigación acerca de los mecanismos bioquímicos que regulan la bio-

síntesis de aminoácidos por los microorganismos, consiguiendo la superproducción de aminoácidos mediante una combinación de mutaciones y del control de los procesos de fermentación. Las técnicas empleadas intentan estimular a las células para que ingiera nuevos materiales, previniendo o impidiendo las reacciones laterales, así como inducir y activar a los enzimas biosintéticos y reducir o inhibir la actividad enzimática que podría degradar el producto, y finalmente facilitar la excreción del aminoácido. Las investigaciones clásicas utilizadas por el desarrollo de la fermentación del ácido glutámico han dado un ímpetu significativo a los procesos de fermentación para la producción de otros metabolitos primarios, de forma que actualmente la mayoría de los aminoácidos se producen comercialmente mediante estos procesos. Se han aplicado técnicas similares a la producción de monofosfatos de inosina y guanosina, potenciadores del sabor.

### Biopolímeros

En los últimos años se han diseñado un gran número de fermentaciones industriales destinadas a la producción de biopolímeros microbianos. La mayoría de los polímeros son sintéticos y por tanto son sensibles a las fluctuaciones del precio del petróleo, de forma que los biopolímeros pueden ser especialmente importantes cuando se eleve el precio del crudo.

El biopolímero más importante en función del volumen de su producción es la goma xantano, utilizada como gelificante o estabilizante de suspensiones, producida por fermentación aerobia de la bacteria *Xanthomonas campestris*. Existen otras gomas microbianas de interés comercial que se obtienen a partir de *Azotobacter vinelandii* (alginato), *Aureobasidium pullulans* (pululano), *Sclerotium* (escleroglucano) y *Pseudomonas elodea* (gelano). Los elevados pesos moleculares y viscosidades de los polisacáridos extracelulares plantean problemas en los procesos de mezclado y transferencia de masa y calor existentes en un fermentador, por lo que deben ser tenidos en cuenta a la hora de diseñar un aparato óptimo para estos procesos.

Un polímero muy prometedor que está siendo desarrollado actualmente es el polihidroxibutirato, poliéster termoplástico que se puede acumular intracelularmente en algunos tipos de *Alcaligenes entrophus* hasta un nivel del 70 % en peso de biomasa. Este producto podría permitir el empleo de plásticos biodegradables en lugar de los plásticos obtenidos a partir del petróleo, no biodegradables.

### Vitaminas

En la actualidad la mayoría de las vitaminas se producen por métodos químicos. Aunque se han descrito métodos de fermentación para un gran número de vitaminas del grupo B, como la tiamina, biotina, ácido fólico, ácido pantoté-

nico, piridoxamina, vitamina B<sub>12</sub> y riboflavina, únicamente las dos últimas se obtienen mediante métodos biológicos. La síntesis química de la vitamina B<sub>12</sub> es extremadamente complicada por lo que sólo se obtiene comercialmente mediante fermentación industrial con *Pseudomonas*. En la producción de riboflavina los procesos de fermentación compiten eficazmente con los métodos de síntesis o de semisíntesis química, de forma que la tercera parte del volumen de producción de esta vitamina se obtiene por fermentación. En 1935, se utilizó primeramente *Eremothecium ashbyii* para obtener la vitamina, consiguiéndose unos rendimientos que fueron incrementándose gradualmente hasta alcanzar los 5,3 g/l, aunque debido a la inestabilidad de la cepa, posteriormente se prefirieron otras especies, como *Ascomycetes* y *Ashbya gossypii*. Una patente reciente (1984) describe una cepa recombinante de *Bacillus subtilis* capaz de producir 4,5 g de riboflavina en 24 h de fermentación, período muy inferior al necesario con los *Ascomycetes*, que se aproxima a los 5 días.

#### *Insecticidas microbianos*

Los insecticidas químicos, empleados con gran éxito en agricultura y para favorecer la salud pública, han sido ampliamente utilizados este siglo. Sin embargo, las críticas acerca de que pueden matar organismos distintos al blanco o de que los organismos blanco pueden volverse resistentes a ellos han conducido al desarrollo y comercialización de insecticidas microbianos, de forma que la investigación es continua en este campo. La producción de *Bacillus thuringiensis* supera con mucho la de cualquier otro insecticida microbiano producido comercialmente. Las condiciones de fermentación se diseñan de tal modo que se alcance un rendimiento y una bioactividad de la endotoxina, producida de forma concomitante con la esporulación, máximos. Las distintas cepas de *B. thuringiensis* y de otros organismos capaces de sintetizar insecticidas bacterianos y fúngicos manifiestan toxicidades diversas. Los genes de la toxina de *Bacillus thuringiensis* han sido clonados en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, mejorando potencialmente las velocidades de producción y alterando su espectro de eficacia.

#### *Giberelinas*

Las giberelinas, diterpenoides que tienen cuatro anillos de carbono, se aplican para la aceleración de la germinación de la cebada en la producción de malta. La primera giberelina fue descubierta en 1938 y en la actualidad se conocen sesenta compuestos distintos. El ácido giberélico se produjo inicialmente mediante cultivo en superficie en una fermentación prolongada, consiguiéndose rendimientos de 40-60 mg/l de producto. Hoy en día las fermentaciones comerciales por cultivos sumergidos producen rendimientos significativamente mayores.

#### ENZIMAS MICROBIANOS

La explotación comercial de enzimas microbianos aislados fue iniciada por Jokichi Takamine, un japonés que emigró a USA, y que en 1894 patentó un método para la preparación de enzimas diastásicos a partir de mohos, comercializados con el nombre de Takadiastasa. Este método, que implica el crecimiento de los mohos en la superficie de un substrato sólido, como trigo o salvado, era reflejo indudablemente de los procesos similares de preparación de alimentos orientales fermentados. El desarrollo de fermentaciones de enzimas industriales bacterianas fue iniciado por Boidin y Efront, en Francia y Alemania, respectivamente, quienes en 1917 patentaron el empleo de *Bacillus subtilis* y *Bacillus mesentericus* para obtener amilasas y diastasas también mediante técnicas de cultivo en superficie. Los métodos de cultivo en superficie para la producción de enzimas fúngicos se utilizaron en USA hacia los años cincuenta y aún hoy continúan empleándose, especialmente en Japón. Las fermentaciones fúngicas sumergidas se emplearon en USA y Europa para la producción de enzimas basándose en la experiencia conseguida con las fermentaciones sumergidas en el desarrollo del proceso de producción de *Penicillium*, en los Northern Regional Research Laboratories (NRRL) de USA.

La introducción de enzimas microbianos industriales en el mercado estableció el fundamento de la tecnología para la aplicación de enzimas, particularmente en áreas del procesado de alimentos como la producción de cerveza y zumos de frutas y la manufactura de hidrolizados de almidón. En los años sesenta el mercado de los enzimas industriales se expandió dramáticamente al incluirse proteasas alcalinas en los detergentes en polvo. La producción y empleo de glucosa isomerasa microbiana para la manufactura de jarabes de maíz ricos en fructosa representó un hito muy importante en esta década, produciéndose un gran impacto en el mercado de edulcorantes calóricos, dominado hasta entonces por la sacarosa. En USA, la industria destinada a la elaboración de bebidas era el usuario industrial más importante de azúcar, pero hacia 1984 las principales compañías de fabricación de bebidas no alcohólicas habían llevado a cabo la sustitución total de la sacarosa por los jarabes de maíz ricos en fructosa. Otro desarrollo técnico significativo de los años setenta consistió en la comercialización de  $\alpha$ -amilasa estable a temperaturas elevadas obtenida a partir de *Bacillus licheniformis*. La capacidad de este enzima para licuar el almidón a temperaturas de hasta 110 °C no sólo ha hecho más eficaz el proceso de hidrólisis del almidón sino que también ha impulsado el aislamiento o modificación de otros enzimas con estabilidad elevada.

## PRODUCTOS DE USO MEDICO

*Antibióticos*

Durante cincuenta años, siguiendo la sugerencia de Pasteur de que los efectos antagonistas de unos microorganismos frente a otros podían tener potenciales efectos terapéuticos, se probaron como medicina sin éxito diversas preparaciones microbianas. Finalmente, en el año 1928, Alexander Fleming observó que el *Penicillium notatum*, contaminante de los cultivos de *Staphylococcus aureus*, mataba las bacterias, demostrando que el ingrediente activo, denominado penicilina, podía inhibir otras muchas bacterias. Una vez aislada la penicilina en una forma activa estable por Florey y Chain en 1940, se demostró su destacada actividad antibacteriana y se desarrolló en USA un proceso de fermentación comercial con el apoyo del NRRL (Northern Regional Research Laboratories) y la colaboración de varias compañías farmacéuticas americanas.

El desarrollo con éxito de la obtención por fermentación de la penicilina marcó el inicio de la industria de los antibióticos. Muy pronto se aislaron muchos nuevos antibióticos, como la estreptomina, a partir de especies de *Streptomyces* y se descubrieron las cefalosporinas, producidas por *Cephalosporium acremonium*. Las penicilinas, cefalosporinas y estreptominas fueron los primeros antibióticos más importantes descubiertos, aunque desde los años cuarenta hasta nuestros días se aíslan anualmente cientos de nuevos antibióticos.

El desarrollo del proceso de fermentación de la penicilina también ha dado lugar a avances generales claves en la fermentación industrial, marcando el comienzo de los procesos eficaces de fermentación fúngica sumergida. La edad de oro de la genética microbiana clásica, que implicaba técnicas de mutación y selección, iniciada aproximadamente en el año 1940, ha permitido incrementar, por ejemplo, los rendimientos de penicilina desde unos pocos mg por litro hasta 20 g/l de cultivo. También se iniciaron estudios sobre la naturaleza del complejo proceso metabólico implicado en la producción de metabolitos secundarios, moléculas pequeñas, como los antibióticos, que no tienen un papel obvio en el crecimiento y mantenimiento de la célula.

Inicialmente se obtuvieron penicilinas modificadas (semisintéticas), con actividad o sensibilidad frente a la inactivación por ácidos o enzimas alterada por transformación química de la penicilina natural; posteriormente, algunas de las etapas de semisíntesis fueron llevadas a cabo por conversiones biológicas.

*Transformaciones de esteroides*

El empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones enzimáticas altamente selectivas y específicas de productos farmacéuticos representó un avance decisivo en el desarrollo de medicamentos con hormonas esteroides.

En los años cuarenta se estableció que la cortisona, esteroide secretado por la glándula adrenal, aliviaba el dolor de los pacientes con artritis reumatoide, por lo que se diseñó un procedimiento de síntesis química que requería 37 etapas para la producción de cortisona, a un costo de 200\$ el gramo. En 1952, los científicos de Upohn Company descubrieron una cepa de *Rhizopus arrhizus* que hidroxilaba la progesterona, produciendo 11- $\alpha$ -hidroxiprogesterona, lo que permitió que el procedimiento de síntesis de cortisona pasase de 37 a 11 etapas y se redujese su costo a 16\$/g. A lo largo de los años se han introducido mejoras constantes en el proceso, que han ido disminuyendo progresivamente los costos de producción de forma que en 1980 éste era de sólo 0,46\$/g.

Se han aplicado técnicas de biotransformación microbiana similares para la síntesis de otros esteroides, particularmente aldosterona, prednisona y prednisolona. Las técnicas son también importantes para la síntesis de otros compuestos químicos, tanto farmacéuticos como sin aplicaciones médicas.

*Vacunas*

Existen referencias acerca de las enfermedades infecciosas en algunos antiguos escritos hindúes y evidencias arqueológicas de lesiones tuberculosas en las momias de las primeras tumbas egipcias.

La capacidad de conferir resistencia a la enfermedad mediante vacunación fue descrita en primer lugar por Jenner, en 1798, quien observó que los individuos inoculados con viruela vacuna o «vaccinia» eran inmunes a la viruela.

El empleo de vacunas, así como la inmunología, comenzaron hacia 1877, cuando Pasteur dirigió su atención a las causas y forma de prevenir las enfermedades infecciosas del hombre y los animales. En 1890 Behring y Kitasato inmunizaron animales con toxinas inactivas de difteria y tétanos, seguidamente Koch aisló el *Vibrio cholerae* y la primera vacuna del cólera fue administrada en 1894 por Ferran y Clua, médico español, mediante inyección subcutánea de caldos de cultivo vivos a más de 30.000 españoles. Durante la primera Guerra Mundial los ejércitos fueron sometidos a programas de vacunación contra el tifus y en la segunda Guerra Mundial se introdujo un programa similar contra el tétanos. A finales de los años treinta comenzó la vacunación masiva contra la difteria. El uso extendido de las vacunas contra la tosferina y la poliomielitis da cuenta del éxito obtenido en los ensayos realizados en 1955 con estas vacunas. Hacia 1936 Calmette y Guérin observaron que el cultivo en serie de bacilos tuberculosos infecciosos o virulentos en un medio artificial durante largos períodos atenuaba su actividad hasta el punto de que ya no eran capaces de causar la enfermedad. Tres años más tarde se introdujo la primera vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guérin) que inmunizaba frente a la tuberculosis. El uso de vacunas atenuadas sufrió un gran revés diez años después, en el llamado de-

sastre de Lübeck, en el que 72 de los 240 niños vacunados con la BCG murieron como resultado del tratamiento con un lote de vacunas que contenían el bacilo de la tuberculosis virulento. Las vacunas bacterianas utilizadas hoy consisten en cepas vivas atenuadas de los organismos productores de enfermedades o de cepas relacionadas estrechamente, cepas patógenas muertas o componentes celulares que contienen antígenos y que son efectivos para inducir la inmunidad frente a las correspondientes enfermedades infecciosas. Aunque la producción de vacunas es una aplicación importante del proceso de fermentación, su escala de manufactura es relativamente pequeña. La tecnología de fermentación utiliza procesos continuos o discontinuos cuyas condiciones deben ser diseñadas con objeto de optimizar la producción celular del material inmunogénico.

La tecnología de las vacunas víricas fue primitiva durante muchos años, debido a la necesidad de emplear animales como fuente de virus. Los embriones de pollo se utilizaron como fuente de virus hasta que, hacia 1950, se desarrollaron las técnicas de cultivo celular. Con estas técnicas, la producción de vacunas víricas entró a formar parte del campo de la fermentación industrial. Las células de mamíferos se cultivan en un medio apropiado y, en una cierta etapa del crecimiento, se inoculan con los virus, que se multiplican en las células huéspedes. Esta técnica permite preparar grandes cantidades de virus mucho menos contaminados por materiales extraños del huésped, bacterias o virus, que estaban presentes en los obtenidos por los métodos antiguos.

### Impacto de las tecnologías de hibridomas y de DNA recombinante

Los recientes e importantes avances en la tecnología de hibridomas y en la ingeniería genética han extendido el alcance y el potencial de la tecnología de las fermentaciones industriales.

#### ANTICUERPOS MONOCLONALES

En 1975, Kohler y Milstein fusionaron un mieloma de ratón (célula de cáncer de piel) con un glóbulo blanco productor de anticuerpos obteniendo una célula híbrida (hibridoma) que combinaba las distintas capacidades de las células padre, la división celular y la producción de anticuerpos; también desarrollaron la tecnología básica para la producción de anticuerpos monoclonales, preparaciones de anticuerpos específicos individuales obtenidos a partir de células producidas por un único antepasado o clon. Los anticuerpos monoclonales tie-

nen una elevada especificidad de unión a receptores individuales, moléculas o superficies y tienen muchas aplicaciones potenciales que aprovechan sus características únicas, particularmente en análisis clínicos y en la terapia para determinadas enfermedades. El mercado de anticuerpos monoclonales ha crecido rápidamente y se espera que alcance el billón de dólares en 1990. La producción de anticuerpos monoclonales se ha llevado a cabo *in vivo* por inyección del clon del hibridoma en el líquido de la cavidad abdominal del animal (usualmente ratones) o *in vitro* en una gran variedad de sistemas de cultivo celular. Estos sistemas permiten conseguir una mayor productividad global por lo que se han diseñado y comercializado una gran variedad de reactores para cultivos celulares.

#### TECNOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE

La ingeniería genética implica la formación de nuevas combinaciones de material genético mediante la inserción de genes extraños, producidos fuera de la célula, a un organismo huésped en el que no existen de forma natural. El primer gen fue clonado en 1973 y desde entonces las técnicas han avanzado tanto que en la actualidad se podrían producir proteínas «extrañas» en cantidades comerciales a partir de una gran variedad de cepas recombinantes de procariontas y eucariotas, incluyendo células de animales y plantas. La industria farmacéutica ha invertido mucho en investigación y desarrollo en este campo, siendo el primer producto que ha conseguido la autorización para su uso terapéutico la insulina humana producida por una cepa recombinante de *E. coli*. También se han preparado otras muchas proteínas mediante esta técnica, entre ellas otras hormonas humanas y varios factores de crecimiento, compuestos antitumorales y antivíricos, y antígenos virales y enzimas. La primera vacuna obtenida mediante ingeniería genética comercializada ha sido una vacuna de uso veterinario introducida en 1986 contra la pseudorabia, un virus tipo herpes que infecta a los cerdos.

Las investigaciones pioneras sobre ingeniería genética y los primeros productos comercializados utilizaron *E. coli* como huésped ya que sus sistemas genéticos eran muy conocidos. Los caballos de batalla de la fermentación industrial, *Bacillus*, *Aspergillus* y *Saccharomyces* pueden ser mejores huéspedes a largo plazo, una vez que sus sistemas genéticos se conozcan con más profundidad. El *E. coli* no secreta en general proteínas, mientras que los *Bacillus* producen rendimientos altos de proteínas extracelulares. Como los procariontas no glicosilan las proteínas, las diferentes especies de *Saccharomyces* y *Aspergillus* pueden ser los huéspedes adecuados para la producción de glicoproteínas animales o humanas. Se sabe que *Aspergillus niger* es capaz de secretar hasta 20 g/l de proteína a partir de un único gen de un enzima extracelular. Algunos productos

farmacéuticos recombinantes se han obtenido mediante *S. cerevisiae*. Sin embargo, los sistemas de secreción y síntesis proteica son significativamente más complejos en estos microorganismos eucariotas que en los procariotas, por lo que tienen que ser investigados más completamente para permitir el uso de estos organismos en los procesos de fermentación, particularmente para la producción de productos recombinantes no farmacéuticos, por ejemplo, enzimas.

Las proteínas y los péptidos, productos de traducción de los genes estructurales, son el primer objetivo obvio de producción mediante la tecnología de ADN recombinante. A largo plazo, podría ser posible la manipulación del metabolismo primario y secundario para mejorar la producción de metabolitos mediante la ingeniería genética de enzimas clave en la secuencia metabólica.

En los siguientes capítulos se describen algunos de los aspectos más específicos de este tema.

## Capítulo 2

# *Biología de los microorganismos de uso industrial*

### Introducción

Los productos comercialmente importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a 4 categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos, aunque los avances recientes en el desarrollo de técnicas de cultivo de células de animales y plantas han permitido introducir células más complejas en los procesos de fermentación. En este capítulo se van a tratar las propiedades de las especies más importantes utilizadas así como los aspectos generales del crecimiento y metabolismo microbianos que son importantes para los procesos industriales de su cultivo.

### Microorganismos industriales

En la naturaleza existen dos clases fundamentales de células, las procariotas y las eucariotas, ambas utilizadas en los procesos de fermentación industrial.

Las células eucariotas tienen un núcleo diferenciado rodeado por una membrana, y su ADN nuclear está asociado a proteínas y se encuentra en estructuras definidas denominadas cromosomas, y además también tienen otras estructuras u orgánulos con funciones bioquímicas o fisiológicas específicas. Por el contrario, las procariotas carecen de un núcleo bien definido, de tal modo que el material genético, en forma de ADN en doble hélice, no está separado de los otros constituyentes de la célula por una membrana; estas células también carecen de otros orgánulos especializados existentes en las eucariotas, como por ejemplo las mitocondrias, y los enzimas asociados a estos orgánulos en los eucariotas se encuentran en el protoplasma y en la membrana plasmática de las procariotas. En la Tabla 2.1 se comparan las propiedades de las células eucariotas y procariotas. En los procesos de fermentación se emplean células bacterianas, que son procariotas, y hongos, levaduras y células animales y vegetales, que son eucariotas.

Los microorganismos también se distinguen en función de sus necesidades de oxígeno, pudiendo dividirse en los aerobios estrictos, como los *Streptomyces* y la mayoría de los hongos filamentosos, que pueden llevar a cabo su metabolismo y crecimiento únicamente en presencia de oxígeno atmosférico, los anaerobios estrictos, como los *Clostridia*, que únicamente pueden crecer en ausencia de oxígeno y los organismos facultativos, entre ellos las levaduras industriales, que pueden crecer en situaciones de aerobiosis y de anaerobiosis.

Las bacterias implicadas en los procesos de fermentación son principalmente quimoorganótrofos, esto es, pueden obtener su energía y su carbono por oxidación de los compuestos orgánicos. En la Tabla 2.2 se muestran algunas de

Tabla 2.1. Características que diferencian a las eucariotas de las procariotas

Característica	Procariotas	Eucariotas
<b>Orgánulos</b>		
Núcleo	-	+
Mitocondria	-	+
Retículo endoplásmico	-	+
<b>Genoma</b>		
No. de moléculas de DNA	1 <sup>1</sup>	>1
DNA en orgánulos	-	+
DNA formando estructuras cromosómicas	-	+

1. Las bacterias pueden contener fragmentos pequeños de DNA (plásmidos) además del genoma principal.

Tabla 2.2. Propiedades del género de bacterias quimo-organotróficas de importancia en las fermentaciones industriales

Género	Propiedades				Ejemplo de especies (productos)
	Reacción Gram	Endosporas	Forma	Aerobias <sup>1</sup>	
<i>Enterobacteria</i>	-	-	Varilla	±	<i>E. coli</i> (proteínas recombinantes)
<i>Pseudomonas</i>	-	-	Varilla	+	<i>P. ovalis</i> (ácido glucónico) <i>P. fluorescens</i> (2-oxogluconato)
<i>Xanthomonas</i>	-	-	Varilla	+	<i>X. campestris</i> (goma xantano)
<i>Acetobacter</i>	-	-	Varilla	+	<i>A. aceti</i> (ácido acético)
<i>Alcaligenes</i>	-	-	Varilla/coco	+	<i>A. faecalis</i> (goma curdlan)
<i>Bacillus</i>	+	+	Varilla	+	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> etc. (enzimas extracelulares) <i>B. coagulans</i> (glucosa isomerasa) <i>B. licheniformis</i> (bacitracina) <i>B. brevis</i> (gramicidina S) <i>B. thuringiensis</i> (insecticida)
<i>Clostridium</i>	+	+	Varilla	-	<i>C. acetobutylicum</i> (acetona, butanol) <i>C. thermocellum</i> (acetato)
<i>Leuconostoc</i>	+	-	Esférica	±	<i>L. mesenteroides</i> (dextrano), <i>L. delbrückii</i> (ácido láctico)
<i>Lactobacillus</i>	+	-	Varilla	- o ±	<i>C. glutamicum</i> (aminoácidos) <i>C. simplex</i> (conversión de esteroide)
<i>Corynebacterium</i>	+	-	Irregular	+	

Tabla 2.2. Continuación

Género	Propiedades				Ejemplo de especies (productos)
	Reacción Gram	Endosporas	Forma	Aerobias <sup>1</sup>	
<i>Mycobacterium</i>	+	-	Filamentos ramificados Sin micelio	+	<i>Mycobacterium</i> spp. (transformación de esteroides)
<i>Nocardia</i>	+	-	Micelio fragmentado	+	<i>N. mediterranei</i> (rifamicinas) <i>Nocardia</i> spp. (transformación de esteroides)
<i>Streptomyces</i>	+	-	Micelio intacto	+	<i>S. erythreus</i> (eritromicina) <i>S. aureofaciens</i> , <i>S. rimosus</i> (tetraciclinas) <i>S. fradiae</i> (glucosa isomerasa) <i>S. roseochromogens</i> (hidroxilación de esteroides)

1. Aerobio: + = aerobio; - = anaerobio; ± = ambos.

las propiedades de los géneros más importantes de estas bacterias, así como algunos ejemplos de especies. Las bacterias se pueden dividir en Gram-positiva o Gram-negativa en función de su respuesta a la coloración de Gram, que afecta a los peptidoglicanos. La envoltura celular de las bacterias Gram-positiva consiste en su mayor parte en una capa de peptidoglicanos, de 15 a 80 nm de espesor, que recubre a una membrana citoplásmica sencilla. En las Gram-negativa, esta capa de peptidoglicano es de sólo 2-3 nm de espesor. Las bacterias Gram-negativa tienen dos membranas, la externa y la citoplásmica, separadas por el espacio periplásmico. En la Figura 2.1 se muestran estos dos tipos de estructuras. Algunos procariontes, por ejemplo, los *Streptomyces* productores de antibióticos, tienen filamentos o micelios.

La reproducción de las bacterias tiene lugar por división celular asexual según se muestra esquemáticamente en la Figura 2.2 para el *E. coli*. El único cromosoma de ADN circular se replica y en el centro de la célula aparece una mem-

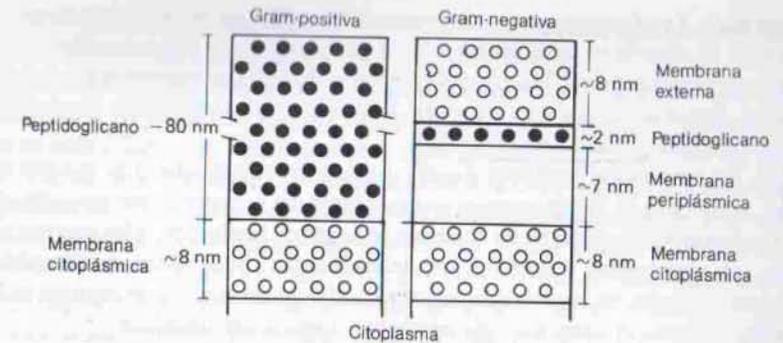


Fig. 2.1. Comparación esquemática entre la composición de las envolturas celulares de las bacterias Gram-positiva y Gram-negativa.

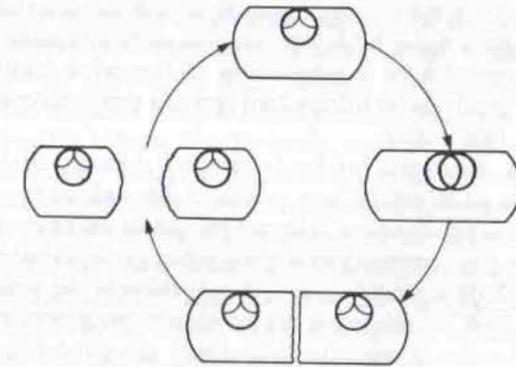


Fig. 2.2. División asexual del *Escherichia coli*.

brana o septo que separa el cromosoma nuevo del viejo; después el septo se transforma en pared y las células se separan. Las esporas se producen por las bacterias formadoras de esporas usualmente en respuesta a condiciones adversas del medio, ya que éstas son más resistentes al calor y a los compuestos tóxicos que las células vegetativas, y cuando pasan a un medio apropiado germinan dando lugar a células vegetativas.

Los hongos también son quimioorganótrofos con hifas filamentosas rígidas y ramificadas cuyo diámetro está comprendido usualmente entre 2 y 18 nm. Los hongos superiores tienen típicamente paredes transversales o septos a intervalos dados a lo largo de la hifa, aunque en los hongos inferiores esta característica

está ausente. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican principalmente en dos grupos, los Zygomycotina, aseptados, como los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, y los Deuteromycotina, septados, o Fungi Imperfecti, por ejemplo los *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* y *Fusarium* (Fig. 2.3).

Los Zygomycotina producen micelios vegetativos haploides. Las esporas asexuales se forman en el esporangio, aunque también se reproducen sexualmente. Los Deuteromycotina producen micelios vegetativos haploides, y las esporas asexuales son usualmente inducidas por determinadas condiciones medioambientales; por ejemplo, en *Aspergillus niger* se activa la formación de esporas en los conidios cuando el contenido de nitrógeno llega a ser limitante.

En los Zygomycotina los principales constituyentes de las paredes celulares son el quitosano y la quitina, en tanto que en los Deuteromycotina predominan el glucano y la quitina. El crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos implica la extensión hifal, y tiene lugar en el extremo de las hifas, y también se produce la ramificación con el desarrollo de nuevas zonas de extensión, de forma que la longitud de las hifas y la cantidad de ramificaciones depende del medio de crecimiento. En los fermentadores las fuerzas de cizalla pueden ocasionar la fragmentación de las hifas y dar lugar a la producción de micelios más cortos altamente ramificados.

En los hongos, el extremo hifal es la principal área de actividad protoplásmica (Fig. 2.4). La pared celular que recubre el plasmalema tiene solamente 50 nm de espesor en la región apical, aunque por detrás del extremo puede alcanzar hasta 125 nm y el compartimento protoplásmico se va volviendo gradualmente más vacuolado a medida que está más distante del ápice.

Las levaduras son microhongos que se encuentran generalmente en forma de células únicas y que se reproducen mediante gemación (Fig. 2.5). Algunas levaduras están formadas únicamente por células individuales y a veces cadenas cortas, mientras que otras se encuentran con un cierto rango de formas celulares, incluyendo diversos tipos de filamentos. Una característica de la población en crecimiento de las células de levaduras es la presencia de yemas, producidas cuando la célula se divide. La célula hija comienza siendo una pequeña yema, que va creciendo hasta que alcanza un tamaño similar al de la madre y entonces se separa. En las levaduras, la envoltura celular incluye la membrana citoplásmica, constituida por lípidos, proteínas y mananos, el espacio periplásmico y la pared celular, que contiene algunas proteínas y gran cantidad de glucano y manano.

La levadura más utilizada en las fermentaciones industriales es *Saccharomyces cerevisiae*, sobre todo en la producción de alcohol y en panadería; esta levadura no degrada la lactosa, por lo que para producir alcohol o biomasa a partir de suero de leche se utiliza *Kluyveromyces lactis*, que contiene los enzimas neces-

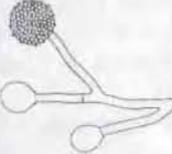
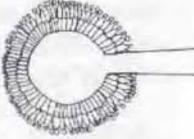
rios para transportar y degradar la lactosa. Otras levaduras importantes industrialmente son *Candida utilis* y *Endomycopsis fibuliger*.

Las células de los mamíferos son generalmente más complejas que las de los hongos o las levaduras, y, como normalmente se encuentran en medios isotónicos controlados, no tienen paredes celulares exteriores resistentes. La superficie externa de la membrana plasmática tiene una capa o glicocalix consistente en cadenas de oligosacáridos cortos unidas a lípidos y proteínas de la membrana intrínseca y a algunas proteínas adsorbidas. En los tejidos distintos de los reproductivos, las células son diploides y se dividen aproximadamente cada 24 horas. Según el tipo, las células animales pueden crecer en cultivos en forma de monocapas unidas a superficies (dependientes del soporte) o como células suspendidas (independientes del soporte) en medios agitados suavemente mediante giro lento. Las necesidades nutritivas de las células de los mamíferos son muy complejas, y además son muy sensibles a las fluctuaciones de parámetros como la temperatura, el pH, el oxígeno y el CO<sub>2</sub> disueltos.

Las líneas celulares preparadas directamente a partir de tejidos animales generalmente no sobreviven, aunque esto puede no ser así. Usualmente también exhiben inhibición por contacto, es decir, detienen su crecimiento cuando se tocan entre ellas. Sin embargo, después de pasajes repetidos, algunas líneas celulares primarias pueden haberse transformado, es decir, pueden multiplicarse y crecer más rápidamente y a mayores densidades que las células primarias, pueden cultivarse indefinidamente y perder la propiedad de inhibición por contacto. Las líneas de células tumorales se transforman fácilmente.

Las células de hibridomas se construyen fusionando una célula de mieloma con una célula productora de anticuerpos, de forma que las células híbridas tienen las características de las células transformadas y a la vez son capaces de sintetizar un único anticuerpo, denominado anticuerpo monoclonal. Estas células se utilizan en cultivos celulares o se implantan en el peritoneo de animales para producir anticuerpos monoclonales.

Muchos tipos de células vegetales pueden crecer en un medio sólido o en suspensión mediante técnicas similares a las empleadas para el cultivo de células animales. Además de las necesidades del medio, que suele ser complejo e incluir extractos de plantas y auxinas, también deben añadirse carbohidratos, puesto que en las células cultivadas la fotosíntesis no es tan eficaz como en la planta entera. Los tejidos vegetales crecen en un medio sólido como un callo formado por una mezcla de células parenquimatosas. Mediante el subcultivo repetido, las células tienden a crecer más rápidamente, necesitan un medio menos complejo, pueden cambiar su número de cromosomas y son menos capaces de diferenciarse. El cultivo en suspensión es el método de cultivo de células vegetales más utilizado, y su principal ventaja es que puede conseguirse un medio homogéneo a lo largo del reactor.

Clasificación	Micelio	Esporas	Género	Forma física	Propiedades de la colonia
<p>Zygomycotina (Orden: Mucorales)</p>	<p>Capa acopiada algodonosa o envolvente afeitada de micelio</p>	<p>Esporas asexuales formadas en el esporangio</p>	<p><i>Mucor</i></p>		<p>Los <i>M. michei</i> y <i>M. pusillus</i> producen colonias grises</p>
<p>Deuteromycotina (Orden: Moniales)</p>	<p>Hongo filamentososo septado formando micelios sueltos en substratos sólidos o líquidos. Los <i>Trichoderma</i>, <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> tienen un micelio ligeramente coloreado. Los <i>Aureobasidium</i> tienen un micelio oscuro. Los <i>Phanerochaete</i> tienen micelios claros u oscuros</p>	<p>Esporas asexuales, reproducción sexual rara o desconocida</p>	<p><i>Rhizopus</i></p>		<p>Crecen con extrema rapidez rellenando las placas de Petri con masas de micelio de aspecto algodonoso</p>
			<p><i>Trichoderma</i></p>		<p>La mayoría de las especies forman colonias que se extienden rápidamente formando una especie de capa delgada de micelio con manchas conidiales verdes</p>
			<p><i>Aspergillus</i></p>		<p>Las colonias se extienden rápidamente y los micelios, blancos al principio, desmenuzan frecuentemente formando una especie de zona de color amarillo claro y producen cabezas conidiales marrones obscuras o negras. Las colonias de <i>A. oryzae</i> son amarillentas o marrón verdosas</p>

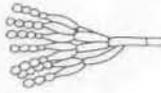
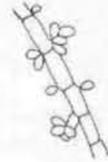
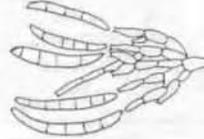
<p><i>Penicillium</i></p>		<p><i>P. chrysogenum</i>: Colonias ampliamente distribuidas, azul-verdosas hasta verde claro con extensos micelios blancos durante el periodo de crecimiento. Usualmente se vuelven grises o marrones púrpura con la edad con el sobrecrecimiento de hifas blancas o rosadas. El reverso es amarillo</p>
<p><i>Aureobasidium</i></p>		<p><i>A. pullulans</i>: De color rosa, las hifas marrones se oscurecen con la edad</p>
<p><i>Fusarium</i></p>		<p><i>F. graminearum</i>: Colonias gris-rosadas o rojas que se vuelven rojo obscuras con sectores grises amarillentos o blancos</p>

Fig. 2.3. Características de los hongos importantes en fermentaciones industriales.

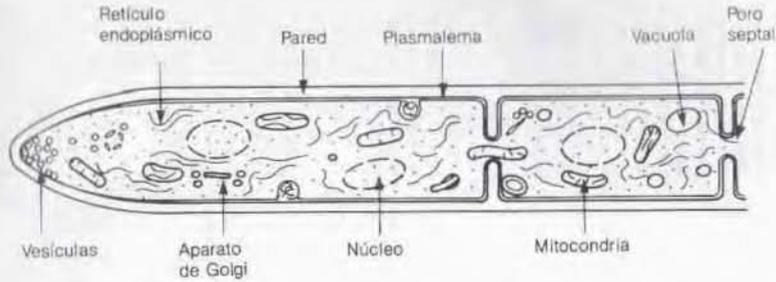


Fig. 2.4. Representación de una hifa fúngica (reproducido con permiso de Deacon, 1984).

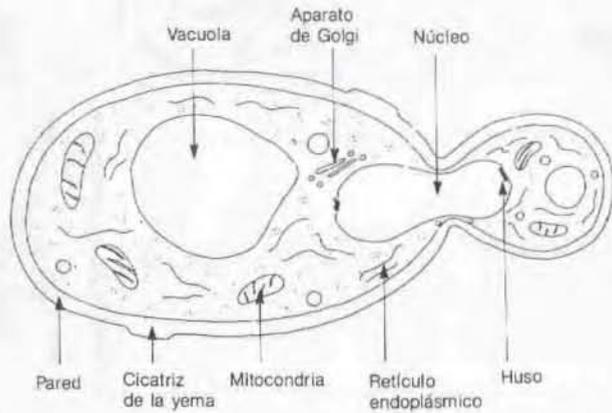


Fig. 2.5. Representación del proceso de gemación de una levadura (reproducido con permiso de Deacon, 1984).

Los virus son agentes submicroscópicos que infectan a las plantas, a los animales y a las bacterias, y tienen genomas formados por ADN o ARN rodeados por una capa proteica, de subunidades idénticas, que a veces está recubierta por una membrana exterior lipoproteica. No tienen citoplasma o membrana citoplásmica y se replican dentro de células huéspedes específicas mediante los sistemas biosintéticos de la propia célula puestos bajo la dirección del genoma vírico. Las vacunas víricas se obtienen por infección de células huéspedes cultivadas. Los virus bacterianos (bacteriófagos) infectan los procesos de fermentación de cepas microbianas y causan serios problemas, particularmente en los cultivos «starter» utilizados en la fabricación del queso.

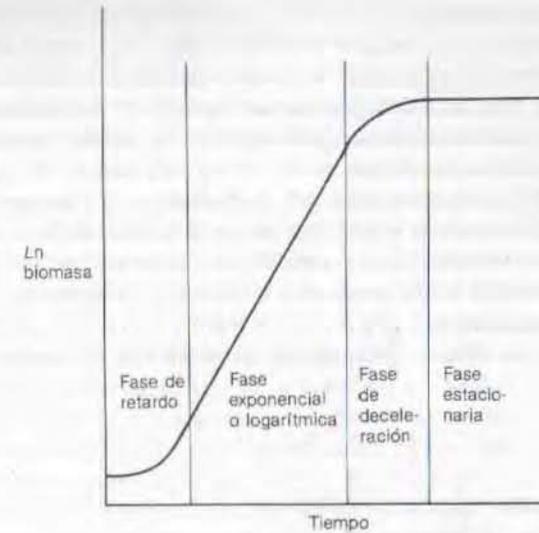


Fig. 2.6. Crecimiento de un microorganismo en un cultivo discontinuo.

### Crecimiento celular

El crecimiento de los microorganismos es una parte integral de casi todos los procesos de fermentación. Ya hemos visto que las bacterias se reproducen por fusión binaria produciendo dos células hijas del mismo tamaño, mientras que la duplicación de muchas levaduras se produce normalmente por mecanismos de gemación; los hongos crecen por extensión de las hifas y la morfología de su micelio puede variar en función del medio ambiente. Cuando un hongo crece en la superficie de un medio sólido produce una red miceliana, cuya naturaleza refleja la composición del medio. En los cultivos sumergidos, las células fúngicas pueden crecer unidas a partículas de nutriente suspendidas en forma de micelios filamentosos difusos o como masas densas. La morfología del crecimiento influye invariablemente en la velocidad de crecimiento y en la formación de productos. Debido a las limitaciones de difusión de nutrientes y productos dentro de las masas fúngicas, el crecimiento y el metabolismo se producen predominantemente en la periferia de éstas.

Cuando un organismo se inocula en un volumen de medio dado, el cultivo pasa por una serie de fases, según se ve en la Figura 2.6. Después de la inoculación, existe una fase de latencia, en la que el organismo se adapta a las condiciones del medio; tras un cierto período de tiempo en el que la velocidad de crecimiento de las células aumenta gradualmente, las células crecen a una velocidad constante máxima; esta fase se denomina exponencial o logarítmica. A medida que el crecimiento continúa, los nutrientes se van agotando y los productos van siendo excretados por el organismo, la velocidad de crecimiento disminuye y finalmente el crecimiento cesa, debido frecuentemente al agotamiento de un nutriente esencial o a la acumulación de algún producto tóxico; esta fase se denomina estacionaria.

El crecimiento se mide en función del incremento de la masa celular según la ecuación:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - \alpha x \quad (1)$$

donde  $x$  = concentración celular ( $\text{mg cm}^{-3}$ )

$t$  = tiempo de incubación (h)

$\mu$  = velocidad de crecimiento específico ( $\text{h}^{-1}$ )

$\alpha$  = velocidad específica de lisis o metabolismo endógeno ( $\text{h}^{-1}$ )

Cuando los nutrientes y otras condiciones celulares son favorables  $\mu > \alpha$  y la ecuación (1) se transforma en

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (2)$$

que integrada, da

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

donde  $x$  = concentración celular a tiempo cero

$x_t$  = concentración celular después de un intervalo de tiempo  $t$ (h)

Tomando logaritmos en la ecuación (2) se obtiene:

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (4)$$

Si  $t = t_d$ , tiempo para que se duplique la biomasa, entonces,  $x_t = 2x$

$$\ln 2x_0 = \ln x_0 + \mu t_d \quad (5)$$

El  $t_d$ , tiempo para que se duplique la biomasa, viene dado por

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (6)$$

#### FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

La velocidad de crecimiento varía con el tipo de célula microbiana y también en función de las condiciones medioambientales físicas y químicas. En general, el tiempo para que se duplique la biomasa aumenta con la complejidad del organismo, de forma que los tiempos de duplicación medios para las células animales y vegetales son substancialmente mayores que los de los mohos y las levaduras, que a su vez son mayores que los de las bacterias.

Al igual que en las reacciones químicas y enzimáticas, el crecimiento celular varía en función de la temperatura. La mayoría de los microorganismos crecen entre  $25$  y  $30$  °C aunque la temperatura real a la que crece un microorganismo particular depende de su naturaleza psicrófila, mesófila o termófila moderada o extrema, según se indica en la Figura 2.7. Las células de los animales y las plantas tienen unos márgenes de temperaturas mucho más estrechos para su crecimiento. Dentro del rango, la velocidad de crecimiento aumenta con la temperatura hasta un máximo, por encima del cual la velocidad cae rápidamente debido al incremento de la tasa de muerte microbiana. El efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento puede ser descrito por la ecuación de Arrhenius

$$\mu = A e^{-E_a/RT} \quad (7)$$

donde  $A$  = constante de Arrhenius

$E_a$  = energía de activación ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )

$R$  = constante universal de los gases

$T$  = temperatura absoluta

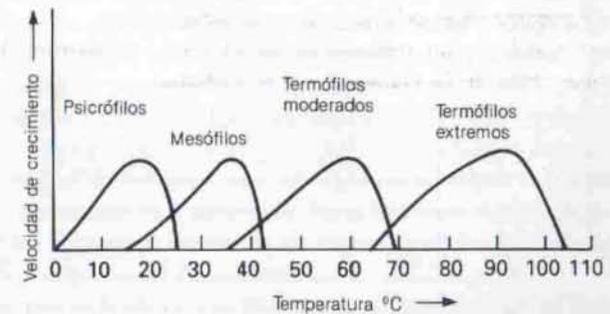


Fig. 2.7. Influencia de la temperatura en la velocidad de crecimiento específico de los microorganismos psicrófilos, mesófilos y termófilos.

El pH influye en el crecimiento microbiano de la misma forma que lo hace en la actividad enzimática. La mayoría de los microorganismos crecen dentro de un rango de pH comprendido entre 3 y 4 unidades.

La velocidad de crecimiento de las células microbianas depende de la actividad del agua o de la humedad relativa, definida como

$$A_w = P_s/P_w \quad (8)$$

donde  $P_s$  es la presión de vapor del agua en una solución y  $P_w$  es la presión de vapor del agua pura. Las bacterias necesitan una  $A_w \geq 0,95$  mientras que los mohos pueden crecer a actividades del agua menores, de hasta 0,7 como máximo.

Como en cualquier reacción química, la velocidad de crecimiento depende de la concentración de nutrientes químicos, y puede describirse por la ecuación de Monod (Fig. 2.8)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{K_s + s} \quad (9)$$

donde  $\mu_{\max}$  = velocidad de crecimiento específica máxima

$s$  = concentración residual del sustrato limitante

$K_s$  = constante de saturación, equivalente a la concentración de sustrato a  $\mu = 0,5 \mu_{\max}$

Los valores típicos de  $K_s$  para diversas fuentes de carbono están comprendidos entre 1 y 10 mg dm<sup>-3</sup>. Las células pueden crecer a velocidades próximas

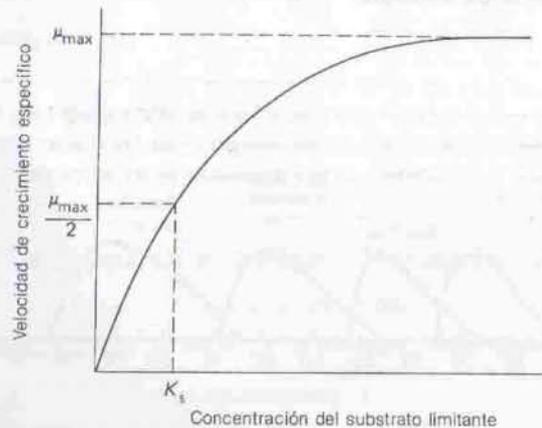


Fig. 2.8. Influencia de la concentración de sustrato limitante en la velocidad de crecimiento específico.

a  $\mu_{\max}$  cuando la fuente de carbono limitante es mayor que 10  $K_s$  o 10-100 mg dm<sup>-3</sup>. Las concentraciones de carbohidrato elevadas pueden inhibir el crecimiento debido a los efectos osmóticos que, como hemos visto antes con la actividad del agua, tienen una influencia más acusada sobre las bacterias que sobre los hongos.

Se ha comprobado que la cantidad de masa celular total formada durante el crecimiento celular es frecuentemente proporcional a la cantidad de sustrato utilizado

$$\gamma_{x/s} = \frac{\text{Biomasa producida (g)}}{\text{Sustrato consumido (g)}} \quad (10)$$

donde  $\gamma_{x/s}$  = coeficiente de rendimiento de biomasa

## Metabolismo

### METABOLISMO PRIMARIO

El crecimiento microbiano depende de la capacidad de la célula para utilizar los nutrientes de su medio ambiente y sintetizar los compuestos macromoleculares de las estructuras celulares y también los principales compuestos de peso molecular bajo necesarios para la actividad celular. El metabolismo intermediario incluye las reacciones que transforman los compuestos de carbono y nitrógeno que entran a la célula en nuevo material celular o en productos que son excretados. La síntesis de estos compuestos necesita energía, y la mayoría de las células utilizadas en las fermentaciones industriales son heterótrofas y obtienen su energía a partir de la ruptura de compuestos orgánicos. En los procesos respiratorios o aerobios, los organismos son capaces de oxidar completamente algunos de los sustratos a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , obteniendo el máximo de energía para la conversión de los sustratos remanentes en nueva masa celular. En el metabolismo fermentativo o anaerobio, las células son menos eficaces a la hora de convertir los sustratos orgánicos en material celular y usualmente excretan intermediarios degradados parcialmente.

Las rutas productoras de energía o catabólicas generan ATP y los coenzimas reducidos necesarios para las diversas reacciones biosintéticas, e intermediarios químicos utilizados como puntos de partida para las reacciones de biosíntesis.

Los azúcares se rompen por una de las tres vías, la de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la de la hexosa monofosfato (HMP), y la de Entner-Doudoroff (ED). La ruta EMP, que convierte la glucosa en dos moléculas de piruvato a través de la triosa fosfato está muy difundida en las células de animales, plantas, hongos, levaduras y bacterias, y como no produce precursores para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, ADN y ARN, los microorganismos que únicamente utilizan esta ruta para la asimilación de la glucosa deben abastecerse de factores de crecimiento. La ruta ED está relativamente restringida, ya que la utilizan unas pocas bacterias, entre ellas las *Pseudomonas*, que no metabolizan la glucosa por la ruta EMP. Un ciclo de la ruta HMP da lugar a la conversión neta de glucosa en  $\text{CO}_2$  con producción de 12 moléculas de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Los microorganismos pueden utilizar esta ruta para producir piruvato. La importancia de la ruta HMP radica especialmente en la obtención de precursores de aminoácidos aromáticos y vitaminas y del  $\text{NADPH}$  y  $\text{H}^+$  necesarios para muchas reacciones biosintéticas.

Un producto final significativo de todas estas rutas es el ácido pirúvico, que en el metabolismo aerobio se introduce en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) siendo asimismo precursor de los ácidos, alcoholes y otros productos finales del metabolismo anaerobio. Un gran número de microorganismos cubren sus necesidades de energía mediante el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El acetyl CoA (2C) formado a partir del piruvato se condensa con el oxalacetato (4C) formando citrato (6C), que a su vez se convierte en oxalacetato siguiendo el ciclo, con producción de dos moléculas de  $\text{CO}_2$  (véase Fig. 2.9a). De este modo el piruvato se oxida a  $\text{CO}_2$  con formación de coenzimas reducidos que pueden volver a oxidarse pasando sus electrones a través de la cadena de transporte hasta los aceptores de electrones, como el oxígeno. Durante el proceso de respiración parte de la energía producida se utiliza para formar ATP, necesario para las biosíntesis.

Los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) también sirven como precursores para la biosíntesis de muchos aminoácidos, algunos ácidos orgánicos y otros productos de fermentación. Cuando estos intermediarios se derivan de esa forma hacia procesos biosintéticos, se debe mantener el nivel de oxalacetato necesario para que se condense con los grupos acetilo provenientes del piruvato, mediante una serie de reacciones; entre ellas, la principal implica la carboxilación del piruvato o del fosfoenolpiruvato para formar oxalacetato o malato. Los microorganismos que crecen utilizando como fuentes de carbono ácidos grasos y acetato, o sus precursores, utilizan el ciclo de los ácidos tricarbóxicos para la producción de energía y de las materias primas para los procesos biosintéticos. El acetyl CoA formado se condensa con el oxalacetato para entrar en el ciclo. El oxalacetato y el malato, convertidos en fosfoenol piruvato y piruvato, pueden utilizarse como precursores de las hexosas y las pentosas a

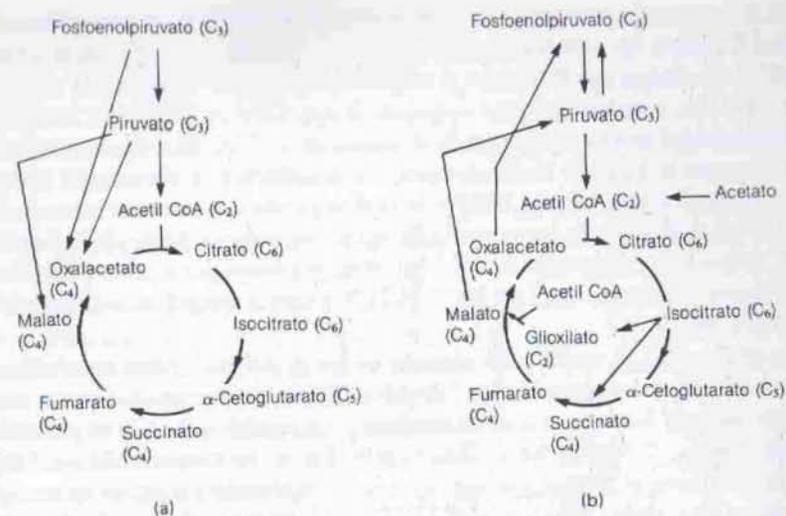


Fig. 2.9. (a) Reacciones anapleróticas en las que interviene el ciclo de los ácidos tricarbóxicos cuando un organismo crece en carbohidratos. (b). Reacciones anapleróticas y otras reacciones claves para la síntesis de precursores de hexosa y pentosa cuando un organismo se cultiva en sustratos que generan acetato como principal fuente de carbono.

través de las reacciones reversibles de las rutas EMP y HMP. Nuevamente, en ausencia de reacciones anapleróticas (restauradoras) los intermediarios del ciclo TCA podrían agotarse. En este caso la introducción de dos reacciones enzimáticas conduce a otro mecanismo cíclico, conocido como ciclo del glioxilato, que repone los ácidos de cuatro átomos de carbono utilizando los acetyl CoA que entran. En la Figura 2.9 se resumen estas reacciones anapleróticas clave. El ciclo del glioxilato también puede utilizar para reponer los intermediarios del ciclo de los TCA el acetyl CoA producido a partir de las hexosas por la vía piruvato.

Las hexosas se convierten en proteínas de organismos unicelulares (SCP) mediante la acción de levaduras y hongos utilizando generalmente una combinación de las rutas EMP y HMP, seguidas del ciclo TCA y la respiración. La producción de proteínas de organismos unicelulares a partir de alcanos implica la oxidación del alcano a unidades de acetato y su asimilación por los ciclos del glioxilato y de los TCA, mediante los enzimas de las rutas EMP y HMP utilizados para la biosíntesis de hexosas, pentosas y otros constituyentes celulares. En la producción de SCP a partir de metanol por las especies *Methylophilus*, el sustrato se convierte en formaldehído, que a su vez es oxidado en la vía de la ribulosa monofosfato (véase Fig. 6.4).

En el proceso de fermentación para la obtención del ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger*, las hexosas se convierten, mediante la ruta EMP, en piruvato y acetil CoA, que se condensa con el oxalacetato para dar citrato en la primera etapa del TCA, y posteriormente se impide la degradación del citrato mediante la inhibición del enzima que degrada el citrato en el TCA. El oxalacetato necesario para que la reacción de condensación se restablezca se obtiene por carboxilación del piruvato. La ruta EMP y la carboxilación del piruvato intervienen también en el proceso de producción de ácido itacónico a partir de la hexosa por *A. terreus*. La producción de ácido glutámico y lisina por *Corynebacterium* y *Brevibacterium* implica la ruta EMP, el TCA y varios mecanismos anapleróticos (véase Fig. 9.1).

En la Figura 2.10 se resumen algunas de las principales rutas metabólicas anaerobias y los productos finales formados. El piruvato se produce en la ruta EMP en algunas fermentaciones anaerobias importantes que utilizan cepas de *Saccharomyces*, *Lactobacillus* y *Clostridium*. En las fermentaciones alcohólicas con levaduras, el piruvato se convierte en acetaldehído y después en etanol; además, en esta última reacción, el  $\text{NADH} + \text{H}^+$  formado durante la glicólisis es reoxidado por el enzima alcohol deshidrogenasa. La adición de bisulfito sódico a este proceso de fermentación da lugar a la formación de un complejo sulfito-acetaldehído y a la reducción del intermediario glicolítico dihidroxiacetona fosfato a glicerol fosfato, lo que conduce a la producción de glicerol (véase

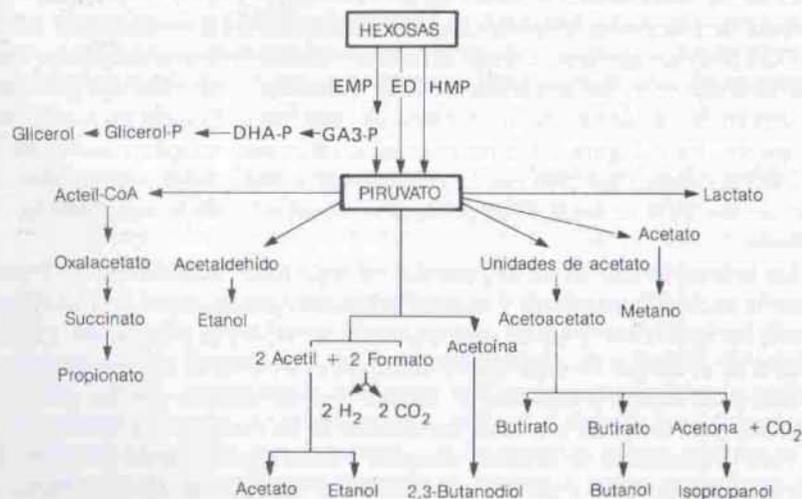


Fig. 2.10. Principales rutas metabólicas anaerobias y productos finales formados.

Fig. 8.4). En la producción de ácido L-(+)-láctico por fermentación industrial con *Lactobacillus desbruckii*, el piruvato formado a partir de la hexosa se convierte en lactato por la acción del enzima L-lactato deshidrogenasa. El ácido acético se puede producir biológicamente por conversión aerobia de etanol en acetato (véase el Capítulo 7), con un rendimiento estequiométrico global de 0,66 a partir de glucosa. Los *Clostridium thermoaceticum* fermentan 1 mol de glucosa dando 3 moles de acetato por la vía del piruvato (véase Fig. 8.5). El *Clostridium acetobutylicum* convierte el piruvato en una mezcla de acetona y butanol. En los procesos de tratamiento de desechos la digestión anaerobia implica la interacción de 3 grupos microbianos en una serie de reacciones complejas. Los ácidos, aldehídos y ésteres orgánicos producidos por degradación de polímeros y monómeros se convierten en acetato,  $\text{CO}_2$  e hidrógeno, y a partir de acetato e hidrógeno (véase Capítulo 12) se obtiene metano y  $\text{CO}_2$ .

En algunos de los siguientes capítulos se van a tratar con más detalle los aspectos relacionados con el metabolismo primario de las cepas microbianas implicadas en los procesos específicos de fermentación industrial.

#### METABOLISMO SECUNDARIO

Los metabolitos secundarios son compuestos que no son necesarios para la biosíntesis celular, no tienen por tanto un papel directo en el metabolismo energético, y, en consecuencia, no se conoce con claridad la razón de su existencia. Algunos de estos compuestos, principalmente los antibióticos, son útiles para el organismo puesto que pueden inhibir a otros organismos de su entorno que podrían competir por los nutrientes disponibles, mientras que otros pueden actuar como efectores para la diferenciación, como agentes de simbiosis o como factores en los ciclos sexuales. Además, tienden a ser sintetizados como familias de compuestos relacionados.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios está estrechamente relacionada con el metabolismo primario de las células que los producen, ya que usualmente sus precursores son metabolitos primarios normales o modificados, como ácidos orgánicos, unidades de isopreno, aminoácidos alifáticos y aromáticos, derivados de azúcares, derivados del ciclitol y bases púricas o pirimidínicas. El grupo más importante de metabolitos secundarios microbianos producidos por fermentación industrial lo constituyen los antibióticos (véase Capítulo 10). Otros ejemplos de metabolismo secundario microbiano comerciales incluyen el ácido giberélico, los alcaloides del cornezuelo, sustancias antitumorales, inmunomoduladores e insecticidas. A partir de los vegetales pueden extraerse un gran número de metabolitos secundarios de alto valor, por ejemplo, los derivados de uso farmacéutico vinblastina, vincristina, ajmalicina, digitalina y co-

deína, sustancias aromatizantes como la quinina y el aroma del jazmín y la menta, o insecticidas como las piretrinas. Es posible que algunos de estos compuestos puedan obtenerse en el futuro por cultivos en suspensión. Para obtener rendimientos altos de metabolitos secundarios vegetales parece ser necesario un cierto grado de agregación y diferenciación celular, lo que no siempre es deseable en una planta a gran escala ya que generalmente el período de cultivo necesario para las células diferenciadas es más largo que el necesario para las no diferenciadas, lo que aumenta los costos y eleva el riesgo de contaminación microbiana.

### Regulación del metabolismo

Una célula cualquiera tiene el potencial genético necesario para producir aproximadamente 1.000 enzimas. Naturalmente, con tan compleja red de rutas metabólicas operando, estos enzimas deben ser sintetizados en proporciones correctas y deben trabajar en forma coordinada para permitir a la célula funcionar como una unidad eficiente. Los microorganismos son capaces de alterar su composición y metabolismo en respuesta a cambios medioambientales, y los principales mecanismos reguladores que les confieren esta flexibilidad operan tanto a nivel de la síntesis de enzimas como de modificación de su actividad.

En un proceso de fermentación dado el flujo de sustrato a través de la compleja red de rutas anabólicas y catabólicas puede verse influido por una gran variedad de mecanismos. Determinados enzimas limitantes de la velocidad están situados estratégicamente en las diversas rutas, y usualmente son sensibles a mecanismos de inducción/represión y activación/inhibición (véase más adelante). La sobreproducción de metabolitos primarios se debe a las altas velocidades de flujo diferencial de las reacciones anteriores que dan lugar a la acumulación del metabolito y también a las bajas velocidades de las reacciones posteriores que podrían causar su degradación o utilización. Los procesos que regulan la producción de metabolitos secundarios son más complejos y menos conocidos, aunque es evidente que muchos de estos mecanismos son similares a los que controlan el metabolismo primario.

Naturalmente, en el desarrollo de los procesos de fermentación para la sobreproducción de un metabolito particular, es esencial tener en cuenta los diversos procesos de regulación en el diseño de las condiciones medioambientales óptimas, así como en el aislamiento o manipulación de las cepas microbianas productoras.

### SINTESIS Y DEGRADACION DE ENZIMAS

La concentración total de un enzima intracelular particular presente en las células viene regulada por las velocidades relativas de síntesis y degradación o inactivación de tal enzima. En las células, las proteínas están siendo degradadas continuamente bajo la acción de los enzimas proteolíticos, de forma que cada proteína tiene una vida limitada. Las proteínas varían en su susceptibilidad frente al ataque proteolítico, de forma que la síntesis neta de un enzima se produce cuando su velocidad de síntesis es superior a la de degradación.

En la Figura 2.11a se ilustra el mecanismo general de síntesis proteica de los procariontes. Una única ARN polimerasa reconoce y se une a centros ADN específicos denominados promotores, iniciando la síntesis del ARNm y la transcripción de un operón. En el extremo del gen estructural, una región de terminación hace que la ARN polimerasa cese la transcripción y se disocie del ADN. En los procariontes, muchas ARNm son policistrónicas, esto es, codifican cadenas polipeptídicas múltiples, mientras que la mayoría de los ARNm de los eucariotas son monocistrónicos. La síntesis de cada proteína se inicia por la unión de los ribosomas a un centro específico del ARNm y la traducción comienza incluso antes de que la ARN polimerasa haya alcanzado la señal para la terminación.

En algunos casos la transcripción bacteriana se inicia a una velocidad constante (usualmente lenta), sin regulación, en tanto que en otros la velocidad a la que el ARN inicia la síntesis está gobernada por proteínas que interactúan

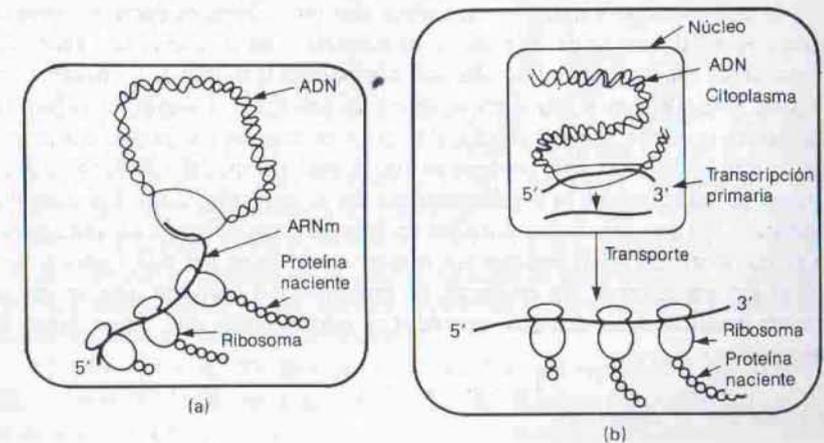


Fig. 2.11. Síntesis proteica en los procariontes (a) y eucariotas (b).

en una forma específica con las regiones del ADN denominadas operones, localizadas cerca de los centros promotores. Las proteínas reguladoras que se unen a los operones se denominan represoras o activadoras, dependiendo de si disminuyen o incrementan la velocidad de iniciación de la transcripción. Algunos operones están controlados por proteínas activadoras y represoras y en los procariontes los centros promotor-operador controlan frecuentemente la transcripción del ADN que codifica más de una proteína. Las regulaciones de la síntesis proteica tienen lugar en la mayoría de los casos mediante control de la velocidad de iniciación de la transcripción, aunque a veces la regulación se produce en el momento de la terminación de la transcripción o en los puntos de iniciación de la traducción.

En la Figura 2.11b se ilustra el mecanismo de la síntesis proteica en los eucariotas. La transcripción se produce en el núcleo, y el ARN primario que se transcribe se modifica ampliamente en el núcleo antes de que salga al citoplasma para asociarse con los ribosomas. En los eucariotas el control de la síntesis proteica puede ejercerse al nivel del procesado del ARN así como en la transcripción o en la traducción. En los procariontes la regulación en la etapa de traducción es muy poco importante.

Tanto en los procariontes como en los eucariotas, la estabilidad o vida media del ARNm también puede influir en la velocidad de síntesis proteica. Los distintos ARNm tienen estabilidades diferentes, de forma que el efecto en la síntesis proteica global es complejo.

### Inducción

Algunos enzimas se producen siempre en cantidades substanciales cuando la célula está creciendo, mientras que otros son inducibles, es decir, se forman únicamente en presencia de determinados substratos en el medio. Los genes estructurales de los enzimas inducibles son normalmente inactivos u operan a velocidades «basales» muy bajas en ausencia de substrato. Cuando el substrato se encuentra presente, el gen estructural se pone en marcha y se produce la transcripción y la traducción; este proceso se ilustra según el modelo de Jacob y Monod para la inducción de la  $\beta$ -galactosidasa del *E. coli* (Fig. 2.12). En ausencia de inductor, un gen regulador sintetiza un represor que se une a un gen operador, evitando que la ARN polimerasa se mueva a lo largo del ADN para transcribir el gen estructural. Sin embargo, en presencia del inductor, éste se une al represor, arrancándolo del gen operador y permitiendo que tenga lugar la transcripción.

### Represión por el catabolito

Este fenómeno se produce frecuentemente cuando la célula crece en un medio que contiene más de un substrato utilizable para el crecimiento. En la repre-

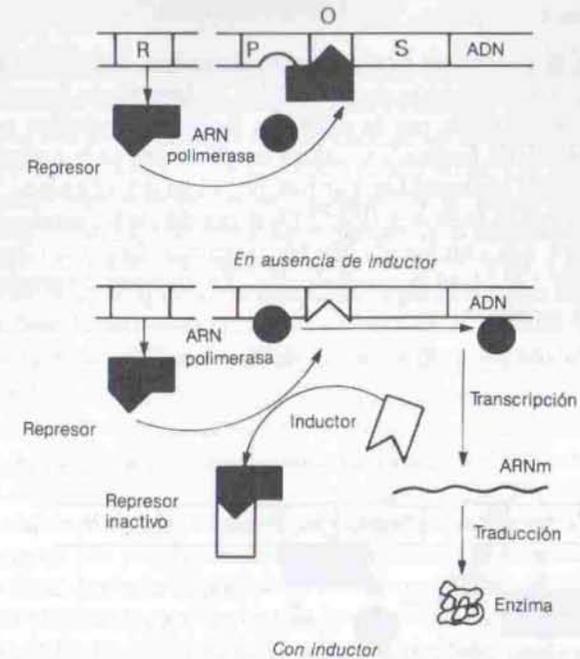


Fig. 2.12. Representación de un sistema enzimático inducible.

sión por el catabolito carbono, se sintetizan enzimas que catabolizan el mejor substrato, usualmente glucosa, y únicamente cuando éste se ha agotado se producen enzimas que descomponen el substrato más pobre. La inhibición de la formación de 3'-5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPc) parece ser el factor clave en la represión por el catabolito en el *E. coli*; este compuesto es necesario para la síntesis de ARNm. El metabolismo de la glucosa reduce el contenido de AMPc de las células unas 1.000 veces. El nivel de AMPc depende de la adenil ciclasa y la AMPc fosfodiesterasa, que sintetizan y degradan el AMPc, respectivamente. La adenil ciclasa parece estar inhibida por el transporte de compuestos de carbono utilizables en la célula. Aunque la represión por la glucosa se produce ampliamente en los hongos, levaduras y *Bacillus*, los mecanismos reguladores aún no son bien conocidos.

Muchos enzimas, por ejemplo las proteasas, son reprimidos por la presencia de aminoácidos o amoníaco utilizables rápidamente (represión del catabolito nitrógeno). La limitación de amoníaco en el medio de crecimiento fermentativo desreprime rápidamente la síntesis de estos enzimas.

### Represión feedback

Mientras que la síntesis de enzimas catabólicos está controlada frecuentemente por inducción y represión de catabolitos, la biosíntesis de enzimas anabólicos puede estar regulada por la represión feedback producida por el producto final. La represión feedback se utiliza ampliamente en la naturaleza para controlar la síntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas. En el modelo clásico de represión feedback (Fig. 2.13) el gen regulador produce una proteína apo-represora, que, combinada con un co-represor (producto final), se une al centro operador y bloquea la transcripción. En ausencia de producto final, no se produce la represión.

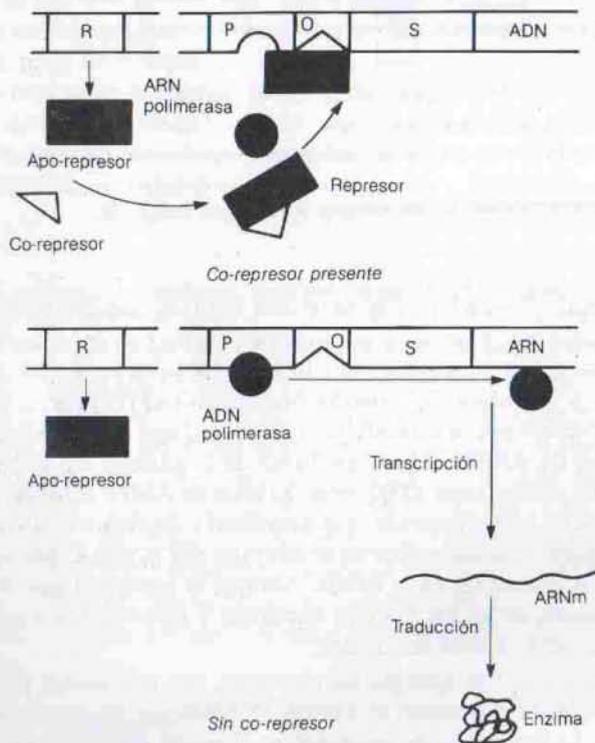


Fig. 2.13. Representación de un sistema enzimático de represión por retroinhibición.

### MODULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Muchos enzimas tienen uno o más centros distintos al centro activo, denominados centros alostéricos, que ligan reversiblemente metabolitos particulares o moléculas efectoras, produciendo un cambio en la configuración del enzima y por tanto aumentando o disminuyendo su actividad. Las actividades de otros enzimas están reguladas de forma covalente, de tal modo que la formación o degradación enzimática de un enlace covalente en el enzima sirve para activarlo o inactivarlo. Compuestos como el ATP, el ADP, el AMP y los nucleótidos de la nicotinamida, que reflejan el nivel de energía disponible de las células, modulan también la actividad enzimática y controlan el metabolismo ajustando el balance entre los procesos catabólicos y los procesos anabólicos que consumen energía.

### REGULACION DE LAS RUTAS METABOLICAS RAMIFICADAS

Las rutas metabólicas biosintéticas tienen frecuentemente una secuencia de enzima común con ramificaciones que conducen a la formación de más de un producto final. Los microorganismos han desarrollado mecanismos de retroalimentación (feedback), por los cuales la acumulación del producto final causa un efecto en el primer enzima de la rama que conduce a ese producto. Además, existen mecanismos en los que el producto final de una ruta ramificada produce la inhibición «feedback» parcial del primer enzima de la secuencia común de forma que el flujo de sustrato que pasa a través de esta secuencia se va reduciendo proporcionalmente. Este efecto se consigue a nivel biológico mediante el uso de isoenzimas y mecanismos de regulación «feedback» concertados y acumulativos (Fig. 2.14). Estos efectos reguladores pueden ser de dos tipos: inhibición de la actividad enzimática y represión de la síntesis de enzimas. En los casos en los que están implicados los isoenzimas (múltiples formas de un enzima capaces de catalizar la misma reacción), la síntesis o inhibición de cada forma enzimática puede estar regulada por un producto final distinto. En la regulación «feedback» concertada, únicamente está implicado un enzima, aunque debe haber más de un producto que inhiba su actividad o reprima su síntesis. En las regulaciones feedback acumulativas, cada producto final produce una inhibición o represión parcial y son necesarios todos los productos finales para bloquear completamente la actividad o la síntesis.

### Asimilación del sustrato/secreción del producto

Para el rápido crecimiento celular son necesarios unos mecanismos eficaces de flujo de entrada de sustrato y de salida de producto, así como el suministro



Fig. 2.14. Mecanismo de regulación por retroinhibición de rutas metabólicas ramificadas (reproducido con permiso de Demain, 1971).

de sustrato para su conversión en metabolitos primarios y secundarios y otros productos, y para la excreción del producto. En los procariotas, el sustrato se mueve dentro y fuera de la célula directamente atravesando las membranas asociadas con la envoltura celular. Algunas fermentaciones bacterianas han sido manipuladas para alterar la membrana celular o la composición de la pared con objeto de modificar los mecanismos de entrada o facilitar la excreción (véase Capítulo 9: producción de ácido glutámico). Además de la membrana plasmática externa, los eucariotas también tienen un extenso sistema de membranas y orgánulos internos. Algunos materiales son transportados a la célula por endocitosis, proceso en el que una región de la membrana plasmática se invagina formando una vesícula que contiene el material proveniente del exterior de la célula. La vesícula se funde con otro orgánulo, un lisosoma primario, formando un lisosoma secundario en el que gran parte del material externo es degradado y transportado al citoplasma. Los productos de degradación se almacenan en vesículas hasta ser expulsados por exocitosis (Fig. 2.15); estas vesículas están presentes en gran número en los ápices de las hifas de los hongos. En consecuencia, en los eucariotas, muchos de los procesos de transporte de sustratos y productos a través de la membrana se producen entre el protoplasma de la célula y orgánulos, como por ejemplo las vesículas y el retículo endoplásmico.

Los solutos son transportados a través de las membranas sin modificación (a) por difusión pasiva a favor de un gradiente de concentración, (b) por difu-

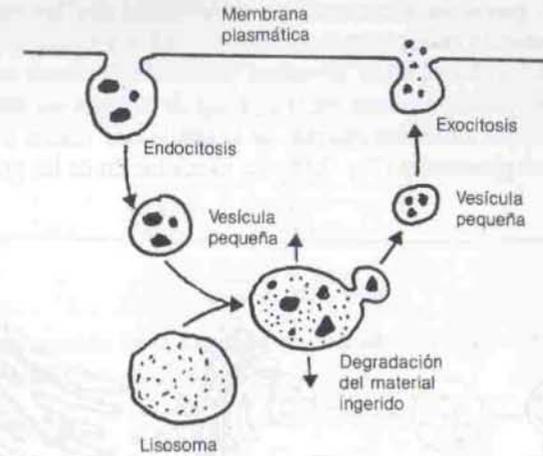


Fig. 2.15. Proceso de endo y exocitosis en los eucariotas.

sión facilitada por un gradiente de concentración, por medio de un sistema de transporte, que, al igual que los enzimas, presenta cinéticas de saturación, y (c) por transporte activo, que también implica un sistema de transporte pero que permite el movimiento del soluto contra un gradiente electroquímico. Los solutos también pueden modificarse durante la translocación por enzimas con propiedades vectoriales.

Las proteínas de transporte específicas parecen ser responsables del transporte de muchos solutos a través de las membranas, algunos de los cuales están ligados a la energía y otros son inducibles. En la biosíntesis de algunos productos extracelulares microbianos el enzima biosintético final puede estar asociado a la membrana y funcionando facilita la excreción. Por ejemplo, se ha implicado a las translocasas en la extrusión de exopolisacáridos de las células.

#### SECRECIÓN DE ENZIMAS

Los procariotas y eucariotas Gram-positivos tienen una única membrana plasmática en su superficie. Por el contrario, las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas tienen dos membranas separadas mediante un espacio periplásmico. Los enzimas extracelulares, sintetizados por las bacterias Gram-positivas, son transportados a través de la membrana citoplásmica, difundiendo por la pared celular y acumulándose en el líquido de cultivo extracelular. Los enzimas

extracelulares o proteínas secretoras son sintetizados por los eucariotas en la superficie del retículo endoplásmico y transportados a través de la membrana al espacio de dicho retículo. Las proteínas contenidas en estos espacios vesiculares se procesan posteriormente en el aparato de Golgi y en otras vesículas y se secretan al medio ambiente externo de la célula por fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Fig. 2.16). La glicosilación de las proteínas se pro-

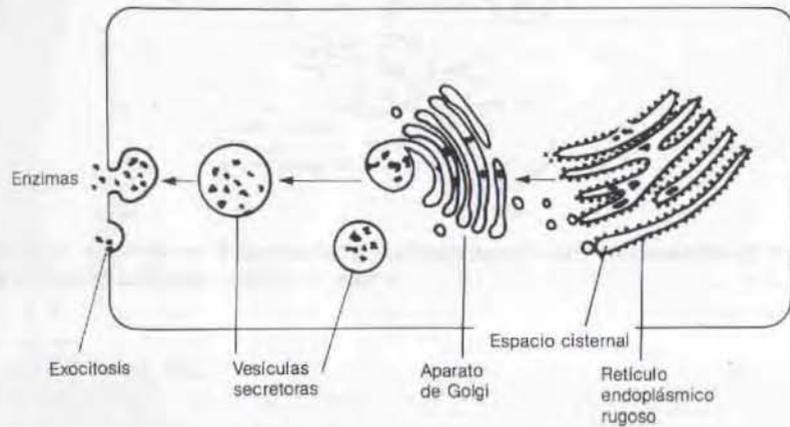


Fig. 2.16. Ruta de secreción de proteínas en los eucariotas.

duce en el espacio vesicular del retículo endoplásmico y en los cuerpos de Golgi. Esta ruta secretora general parece ser similar en los eucariotas superiores y en las levaduras y probablemente se produzca en los hongos filamentosos, aunque pueden existir variaciones en el proceso. En las bacterias Gram-negativas muchos enzimas son transportados a través de la membrana citoplásmica y se localizan en el espacio periplásmico.

Las proteínas secretadas a través de las membranas contienen usualmente un péptido amino terminal de extensión, denominado secuencia señal. El péptido señal, que sobresale del ribosoma, interacciona con la superficie más interna de la membrana plasmática de la bacteria o con el retículo endoplásmico de los eucariotas, formando un poro o canal. A medida que el polipéptido se elonga pasa a través del poro en la membrana, en un proceso conocido como secreción co-traduccional, y una peptidasa señal localizada en la parte externa de la membrana elimina el péptido señal, permitiendo a la proteína asumir su estructura tridimensional normal. En la Figura 2.17 se muestra un diagrama acerca de la hipótesis señal para la secreción co-traduccional de la proteína. Algu-

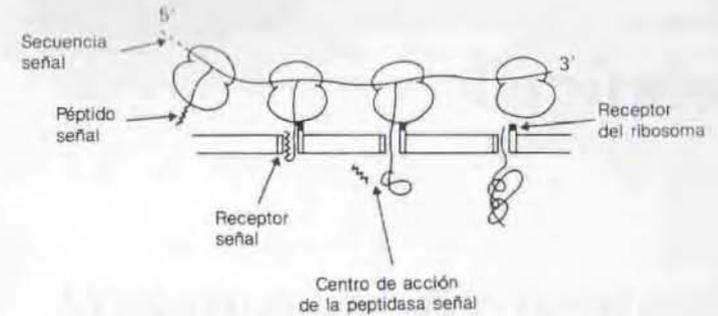


Fig. 2.17. Representación de la secreción co-traduccional (reproducido con permiso de Priest, 1984).

nas proteínas extracelulares son secretadas después de que han sido sintetizadas en un proceso (que también implica un péptido señal) conocido como secreción post-traduccional.

## Capítulo 3

# *Sistemas de fermentación*

### Procesos continuos y discontinuos

Las fermentaciones pueden llevarse a cabo mediante procesos discontinuos, discontinuos alimentados a intervalos o continuos así como por variaciones de estos procedimientos. Los cultivos discontinuos pueden considerarse como un sistema cerrado, excepto para la aireación, que contiene una cantidad limitada de medio, en el que el inoculado pasa a través de un número de fases, según se muestra en la curva típica de crecimiento discontinuo (véase Fig. 2.6). Mientras que en el cultivo discontinuo todo el sustrato se añade al comienzo de la fermentación, en los procesos discontinuos alimentados el sustrato se va añadiendo a intervalos a lo largo del proceso; esta forma de trabajo elimina los efectos de represión por las fuentes de carbono utilizables rápidamente, reduce la viscosidad del medio y los efectos de los constituyentes tóxicos, o simplemente, hace que la etapa de formación de producto sea lo más larga posible. Los sistemas de cultivo discontinuo alimentados a intervalos, o continuos, se utilizan en la mayoría de los procesos de fermentación industrial y están particularmente adaptados a los procesos de fermentación en los que el producto se forma mayoritariamente después de la fase de crecimiento exponencial. La principal desventaja de las fermentaciones discontinuas cuando se utilizan para la producción de productos asociados al crecimiento, es que la formación eficiente de producto tiene lugar únicamente durante una fracción del ciclo de fermenta-

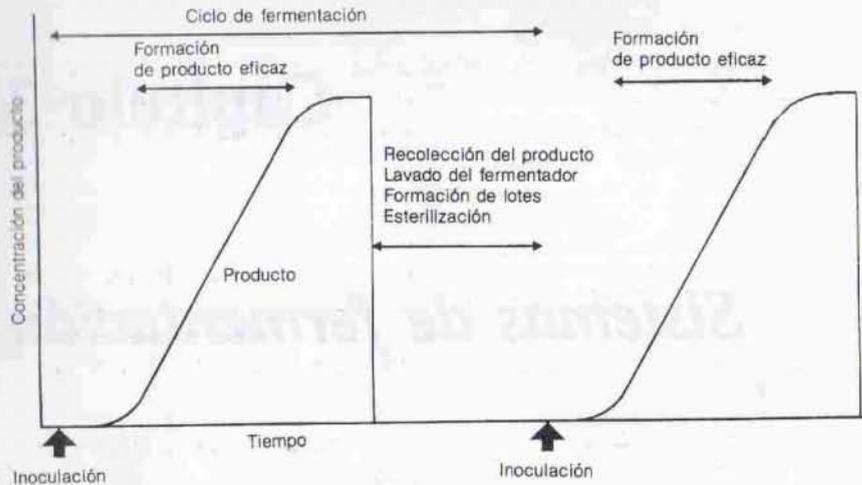


Fig. 3.1. Ciclo de fermentación discontinuo.

ción (Fig. 3.1). Los sistemas continuos con volúmenes de salida de producto elevados pueden ser, en consecuencia, mucho más eficaces en determinadas aplicaciones en términos de productividad del fermentador (volumen de producción por unidad de volumen por unidad de tiempo,  $\text{Kgm}^{-3}\text{h}^{-1}$ ). Las fermentaciones continuas pueden considerarse como un sistema abierto en que el medio se va añadiendo continuamente al biorreactor y se va eliminando simultáneamente igual volumen de medio fermentado. Existen dos tipos principales de reactores continuos, los reactores de mezcla completa y los de flujo pistón.

En un cultivo discontinuo, la concentración de biomasa por unidad de tiempo (t) es:

$$x - X_R = Y(S_R - s)$$

Donde  $x$  = concentración celular en el tiempo t

$X_R$  = inóculo o concentración celular inicial

$\gamma$  = rendimiento para el sustrato limitante (g de biomasa por g de sustrato consumido)

$s$  = concentración de sustrato en el tiempo t

$S_R$  = concentración inicial del medio

Por tanto

$$\gamma = \frac{x - X_R}{S_R - s}$$

La cantidad de biomasa alcanzada en la fase estacionaria depende teóricamente de la concentración inicial del sustrato limitante del crecimiento y de la eficacia del organismo para convertir el sustrato en material celular. Por tanto, suponiendo que el sustrato limitante del crecimiento sea  $S = 0$  en la fase estacionaria

$$\gamma = \frac{x - X_R}{S_R}$$

En un reactor continuo de mezcla completa en una sola etapa, la adición de sustrato a una velocidad adecuada combinada con la eliminación a una velocidad volumétrica igual de medio de cultivo del recipiente produce un estado estacionario en el que la formación de biomasa está en equilibrio con la pérdida de células. En estas condiciones:

- La velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ) viene controlada por la velocidad de dilución ( $D$ ) puesto que  $\mu = D$
- La concentración de sustrato en estado estacionario,  $\bar{s}$  en el quimostato viene determinada por la velocidad de dilución, según la ecuación:

$$\bar{s} = \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D}$$

si las cinéticas siguen el modelo de Monod y  $D < \mu_{\max}$

- La concentración de biomasa en el estado estacionario,  $\bar{x}$  viene determinada por las variables operacionales  $S_R$  y  $D$ , según la ecuación:

$$\bar{x} = \gamma \left[ S_R - \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D} \right]$$

Estas ecuaciones se deducen de la Figura 3.2.

En la Figura 3.3 se muestra el efecto de la velocidad de dilución en las concentraciones de sustrato y biomasa en estado estacionario y en la productividad de biomasa. Como se ve, a medida que  $D$  se aproxima a  $\mu_{\max}$ , la concentración residual del sustrato limitante necesaria para soportar el aumento de velocidad de crecimiento se eleva, y por tanto la concentración de sustrato también aumenta (hasta el límite superior  $s = S_F$ ) mientras que la de biomasa disminuye. Cuando se emplea un sistema de cultivo en continuo, por ejemplo en el proceso de fermentación industrial de producción de proteínas de organismos unicelulares, la cantidad de células producidas por unidad de tiempo (velocidad de producción) y por unidad de sustrato utilizado ( $\gamma$ ) deben ser máximas. En estado estacionario, la velocidad de producción será igual al producto de la velocidad de flujo por la concentración celular. Para que la producción

La velocidad de dilución  $D$  ( $\text{h}^{-1}$ ), que representa el flujo del medio en el quimostato por unidad de volumen de líquido contenido se define como:

$$D = F/V$$

donde  $V$  = volumen ( $\text{m}^3$ )

$F$  = velocidad de flujo ( $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ )

El cambio neto de biomasa con el tiempo, suponiendo que todas las células son viables, puede expresarse como:

$$\begin{aligned} dx/dt &= \text{crecimiento} - \text{producción} \\ &= \mu x - Dx \end{aligned}$$

En estado estacionario la concentración de células en el reactor es constante, por tanto:

$$\begin{aligned} dx/dt &= 0 \\ \mu x &= Dx \\ \mu &= D \end{aligned}$$

Cuando  $D < 0,9 \mu_{\max}$ , la velocidad de producción celular en el fermentador está exactamente equilibrada con la velocidad de producción celular, y en estado estacionario esta condición se cumple ( $\bar{x}$  = constante). Por otro lado, cuando el valor de  $D$  es similar al de  $\mu_{\max}$ , la producción de células en el efluente es superior a su velocidad de producción por crecimiento en el fermentador y se produce el colapso, siendo  $dx/dt$  negativo

$\mu$  está relacionado con la concentración de sustrato ( $s$ ) mediante la ecuación de Monod

$$\mu = \frac{\mu_{\max} s}{K_s + s}$$

En estado estacionario,  $\mu = D$ , y para el modelo cinético de Monod de crecimiento celular

$$D = \frac{\mu_{\max} \bar{s}}{K_s + \bar{s}}$$

donde  $\bar{s}$  es la concentración de sustrato residual en estado estacionario

$$\bar{s} = \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D}$$

como  $D \rightarrow \mu_{\max}$ , entonces  $\bar{s} \rightarrow S_R$

La concentración de biomasa en el quimostato en estado estacionario para el caso de una alimentación estéril ( $X_R$  o  $X_F = 0$ ), viene dado por

$$\bar{x} = Y(S_R - \bar{s})$$

por tanto

$$\bar{x} = Y \left[ S_R - \frac{K_s D}{\mu_{\max} - D} \right]$$

cuando  $D \rightarrow \mu_{\max}$ ,  $\bar{x} \rightarrow 0$

La productividad de biomasa,  $P'_c$ , para un proceso de fermentación continuo en estado estacionario viene dada por

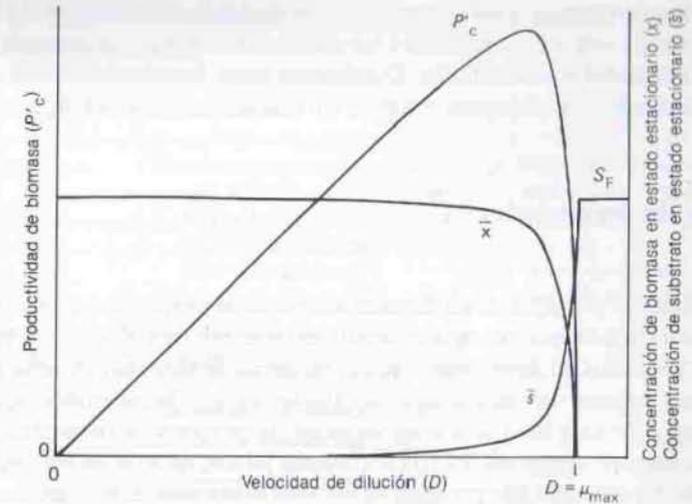


Fig. 3.3. Influencia de la velocidad de dilución en las concentraciones de biomasa ( $\bar{x}$ ) y sustrato ( $\bar{s}$ ) en el estado estacionario y productividad de la biomasa ( $P'_c$ ).

celular sea máxima, la velocidad de dilución deberá ser alta, aunque no tanto que exceda a  $\mu_{\max}$  o se produzca la pérdida de material. La productividad máxima, combinando una producción elevada con una utilización de sustrato eficaz, se obtiene a una velocidad de flujo igual a la máxima velocidad de producción, o ligeramente inferior, y con la mayor concentración de sustrato posible prácticamente en el flujo de alimentación.

En los procesos de producción de algunos metabolitos primarios, se pueden adoptar medidas similares para optimizar las condiciones del quimostato. Sin embargo, en el caso de metabolitos secundarios, en el que el producto no va asociado al crecimiento, no se puede utilizar un único quimostato de mezcla perfecta, sino que deben emplearse quimostatos multietapas para permitir que prevalezcan distintas condiciones medioambientales en las etapas separadas, si las condiciones óptimas para el crecimiento y la formación de producto son diferentes. Los quimostatos que incorporan procesos de reciclado de biomasa concentrada para incrementar la concentración de biomasa en el reactor han encontrado aplicaciones industriales en la producción de alcohol y en el tratamiento de efluentes.

En los reactores de flujo pistón, el cultivo fluye por un reactor tubular sin mezcla en contracorriente. En la entrada del reactor se van añadiendo continuamente las células y el medio, por lo que la composición del medio, la con-

concentración de biomasa y las concentraciones de producto varían con la longitud del reactor de una forma análoga a los cambios ocurridos a lo largo del tiempo en un fermentador discontinuo. Usualmente debe incorporarse un sistema de reciclado de la biomasa para obtener un inóculo continuo en la entrada.

### Diseño del fermentador

La función principal de un fermentador es la de proporcionar un medio ambiente controlado que permita el crecimiento eficaz de las células y la formación de producto. El fermentador típico moderno de laboratorio se ha diseñado como una unidad sofisticada con las características y la instrumentación necesarias para llevar a cabo una gran variedad de procesos de fermentación. A la hora de discutir acerca de los fermentadores piloto, debería recordarse que los fermentadores a escala de producción industrial son usualmente unidades construidas a medida teniendo en cuenta los costos y objetivos específicos, y diseñadas para un proceso o una serie de procesos relacionados, y en consecuencia, únicamente tienen las características e instrumentación especificados para un proceso de producción particular.

#### CONDICIONES PARA OPERAR EN MEDIO ASEPTICO

Muchos biorreactores tienen que trabajar en condiciones asépticas utilizando un inóculo puro del microorganismo y excluyendo los organismos contaminantes; por consiguiente, el biorreactor, al igual que la red de tuberías asociadas, ha sido diseñado como un recipiente a presión de tal forma que tanto el sistema como el medio que contenga puedan esterilizarse a la temperatura/presión adecuadas, un mínimo de 121 °C/15 psi durante 15-30 minutos. Las válvulas utilizadas en las secciones esterilizables deben ser utilizadas en condiciones asépticas. Las válvulas de estrangulamiento y las de diafragma son particularmente adecuadas, puesto que su mecanismo de operación está separado del medio líquido o gaseoso por un tubo o un diafragma flexible. Los puntos de entrada al recipiente y el proceso para añadir y eliminar gases o líquidos al/del reactor durante la fermentación también deben estar diseñados de forma que mantengan las condiciones asépticas (Tabla 3.1). En la Figura 3.4 se ilustra una válvula de muestreo aséptica.

No todos los procesos de fermentación necesitan condiciones totalmente estériles; en algunos se reduce simplemente su contaminación por pasterización, mientras que otros dependen realmente de la población microbiana natural, por

**Tabla 3.1.** Diseño del fermentador y operaciones relacionadas con el mantenimiento de su esterilidad

Componente o proceso	Fundamento	Ejemplos o comentarios
1. Recipiente	Diseñado para ser esterilizado con vapor a presión, resistente a la corrosión química y con materiales no tóxicos para el organismo	(a) Vidrio de un espesor apropiado para fermentadores pequeños y mirillas (b) Acero inoxidable resistente al pH del proceso
2. Entrada y salida al fermentador	Esterilizables con vapor de agua	
3. Tuberías	Sin bolsillos o espacios muertos, inclinadas hacia el punto de drenaje	
4. Válvulas	Adecuadas para operar asépticamente. Los materiales de construcción deben ser capaces de tolerar las condiciones de temperatura y presión del proceso y ser resistentes a los componentes químicos utilizados	Las válvulas varían en su grado de idoneidad. Las válvulas de compresión y las de diafragma son especialmente aptas para uso aséptico, puesto que su mecanismo está separado mediante un tubo flexible y un diafragma, respectivamente, del caldo o del gas que fluye
5. Prensaestopas y cojinetes del agitador	Sellados para trabajar en condiciones asépticas prolongadas	(a) Capas de asbesto o de hilos de algodón empaquetados contra el eje (b) Cierres: forros de metal, las condiciones asépticas se mantienen por contacto superficial uniforme de precisión entre un forro de cierre giratorio y el estacionario del eje del agitador. En los cierres mecánicos, el componente estacionario y el giratorio se mantienen juntos mediante resortes o fuelles que se expanden (c) Dispositivos de agitación magnéticos que no penetran en el recipiente. Un eje externo hace girar al eje de un agitador interno mediante una fuerza magnética

Tabla 3.1. Continuación

Componente o proceso	Fundamento	Ejemplos o comentarios
6. Entrada de gas	Filtro de aire para esterilizar el aire que entra. Esterilizable con vapor de agua. Válvula de no retorno situada entre el difusor y el filtro de aire para evitar el flujo en contracorriente del medio al filtro	(a) Lana de vidrio, fibra de vidrio u otro material empaquetado que atrapa físicamente las partículas (b) Filtro de membrana plegada fabricado con éster de celulosa, nilón polisulfona u otros materiales
7. Salida de gas	Diseñado de forma que no se produzca la contaminación por flujo en contracorriente	El filtro de salida puede utilizarse cuando no se desee la liberación de organismos del cultivo al medio ambiente
8. Alimentación de aditivos	Alimentación esterilizada por calentamiento o filtración	Acido, álcali (líquido o gaseoso), carbohidrato, precursor
9. Alimentación, inóculo y líneas de muestreo	Esterilizables con vapor de agua antes y después de su uso	Secuencia de muestreo (véase Fig. 3.4): (a) apertura de las válvulas 2 y 3 para esterilizar la tubería, (b) cierre de la válvula 3, (c) apertura de la válvula 4 para enfriar la tubería estéril caliente antes de introducir la muestra, (d) cierre de la válvula 4, apertura de la válvula 1, (e) desechar el cultivo del espacio muerto, (f) recoger la muestra, (g) cierre de la válvula 1, (h) repetir (a) y (b)

lo que el diseño del reactor y del equipo necesarios para cada proceso deben simplificarse de acuerdo con esto.

#### AIREACION Y MEZCLADO

El proceso de fermentación industrial aerobio debe disponer de un sistema de aireación y mezclado del cultivo. El reactor de tipo tanque con agitación convencional incluye un sistema de agitación mecánico consistente en un eje vertical con varios agitadores, en tanto que la mayoría de los biorreactores de platos

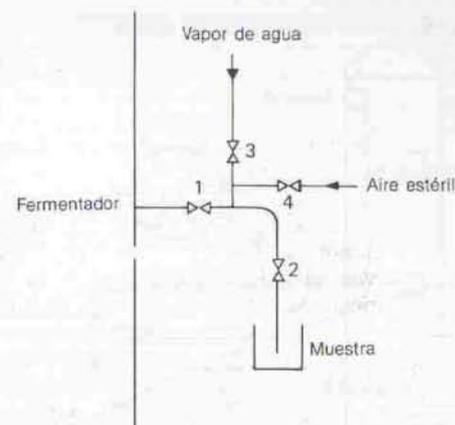


Fig. 3.4. Puerta de muestreo aséptica. Los números 1, 2 y 3 corresponden a válvulas.

(Rushton) están equipados con turbinas de discos localizadas a lo largo del eje y con dimensiones controladas para conseguir un buen mezclado y una buena dispersión a través del medio. Además disponen de varios deflectores (usualmente entre 4 y 6) cuya anchura representa el 10 % del diámetro del recipiente, localizados a lo largo del perímetro del reactor con objeto de incrementar la turbulencia. El aire estéril se introduce por la base del tanque, normalmente por un anillo pulverizador, y es dispersado eficazmente a través del medio por la acción del sistema de agitación. En la Figura 3.5 se esquematizan los componentes del sistema de agitación.

La geometría de los fermentadores aireados debe diseñarse de forma que se facilite la eficacia del intercambio gaseoso. Las características finales deben tener en cuenta los fenómenos de transporte que existen en los procesos biológicos.

#### Flujo de fluidos

Los fluidos se denominan newtonianos cuando su flujo obedece a la ley de viscosidad de Newton. Supongamos que un fluido está contenido entre dos placas paralelas de sección  $A$  separadas una distancia  $x$ ; si una placa se mueve en una dirección a una velocidad constante, la capa de líquido adyacente a la placa que está en movimiento también se moverá en esa dirección impartiendo parte de su momento a la capa más próxima, haciendo que se mueva a una velocidad ligeramente inferior. La ley de Newton de la viscosidad establece que la fuerza

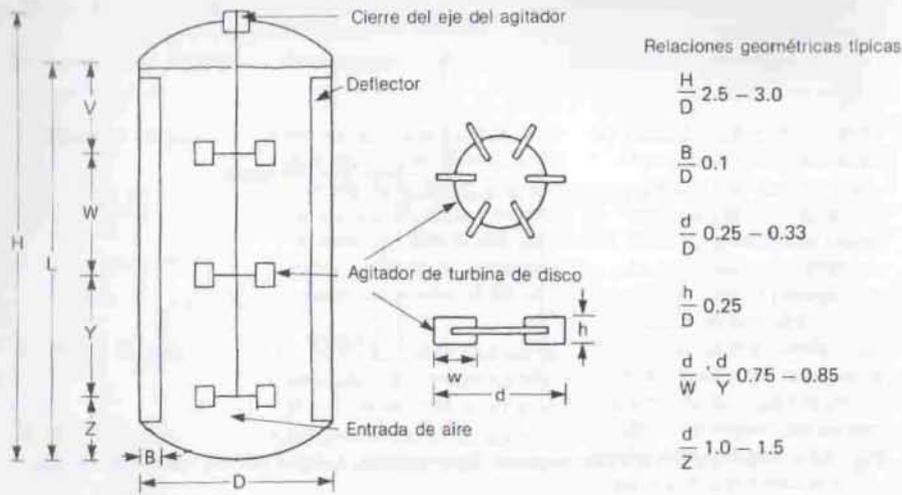


Fig. 3.5. Diagrama de un fermentador y de un agitador de turbina de disco con palas.

de viscosidad  $F$  se opone al movimiento en la interfase de las dos capas de líquido que fluyen con un gradiente de velocidad de  $dv/dx$  dado por la ecuación:

$$F = \eta A dv/dx$$

y

$$\eta = \frac{(F/A)}{dv/dx}$$

donde  $\eta$  = viscosidad del fluido o resistencia del fluido al flujo

$F/A$  = fuerza de cizalla o fuerza por unidad de área

$dv/dx$  = velocidad de cizalla o gradiente de velocidad

La viscosidad es el cociente entre la fuerza y la velocidad de cizalla, y representando una frente a otra se obtiene una línea recta para un fluido newtoniano que tiene una viscosidad constante igual a la pendiente de la recta. Mientras en un proceso de fermentación newtoniano la viscosidad no varía con la fuerza de cizalla o con la velocidad de agitación, en un fluido no newtoniano puede variar con ambas. En la Figura 3.6 se encuentran las gráficas obtenidas con un fluido newtoniano y con algunos no newtonianos. La mayoría de los polímeros se comportan como fluidos pseudoplásticos, que se caracterizan por tener una viscosidad aparente decreciente con fuerzas o velocidades de agitación crecien-

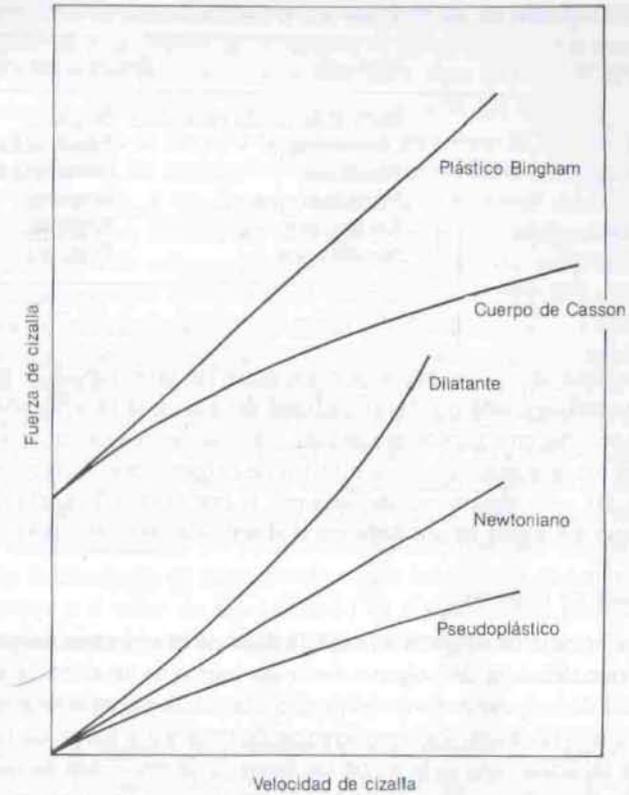


Fig. 3.6. Reogramas de fluidos con distintas propiedades reológicas.

tes. Algunos caldos de fermentación se comportan como fluidos reológicos pseudoplásticos o plásticos de Bingham (Tabla 3.2).

#### Transferencia de masa

Durante el crecimiento y metabolismo microbianos tiene lugar de forma continua la transferencia de nutrientes y metabolitos entre el medio ambiente externo y la célula. En este intercambio, cada nutriente o metabolito experimenta diversas fases pudiendo encontrarse en forma de sólido, líquido o gas. En los procesos de fermentación convencionales, la demanda microbiana de substratos distintos al oxígeno es cubierta usualmente sin dificultad, puesto que estos son suministrados en exceso en solución en el medio.

**Tabla 3.2.** Reología de los cultivos productores de micelio

Microorganismos	Producto	Reología del cultivo
<i>Comiothryum hellbari</i>	Hidroxilación de esteroides	Bingham
<i>Endomyces</i> sp.	Glucoamilasa	Pseudoplástico
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	Pseudoplástico
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomycinina	Bingham
<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Kanamycinina	Bingham
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocina	Bingham

La velocidad de transferencia de masa entre las fases líquida y gaseosa está fuertemente influenciada por la solubilidad del gas en la fase líquida. El oxígeno es poco soluble en soluciones acuosas, y en consecuencia, en muchos procesos de fermentación aerobios el suministro de oxígeno es el factor crucial determinante de las velocidades metabólicas por la que la transferencia de masa del oxígeno tiene un papel importante en el diseño del fermentador.

#### Transferencia de oxígeno

La transferencia de oxígeno a la célula durante la aireación del fermentador implica la transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire a la solución, la transferencia de oxígeno a través del medio a la célula y finalmente la absorción del oxígeno por la célula. La transferencia de oxígeno a partir de las burbujas de aire a la solución, que es la etapa limitante de la velocidad en las fermentaciones en medios no viscosos, y que es incluso aún más limitante en las fermentaciones en cultivos viscosos, puede ser descrita por la ecuación:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L)$$

donde  $C_L$  es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido ( $\text{mmol dm}^{-3}$ )

$t$  es el tiempo (h)

$dC_L/dt$  es el cambio de la concentración de oxígeno con el tiempo ( $\text{mmoles dm}^{-3}\text{h}^{-1}$ ) o la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR)

$K_L$  es el coeficiente de transferencia de masa ( $\text{cm h}^{-1}$ )

$a$  es la superficie interfacial gas-líquido por volumen de líquido ( $\text{cm}^2 \text{cm}^{-3}$ )

$C^*$  es la concentración de oxígeno disuelto en saturación ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ).

A 1 atm y 30 °C la solubilidad del oxígeno en agua es de 1,16  $\text{mmoles dm}^{-3}$ .

$K_L a$ , coeficiente de transferencia de masa volumétrica ( $\text{h}^{-1}$ ), es una medi-

da de la capacidad de aireación del fermentador en las condiciones de la prueba (a mayor valor de  $K_L a$ , mayor es la capacidad de aireación). La concentración de oxígeno disuelto en el medio del fermentador será el balance entre el suministro de oxígeno disuelto y la demanda por parte de los organismos. Cuando en el fermentador  $K_L a$  es demasiado baja para satisfacer la demanda de oxígeno de los organismos, las concentraciones de oxígeno disuelto caerán por debajo del nivel crítico ( $C_{crit}$ ), usualmente inferior a  $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Por tanto, el  $K_L a$  del fermentador deberá ser suficientemente grande como para mantener la concentración de oxígeno disuelto óptima para la formación del producto. Entre los factores que influyen en el valor de  $K_L a$  alcanzado en un fermentador de una geometría dada se incluyen la velocidad de flujo de aire, la velocidad de agitación, (por ejemplo la velocidad de rotación de los agitadores), las propiedades físico-químicas y reológicas del cultivo y la presencia de agentes antiespumantes. Cuando una fermentación se aumenta de escala es importante que en la escala mayor se utilice el valor óptimo de  $K_L a$  encontrado a escala más baja. Por consiguiente, tanto  $K_L a$  como el conocimiento de los factores que influyen en su valor son importantes a la hora de diseñar y aumentar de escala un proceso de fermentación. En particular, en las fermentaciones de fluidos no newtonianos la estrategia de aumento de escala intenta mantener constantes la velocidad punta y el valor de  $K_L a$  variando en el tanque más grande el diámetro de los agitadores frente al diámetro del recipiente.

#### Transferencia de energía

Para que el crecimiento, metabolismo y transferencia de masa se produzcan a las velocidades deseadas, debe suministrarse o eliminarse energía del reactor. Durante la esterilización y durante los procesos de control de la temperatura se intercambia calor. En el metabolismo se produce energía metabólica que se disipa en forma de calor, y tiende a elevar la temperatura del caldo de fermentación. También se puede generar calor como resultado de la energía mecánica necesaria para los procesos de agitación y de aireación. Cuando los biorreactores funcionan a temperaturas superiores a la ambiente, se necesita una fuente de calor para mantener la temperatura. Las exigencias netas de calentamiento o enfriamiento externo del fermentador se determinarán realizando un balance entre los procesos que generen y consuman calor siendo necesario usualmente utilizar cambiadores de calor. En los fermentadores la transferencia de calor se produce mediante circulación de agua a través de una camisa por el exterior del recipiente o mediante serpentines situados dentro de los reactores. Las fermentaciones aerobias son usualmente exotérmicas durante las fases de crecimiento y metabolismo activos y exigen refrigeración para controlar la temperatura.

### Potencia necesaria en el fermentador

En los fermentadores con agitación provistos de deflectores se consigue una mezcla eficaz mediante un flujo totalmente turbulento, que puede ser caracterizado por el número adimensional de Reynolds ( $N_{Re}$ )

$$N_{Re} = \frac{D^2 N \rho}{\eta} \quad (> 10^{-5} \text{ para las turbinas Rushton})$$

donde  $D$  = diámetro del agitador (cm)

$N$  = velocidad de rotación del agitador ( $\text{cm s}^{-1}$ )

$\rho$  = densidad del líquido ( $\text{g cm}^{-3}$ )

$\eta$  = viscosidad del fluido

Cuando se agita un líquido newtoniano no gasificado en un recipiente provisto de deflectores, la entrada de potencia al líquido (la potencia absorbida por el líquido) puede representarse por otro número adimensional, el número de potencia ( $N_p$ ).

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$$

donde  $P$  es la potencia externa del agitador (no gasificado)

En un fermentador agitado equipado con deflectores, el número de potencia está relacionado con el número de Reynolds mediante la ecuación:

$$N_p = C(N_{Re})^z$$

donde  $C$  es una constante dependiente de la geometría de la vasija e independiente de su tamaño y  $z$  es un exponente. Por tanto

$$\frac{P}{\rho N^3 D^5} = C \left[ \frac{(D^2 N \rho)^z}{\eta} \right]$$

de forma que los valores de  $P$  a distintos valores de  $N$ ,  $D$ ,  $\eta$  y  $\rho$  pueden determinarse experimentalmente.

Las potencias típicas para fermentadores de 100, 2.500 y 50.000 l de capacidad son de 1-2, 15 y 100 Kw respectivamente.

### OTROS DISEÑOS DE FERMENTADORES

#### Sistemas de cultivo sumergidos

En la producción de vinagre se utiliza especialmente un reactor tanque con agitación aireado modificado, el «Frings acetator». En este aparato el aire es

aspirado y distribuido mediante un rotor de turbina de cuerpo hueco de alta velocidad, conectado a una tubería de succión de aire. El aireador es autoaspirante y por tanto no se necesita aire comprimido (véase Fig. 7.8).

El reactor de tipo tanque con agitación es el biorreactor más utilizado en las fermentaciones aireadas debido a su fiabilidad y flexibilidad. No obstante, los costes de mantenimiento e inversión son relativamente elevados, y además se plantean problemas a la hora de diseñar agitadores para los fermentadores muy grandes debido a la longitud del eje del agitador. En los biorreactores sin agitación mecánica, como los biorreactores tipo torre y los de bucle, la aireación y el mezclado se llevan a cabo utilizando caudales de gas elevados.

En los fermentadores tipo torre (Fig. 3.7) el aire se introduce por la base del aparato y el mezclado se produce por las burbujas ascendentes, de forma que la fuerza de cizalla que sufren los organismos es mínima. Este tipo de fermentadores se ha utilizado para producir ácido cítrico, con gránulos de *A. ni-*

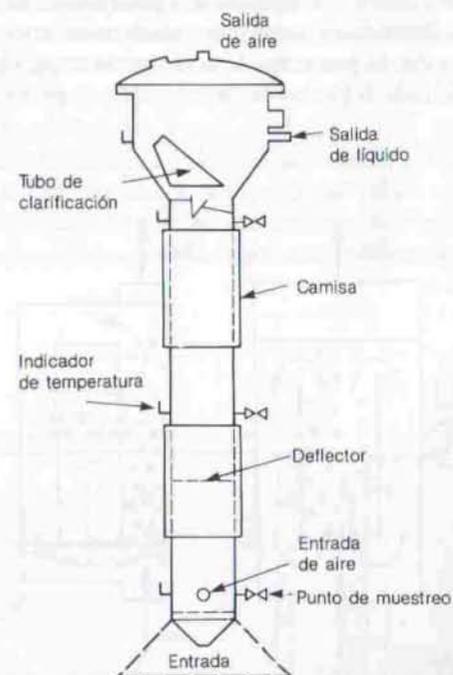


Fig. 3.7. Fermentador tipo torre (reproducido con permiso de Kristiansen y Chamberlain, 1983).

ger y cepas de *Candida guilliermondii*, y también para la producción de vinagre, alcohol industrial y cerveza. Como el mezclado vertical es relativamente malo en los fermentadores de tipo torre, se puede operar de forma continua, con alimentación por la parte baja y salida por la parte alta, consiguiéndose así una retención de biomasa elevada. En los fermentadores tipo torre no aireados, utilizados en la producción de cerveza o de alcohol industrial, la retención de biomasa es máxima cuando se emplean levaduras de fermentación con buenas propiedades floculantes.

El biorreactor de bucle impulsado por aire contiene un tubo interno o externo, a veces con deflectores, que incrementa el mezclado al forzar un flujo direccional en el seno del líquido (Fig. 3.8). La fuerza impulsora de la circulación se crea por la diferencia de densidad (debida a diferencias en la cantidad de burbujas de aire dispersadas) entre las secciones de flujo ascendente y descendente. En el reactor de este tipo diseñado por ICI, por ejemplo, el aire se introduce por la base del fermentador y pasa a la solución por la presión hidrostática de la columna (véase Figs. 6.1a y 6.1e). En el capítulo 6 podrá verse que se han utilizado con éxito diseños similares para la producción de biomasa a partir de organismos unicelulares. En el cultivo de caldos micelianos filamentosos viscosos para la producción de proteínas de organismos unicelulares se han desarrollado sistemas de agitación y tubo de recirculación combinados (véase Fig. 6.1f).

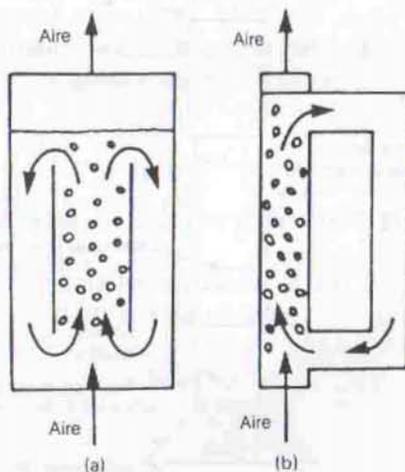


Fig. 3.8. Biorreactor con bucle interno (a) y externo (b) (reproducido con permiso de Smith, 1985).

En las fermentaciones industriales con células de animales y plantas, más susceptibles a sufrir daños por las fuerzas de cizalla que las células microbianas, se han aprovechado las ventajas del menor efecto de cizalla de los fermentadores agitados por aire.

En los sistemas de tratamiento de aguas residuales con lodos activados se han utilizado algunas variaciones de estos tipos de reactores de cultivo sumergido. El proceso convencional se basa en la agitación vigorosa con aire u oxígeno inyectado por difusores de burbujas, paletas, agitadores, etc. (Fig. 3.9). También se han desarrollado sistemas de cultivo sumergido basados en los fundamentos del fermentador de bucle impulsado por aire (Fig. 3.10).

Los recientes y dramáticos progresos en el cultivo de células de animales y en la tecnología de hibridomas han conducido al desarrollo de nuevos procesos de cultivo industriales para la elaboración de productos derivados de células animales. La forma más simple de crecimiento de células de mamíferos es en cultivos en suspensión. La mayoría de las células de origen leucémico o linfóide crecen como células individuales en cultivos en suspensión estacionarios o agitados. Muchas células dependientes de anclaje pueden no crecer en cultivos en suspensión, a menos que se empleen procedimientos especiales. El método más prometedor en tales casos utiliza perlas microtransportadoras, fabricadas con polímeros naturales o sintéticos, como soportes de las células. Entre los problemas asociados con la producción a gran escala de células animales en cultivos en suspensión se incluyen las densidades celulares limitadas conseguibles en los sistemas de cultivo convencionales y la sensibilidad de las células a las fuerzas de cizallas. Se han utilizado fermentadores agitados suavemente de forma mecánica o por aire, así como reactores de tipos más modernos. La encapsulación

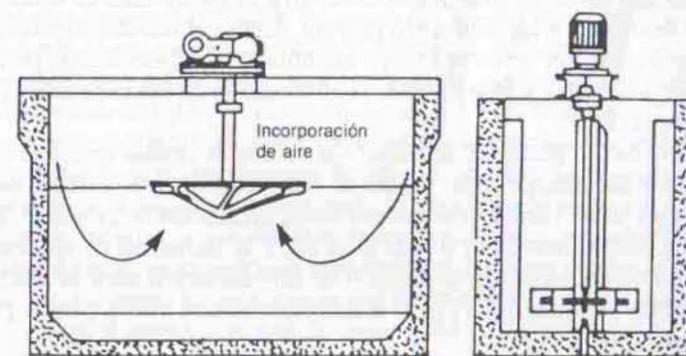


Fig. 3.9. Biorreactor de lodos activados (reproducido con permiso de Smith, 1985).

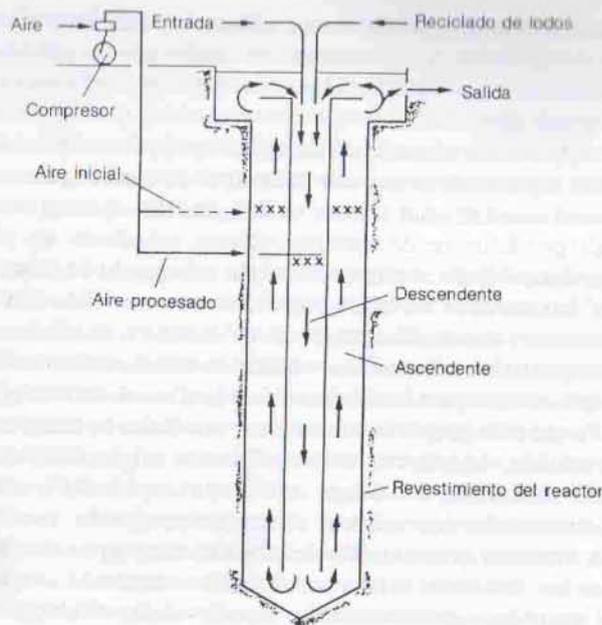


Fig. 3.10. Planta de tratamiento de efluentes del tipo de pozo profundo. (Reproducido con permiso de Wheatley, 1984).

de células de hibridoma en perlas de alginato permite emplear reactores de tipo tanque con agitación, produciéndose concentraciones elevadas de células y anticuerpos dentro de la cápsula. Otro método implica el uso de sistemas de perfusión, equipados con tubos porosos y membranas semipermeables para el suministro de nutrientes y gases y para la eliminación de los productos y de los metabolitos tóxicos.

El diseño de biorreactores destinados al cultivo de células vegetales debe tener en cuenta las características únicas de tales células: gran tamaño, sensibilidad a las fuerzas de cizalla, crecimiento lento, formación de producto durante las fases de crecimiento lento o estacionarias, y la necesidad de que exista un cierto grado de contacto célula-célula o de diferenciación para la producción de metabolitos secundarios. El cultivo en suspensión se utiliza para la producción industrial de shikonina.

### Fermentaciones en sustratos sólidos

Las fermentaciones en sustratos sólidos, utilizadas para el cultivo de microorganismos en materiales sólidos que contienen o no una cantidad limitada de agua libre, se emplean en la obtención de enzimas fúngicos por cultivos en superficie y en la producción de champiñones así como en otras aplicaciones. Los sustratos utilizados más comúnmente son el salvado de trigo, los granos de cereal, las legumbres, la madera y la paja. Los microorganismos que crecen bien en las fermentaciones en sustratos sólidos son usualmente organismos que pueden tolerar una actividad del agua baja ( $A_w$ ).

Los microorganismos tienen respuestas distintas frente a la actividad del agua, de forma que por ejemplo, con una  $A_w$  inferior a 0,95 se inhibe el crecimiento bacteriano, en tanto que los mohos y las levaduras pueden crecer a una  $A_w$  de aproximadamente 0,7. Las fermentaciones en sustrato sólido se llevan a cabo de diferentes formas dependiendo de si los microorganismos utilizados son los indígenas o cultivos aislados puros. La elaboración del compost para la producción de champiñones implica las actividades sucesivas de un amplio rango de poblaciones de microorganismos indígenas que van desde las bacterias mesofílicas, las levaduras y los mohos hasta los hongos termofílicos y los actinomicetos. El proceso tradicional Koji para la fermentación de granos y habas de soja y los procesos similares para la producción de enzimas industriales a partir de mohos, ambos con cultivos de *Aspergillus oryzae* y especies relacionadas, son ejemplos de fermentaciones en sustratos sólidos que utilizan cultivos fúngicos puros.

Puesto que la mayoría de las fermentaciones en sustratos sólidos son aerobias, las condiciones de fermentación deben diseñarse de forma que la transferencia de oxígeno y la eliminación de  $CO_2$  del sustrato sean eficaces. Debido a las elevadas concentraciones de sustrato por unidad de volumen, el calor generado también por unidad de volumen durante la fermentación es usualmente mucho mayor que en las fermentaciones líquidas, y el contenido menor de humedad hace más difícil su eliminación. La elección del tamaño de partícula del sustrato es de importancia crítica para optimizar los espacios vacíos interpartículas que faciliten la transferencia de gases y de calor. La eliminación de calor puede verse facilitada incrementando la velocidad de aireación del sistema.

Entre las ventajas de los sistemas de fermentación sobre sustratos sólidos en las fermentaciones industriales se encuentran la mayor productividad y simplicidad de la técnica, los menores costos de inversión, la reducción del consumo energético, el menor volumen de aguas residuales producidas y la ausencia de problemas debidos a la formación de espuma, aunque también tienen limitaciones, como la acumulación de calor, la contaminación bacteriana, los pro-

blemas de aumento de escala y la dificultad de controlar el nivel de humedad del sustrato.

Como ejemplos de diseño de fermentadores con sustratos sólidos se pueden citar los sistemas de agitación continua lenta (como los tambores rotatorios), los sistemas de cubetas y los de flujo de aire, en los que se insufla aire acondicionado a lo largo del lecho de sustrato en una cámara de cultivo (Fig. 3.11). Los tambores rotatorios están equipados usualmente con una entrada y una salida para la circulación de aire humidificado y con frecuencia contienen deflectores o secciones para agitar el contenido. Los fermentadores de cubetas tienen capas de sustrato de 1-2 pulgadas de espesor apiladas en cámaras que generalmente están ventiladas con aire humidificado. En las cámaras de cultivo

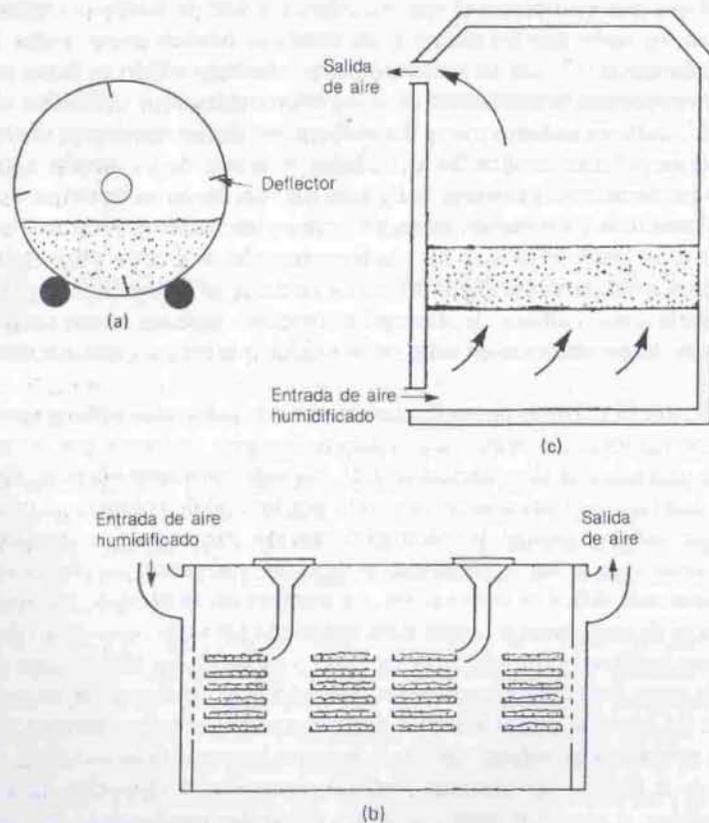


Fig. 3.11. Fermentadores en sustrato sólido. (a) Tambor rotatorio, (b) sistema de cubetas, (c) sistema de flujo de aire forzado.

con circulación forzada de aire se controla la temperatura del lecho ajustándose a la del flujo de aire reciclado.

### Instrumentación y control

Los fermentadores están equipados con instrumentos que se utilizan para facilitar el análisis y registro de parámetros específicos, para ayudar a establecer las condiciones óptimas del proceso de fermentación y para optimizar el proceso de producción. El control de un parámetro particular se lleva a cabo con un sensor que mide la propiedad y con un controlador que compara esta medida con un valor fijo predeterminado y que activa el equipo hasta ajustar el valor de la propiedad a éste. El ajuste implica usualmente la modificación del estado de una válvula de apertura o la velocidad de una bomba dosificadora.

Los sensores pueden estar «on line», es decir, conectados a la instalación del fermentador o en contacto con la corriente, o «off-line», de los cuales se toma asépticamente una muestra para análisis. Los sensores «on line» de los fermentadores comunes se utilizan para medir propiedades físicas como la temperatura, la presión, las r.p.m., del agitador, las velocidades del flujo de líquidos y gases y para medidas físico-químicas como el pH y las concentraciones de gas en las fases líquida y gaseosa. Los sensores «on-line» en contacto con el medio del fermentador, incluyendo electrodos de pH y sondas medidoras de gas disuelto deben ser esterilizables con vapor de agua, fácilmente calibrables y dar una lectura continua fiable. En la Tabla 3.3 se describen algunos de los sistemas de medida «on-line» más importantes.

El método que nos da más información acerca del estado de la fermentación es probablemente el análisis del gas de salida. Los métodos de análisis del  $O_2$  mediante procedimientos paramagnéticos y del  $CO_2$  mediante análisis con infrarrojos tienen las desventajas de la necesidad de calibrado y de su lento tiempo de respuesta. Los espectrómetros de masas pueden operar sin atención personal durante largos períodos de tiempo y medir  $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$  y otros gases con un alto grado de precisión, y cuando se acoplan a una computadora pueden suministrar datos útiles como los coeficientes respiratorios ( $CR = CO_2$  producido/ $O_2$  consumido) y la velocidad de absorción de oxígeno. Su rápida velocidad de respuesta hace que algunos espectrómetros de masa hayan sido incorporados a muchos fermentadores mediante tuberías de empalme múltiple muestreadoras con objeto de obtener datos acerca de cada corriente gaseosa.

Aunque los análisis «off-line» aún se utilizan para medir muchos sustratos, metabolitos, enzimas, constituyentes celulares y biomasa, la tendencia ac-

Tabla 3.3. Sistemas de medida de fermentación on-line

Parámetro	Equipo de medida	Fundamentos de la medida (comentarios)
Temperatura	Termómetros y termistores de resistencia eléctrica	Cambios de resistencia eléctrica con la temperatura
Presión	Manómetro de presión de Bourdon	La sección transversal elíptica de una espira parcialmente hueca tiende a volverse circular, enderezándose gradualmente a medida que aumenta la presión en su interior
	Sensor de presión de diafragma	Movimiento de un diafragma en respuesta a los cambios de presión
Contenido del aparato	Manómetros de tensión electrónica	Cambios de la resis. eléctrica cuando un alambre está sujeto a tensión
	Medida de la carga celular (peso)	El peso de la vasija se mide mediante un manómetro de tensión, la resistencia eléctrica es proporcional a la carga
Espuma	Sensor del nivel del líquido utilizando sondas de capacidad (volumen)	Cambios de la capacitancia de la sonda con el nivel de líquido
	Sondas metálicas de espuma aisladas en el extremo colocadas a diferentes niveles	La espuma toca el extremo de la sonda completa un circuito eléctrico que actúa como un dispositivo de alimentación antiespuma (la condensación de humedad a lo largo del exterior del aislamiento puede inutilizar el sistema)
r.p.m. del agitador	Tacómetro	Mecanismos de detección mediante inducción, generación de voltaje, sensores de luz o fuerzas magnéticas
Velocidad de flujo gaseoso	Rotámetro	La posición de un flotador que se mueve libremente en un tubo con diámetro creciente montado verticalmente indica la velocidad de flujo
	Medidor térmico del flujo de masa	Detección de una diferencia de temperatura a lo largo de un dispositivo calefactor colocado en el paso de gas
Flujo líquido	Agitadores, turbinas, rotámetros	Sistemas graduados para indicar la velocidad de flujo (no adecuados para uso aséptico)

Tabla 3.3. (continuación)

Parámetro	Equipo de medida	Fundamentos de la medida (comentarios)
	Transductor de flujo eléctrico	El flujo de líquido en un campo magnético es tal que el voltaje inducido es proporcional a la velocidad relativa del fluido y al campo magnético. (Puede utilizarse asépticamente)
	Bombas de medida tipo diafragma y bombas peristálticas	Medida indirecta de la velocidad de flujo mediante bombas precalibradas (adecuado para medidas y bombeos asépticos)
pH	Electrodo de referencia de vidrio combinado	Medidas potenciométricas de la concentración de iones hidrógeno
O <sub>2</sub> disuelto	Electrodo de O <sub>2</sub>	Los electrones producidos por la interacción del oxígeno con una superficie metálica generan una corriente. La sonda contiene una membrana a través de la cual puede difundirse oxig.
CO <sub>2</sub> disuelto	Electrodo de CO <sub>2</sub>	El sensor es una sonda de pH rodeado por una solución HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> , cuyo pH viene influenciado por los iones HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . El sensor contiene una membrana permeable a los iones HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> . (Electrodos caros y poco fiables)
O <sub>2</sub> en fase gaseosa	Análisis paramagnético de gases	Sistemas de análisis térmico y deflexión basados en la fuerte afinidad del oxígeno por un campo magnético
CO <sub>2</sub> en la fase gaseosa	Análisis infrarrojo	El CO <sub>2</sub> absorbe en el infrarrojo. (La medida del O <sub>2</sub> y el CO <sub>2</sub> de la fase gaseosa se lleva a cabo usualmente en la salida del fermentador). Normalmente se supone que las concentraciones de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> en el aire entrante son de 20,91 % y 0,03 % respectivamente
Análisis general de gases	Espectrometría de masas	Las moléculas de gas que entran al instrumento se ionizan y aceleran al atravesar un campo magnético. Los fragmentos de moléculas de masas diferentes se desvían en grados diferentes y son recogidos y medidos

tual hacia procesos de control más automatizados ha desembocado en una demanda obvia hacia métodos que puedan medir cuantitativamente moléculas biológicas «on-line». Algunos de los sistemas de control «on-line» automáticos existentes pueden aplicarse a los fermentadores, siempre que los problemas de muestreo aséptico de la fase líquida puedan resolverse utilizando técnicas de muestreo con microfiltración. Por ejemplo, cuando se emplean métodos de filtración o de diálisis es posible el control «on-line» con HPLC.

Se ha desarrollado una nueva generación de biosensores altamente específicos, destinados predominantemente a aplicaciones clínicas, basados en el establecimiento de una interfase entre enzimas inmovilizados y sensores electroquímicos. Por ejemplo, en la actualidad para el control de algunos procesos puede utilizarse un electrodo de glucosa esterilizable o un electrodo sensible al alcohol. El desarrollo de biosensores «on-line» que aprovechan los cambios conformacionales producidos en las proteínas con actividad enzimática a medida que interactúan con los sustratos, o las propiedades donador/aceptor de electrones de las moléculas biológicas darán lugar indudablemente a un mayor nivel de sofisticación en el control de los procesos de fermentación.

Las computadoras pueden utilizarse en los procesos de fermentación para procesar los datos suministrados por los sensores, pudiendo analizar los datos, presentar el análisis en dispositivos al efecto, y almacenarlos o utilizarlos para controlar el proceso mediante señales que activen conmutadores, válvulas y bombas. Las operaciones de procesamiento de datos deben incluir el cálculo de velocidades, rendimientos, productividad, coeficientes respiratorios, etc. El almacenamiento y organización de los datos relativos al proceso de fermentación mediante computadoras es un componente extremadamente importante en la mayoría de los procesos industriales de fermentación. Además de mantener los registros de cada lote con objeto de asegurar la calidad, y para su inspección por las autoridades reglamentarias, con frecuencia se han conseguido mejoras significativas del proceso analizando juiciosamente los registros del proceso. Los sistemas de control del proceso pueden consistir simplemente en la implantación automática de operaciones secuenciales, por ejemplo un ciclo de esterilización. Además, pueden mantenerse las propiedades medioambientales en los puntos clave mediante control digital, de forma que la computadora compare los valores de salida y las medidas en un punto. Por otra parte, las condiciones medioambientales pueden mantenerse mediante control digital directo colocando los sensores en interfase directa con la computadora, no necesitándose unidades de control individual. En la Figura 3.12 se muestran los elementos clave de un sistema de fermentación controlado por computador.

Un sistema de fermentación integrado totalmente computerizado necesita modelos del proceso detallados capaces de detectar y responder a cambios en las condiciones de cultivo que puedan influir en la fisiología celular y en la pro-

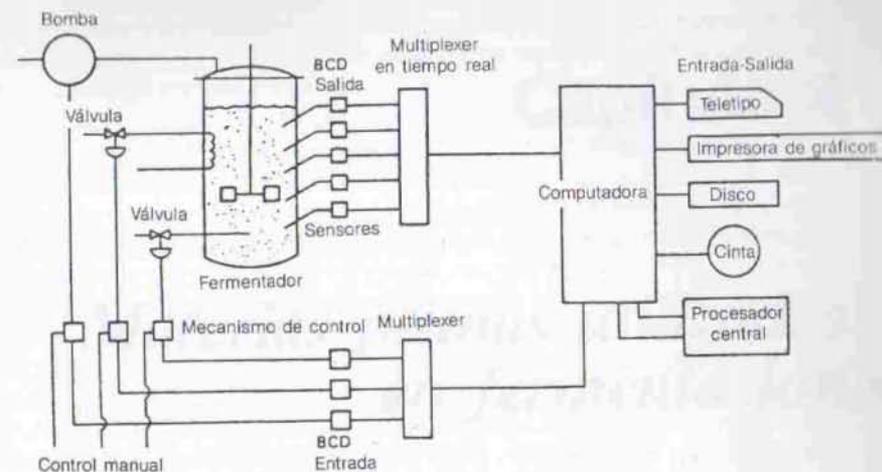


Fig. 3.12. Componentes esenciales de un biorreactor controlado por computadora (reproducido con permiso de Wilson, 1984).

ductividad. Las computadoras también se pueden utilizar para investigar en fermentación y desarrollar estrategias que optimicen el crecimiento y la formación de producto. Finalmente, la programación de la operación global de una planta de fermentación multiunidades, incluyendo el procesamiento corriente arriba y corriente abajo, puede realizarse con una computadora centralizada.

## Capítulo 4

### *Materias primas utilizadas en fermentación*

#### **Criterios utilizados en la formulación del medio**

Los medios utilizados en las fermentaciones industriales deben contener todos los elementos necesarios para la síntesis del material celular y para la formación de producto; además, deben satisfacer los objetivos técnicos del proceso ofreciendo un medio ambiente favorable para el crecimiento y/o formación de producto y al mismo tiempo ser económicamente rentables. Muchos procesos de fermentación se desarrollan en diversas etapas (desarrollo a pequeña escala y crecimiento del inóculo, crecimiento microbiano y formación de producto en el fermentador de producción) de forma que cada etapa tiene unos objetivos técnicos y unas necesidades particulares en cuanto a medios. Usualmente, en las etapas de desarrollo y de aumento de escala del inóculo, el objetivo es conseguir velocidades de crecimiento altas para disponer de niveles elevados de biomasa viable y en una forma fisiológica adecuada para ser utilizada como inóculo en la siguiente etapa. Cuando el producto final deseado sea la biomasa viable o proteínas de organismos unicelulares, el diseño del medio y de las condiciones de fermentación deben permitir velocidades de crecimiento elevadas y altos rendimientos de biomasa de células viables o de células con una composición adecuada para ser utilizadas como proteínas de organismos unicelulares. Cuando el producto final sea un producto celular, por ejemplo un enzima (u otra proteína) o un metabolito, la situación es más compleja. Si el producto está

asociado al crecimiento, el medio debe satisfacer simultáneamente las necesidades para el crecimiento celular y para la formación de producto de forma óptima. Cuando el grueso de formación de producto se obtiene después del crecimiento celular, el medio debe ser tal que inicialmente las células que tengan propiedades fisiológicas adecuadas se produzcan eficazmente durante la fase exponencial después de la cual las condiciones deben favorecer la síntesis de producto a una velocidad óptima haciendo que los rendimientos de producto final sean máximos. En muchos productos industriales obtenidos predominantemente después de la fase de crecimiento exponencial, por ejemplo enzimas y antibióticos, se observa con frecuencia la existencia de una velocidad óptima lineal de formación de producto durante la fase post-exponencial, por lo que el objetivo clave consistirá en controlar el medio y las condiciones medioambientales de forma que esta fase de producción lineal sea lo más larga posible.

#### INFLUENCIA DEL MEDIO EN EL CRECIMIENTO CELULAR

Los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, minerales, a veces factores de crecimiento, agua y (si son aerobios) oxígeno para formar su biomasa y como fuente de energía para la biosíntesis y mantenimiento celular. La composición elemental de la mayoría de los microorganismos es muy similar, y en consecuencia puede utilizarse como punto de partida para diseñar un medio de fermentación óptimo. Los valores típicos para el C, H, O, N y S, en tanto por ciento en peso de células secas, son 45, 7, 33, 10 y 2,5, respectivamente. También pueden ser necesarios elementos traza como Cu, Mn, Co, Mo, B y posiblemente otros metales, dependiendo de la fuente de agua utilizada. Algunos microorganismos crecen en un medio que no contiene factores de crecimiento, mientras que otros necesitan medios complejos que contienen nutrientes específicos como aminoácidos, vitaminas o nucleótidos. Sin embargo, los organismos que no necesitan estos suplementos tienen frecuentemente velocidades de crecimiento substancialmente más elevadas en medios complejos. Los factores de crecimiento específicos pueden añadirse al medio en forma de compuestos químicos puros, por ejemplo, biotina en las fermentaciones para obtener ácido glutámico, o más usualmente como componentes de fuentes de nitrógeno más ordinarias, por ejemplo extractos de maíz. Prácticamente en todas las fermentaciones industriales el carbono suministra la energía para el crecimiento, así como los átomos de carbono para la biosíntesis. La cantidad de carbono necesaria en condiciones aerobias puede determinarse a partir del coeficiente de rendimiento de biomasa

$$\gamma_c = \frac{\text{Biomasa producida (g)}}{\text{Substrato de carbono utilizado (g)}}$$

En el Capítulo 2 ya se ha discutido la influencia de condiciones medioambientales relacionadas con el medio como el pH, la concentración de sustrato, etc., en la velocidad de crecimiento.

#### FORMACION DE PRODUCTO

Cuando la formación de producto depende de inductores, debe incorporarse al medio el inductor específico o un análogo estructural y a veces mantenerse en él a lo largo del proceso mediante adiciones continuas o discontinuas. De la misma forma, si la formación de producto está sujeta a la represión por el catabolito por sustratos como glucosa y otros carbohidratos, es necesario utilizar un mutante sin esta regulación o suministrar el carbohidrato en forma continua o discontinua pero de modo que sus niveles permanezcan por debajo de la concentración crítica necesaria para la represión. Muchos procesos de producción de enzimas están sujetos a inducción y/o represión por el catabolito. En las fermentaciones para obtener metabolitos secundarios la baja productividad está asociada frecuentemente con la presencia en el medio de concentraciones elevadas de fuentes de carbono rápidamente metabolizables.

Una fuente de nitrógeno utilizable rápidamente inhibe la producción de algunos antibióticos. En los hongos, el ión amonio impide la absorción de aminoácidos por acción de las aminoácido permeasas tanto generales como específicas; también impide la asimilación de nitrato en muchos microorganismos, de forma que el nitrato únicamente se utiliza como fuente alternativa de nitrógeno cuando se ha agotado el amonio.

La concentración de ciertos minerales es crítica en algunas fermentaciones. Muchas fermentaciones para la producción de metabolitos secundarios necesitan que la concentración de fosfato inorgánico sea baja durante la fase de producción, interviniendo a veces el calcio en la precipitación del exceso de fosfato. Las concentraciones de elementos traza como hierro y/o zinc tienen unos efectos críticos en la producción de penicilina, actinomicina, cloranfenicol, neomicina, griseofulvina y riboflavina. La concentración de manganeso es importante en la producción de bacitracina y ácido cítrico. Algunos de los efectos de estos metales se explican en función de su activación o inhibición de determinadas actividades enzimáticas.

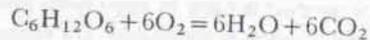
En algunas fermentaciones, por ejemplo en la producción de algunos antibióticos, vitaminas y aminoácidos, se añaden precursores al medio que se incorporan directamente al producto. Por ejemplo, el ácido fenilacético es el principal precursor utilizado en la producción de bencilpenicilina por fermentación.

La optimización de la producción de algunos metabolitos requiere la incorporación de inhibidores específicos al medio, bien para minimizar la formación

de otros intermediarios metabólicos o bien para prevenir el metabolismo posterior del producto deseado. En la producción de tetraciclina mediante *Streptomyces*, el ión bromuro impide la formación de clorotetraciclina y en la producción de glicerol mediante *Saccharomyces cerevisiae*, el bisulfito sódico impide la reducción del acetaldehído, de forma que la reoxidación del  $\text{NADH} + \text{H}^+$  implica la conversión de dihidroxiacetona fosfato en glicerol-3-fosfato, que a su vez se transforma en glicerol.

#### OXIGENO

La mayoría de los procesos de fermentación son aerobios, por lo que requieren el suministro de oxígeno como materia prima. La oxidación completa de la glucosa, representada por la ecuación



necesita 192 g de oxígeno para oxidar 180 g de glucosa. Suponiendo que los únicos productos extracelulares que se forman son el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$ , se necesitan aproximadamente 0,4 g de oxígeno para producir 1 g de peso seco bacteriano a partir de glucosa.

Además de esta demanda global de oxígeno, los procesos metabólicos se ven influenciados por la concentración de oxígeno disuelto en el medio. La relación entre la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad de absorción específica de oxígeno ( $Q_{\text{O}_2}$ , mmoles de  $\text{O}_2$  consumidos por g de peso seco de células por hora) sigue la ecuación típica de Michaelis-Menten (Fig. 4.1), por lo que para mantener la producción de biomasa al máximo, el nivel de oxígeno disuelto debe estar por encima de la concentración crítica ( $C_{\text{crit}}$ ). Los niveles de oxígeno disuelto para que la velocidad de formación de producto sea óptima pueden ser totalmente distintos a los de las  $C_{\text{crit}}$ . En general, para mantener la producción de metabolitos resultantes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos parecen ser necesarias concentraciones de oxígeno disuelto superiores a la  $C_{\text{crit}}$ , mientras que para la producción de metabolitos no provenientes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, a partir del fosfoenolpiruvato y piruvato, parecen necesitarse concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a la  $C_{\text{crit}}$ .

#### EFFECTOS COMBINADOS

Los efectos de los constituyentes del medio y del oxígeno en el crecimiento y formación de producto son complejos y están frecuentemente interrelaciona-

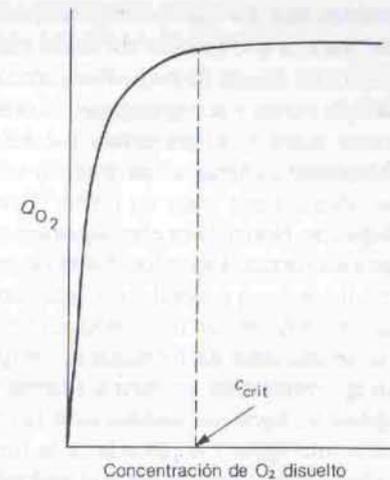


Fig. 4.1. Efecto de la concentración de oxígeno sobre la velocidad de absorción específica de oxígeno ( $Q_{\text{O}_2}$ ) de un microorganismo.

dos. La observación de que el rendimiento de biomasa de levadura a partir de azúcar es superior y el de alcohol es inferior en presencia de oxígeno, comparados con los obtenidos en condiciones anaerobias, se conoce como efecto Pasteur. Sin embargo, a concentraciones de glucosa superiores a los 250-300  $\text{mg l}^{-1}$ , incluso en condiciones aerobias, los enzimas oxidantes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de los sistemas citocromo son reprimidos por los catabolitos y el rendimiento de biomasa baja al convertirse la mayor parte del azúcar en alcohol. En este caso, el menor rendimiento de biomasa se debe a la represión por el catabolito. En las fermentaciones industriales destinadas a la producción de metabolitos primarios y secundarios, la sobreproducción de biomasa reduce el rendimiento del producto. En la producción de metabolitos primarios, si la proporción de sustrato convertido en biomasa es demasiado grande, el rendimiento del metabolito es menor. La producción de algunos metabolitos parece necesitar una fisiología celular atrofiada. La sobreproducción de biomasa impide el comienzo de la producción de metabolitos secundarios. Las concentraciones elevadas de biomasa fúngica pueden ser perjudiciales para los procesos de formación de producto que requieran oxígeno, al limitar la velocidad de transferencia de este elemento.

#### FISIOLOGIA Y MORFOLOGIA

Los constituyentes del medio pueden influir profundamente en la fisiología de los microorganismos y con frecuencia la optimización del proceso de forma-

ción de producto va asociada con formas fisiológicas particulares. En las fermentaciones optimizadas para la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*, el micelio se encuentra en forma de pequeños gránulos micelianos duros y las hifas son anormalmente cortas y achaparradas. Para la producción de ácido itacónico con *A. terreus* también es preferible el crecimiento en forma de gránulos. A partir de *Rhizopus arrhizus* se obtiene un mayor rendimiento de ácido fumárico si el crecimiento tiene lugar en forma filamentosa; también en la producción de penicilina con *Penicillium chrysogenum* se prefiere en general que el crecimiento sea en esta forma. Las velocidades de crecimiento miceliano y de asimilación de nutrientes son en general significativamente mayores cuando el crecimiento se produce en forma de filamentos en vez de en forma de gránulos. Por tanto, para la producción de biomasa se prefieren las condiciones del medio que induzcan el crecimiento en forma filamentosa.

En las cepas de *Streptomyces griseus* destinadas a la producción de estreptomycin, la fragmentación miceliana y la pérdida de la formación de conidios, y un cambio progresivo hacia morfologías de tipo nocardial, están asociados con la degeneración del cultivo y con la capacidad de producir antibióticos.

Entre las condiciones relacionadas con el medio que han demostrado tener influencia en la morfología se encuentran la viscosidad, el pH, los cationes divalentes, los agentes quelantes, los polímeros aniónicos, los agentes tensioactivos y la presencia de sólidos. Por ejemplo las hifas del *P. chrysogenum* se vuelven más cortas y gruesas a medida que el pH es más alcalino, y en consecuencia forman gránulos; las substancias poliméricas añadidas al medio tienden a causar un crecimiento filamentoso disperso. El carbopol, un polímero del carboxipolimetileno, el ácido alginico y la carboximetilcelulosa inducen el crecimiento filamentoso en especies como *P. chrysogenum*, *A. niger* y *R. Arrhizus*. Los cationes divalentes inducen frecuentemente al crecimiento en forma de gránulos, y sus efectos pueden contrarrestarse con la adición simultánea de agentes quelantes o cambiadores iónicos, como por ejemplo polímeros aniónicos. Muchas observaciones sugieren que los cationes divalentes pueden contribuir a la formación de gránulos al interaccionar con grupos aniónicos de las superficies celulares, uniendo paredes de células adyacentes mediante puentes salinos o venciendo las fuerzas repulsivas de las superficies cargadas negativamente, facilitando así la formación de gránulos. A veces se producen interacciones célula-célula entre distintas esporas en una etapa previa a su germinación y que conducen a la formación de gránulos, mientras que en otros casos es necesaria la presencia de hifas micelianas. Sin duda estas interacciones dependientes de la carga se ven influidas directamente por los constituyentes iónicos del medio. También es de esperar que las condiciones medioambientales, incluyendo el medio, que alteren la composición de la superficie de la célula, influyan en su morfo-

**Tabla 4.1.** Efecto del manganeso en la composición de la pared celular de *A. niger* (calculados según los datos de Kisser *et al.*, 1980)

Composición de la pared celular (%)	Deficiencia de manganeso	Suplemento de manganeso
$\alpha$ -Glucano	66.4	59.0
$\beta$ -Glucano	7.0	18.2
Quitina	20.0	6.8
Proteína	2.4	2.9
Galactomanano	3.7	12.6
Galactosamina		
Lípidos	0.5	0.5

gía. Se ha demostrado que la composición de la pared celular de *A. niger* se ve significativamente influenciada por el manganeso (Tabla 4.1).

También se ha demostrado que la presencia de cationes influye en la floculación de las levaduras, y que los componentes celulares de las levaduras están implicados en su entrecruzamiento. El fenómeno de la floculación de las levaduras es importante en su sedimentación y eliminación en la producción de bebidas alcohólicas no destiladas. El empleo de cepas de levaduras que floculan y sedimentan rápidamente en los procesos de fermentación continua para la producción de alcohol, mediante fermentadores verticales de flujo ascendente, permite que las levaduras sedimenten y se separen de la cerveza incrementando la densidad celular en el fermentador sin el empleo de centrifugas.

La obtención de algunos productos microbianos está asociada con la formación de esporas, mientras que la síntesis de otros resulta inhibida por este mismo fenómeno. La esporulación puede regularse modificando el medio de cultivo. En general los niveles bajos de nitrógeno en forma compleja inducen la formación de esporas, en tanto que las concentraciones elevadas de aminoácidos la inhiben.

El medio de cultivo puede manipularse de forma que se vea afectada la permeabilidad de la célula. En las fermentaciones para obtener ácido glutámico la limitación de la cantidad de biotina inhibe la biosíntesis completa del ácido oleico por las bacterias productoras y modifica la permeabilidad de la célula de forma que el ácido glutámico puede ser excretado al medio. Los antibióticos, por ejemplo la penicilina, que inhiben la formación de peptidoglicanos entrecruzados, dan lugar a la formación de células hinchadas que también excretan ácido glutámico al medio. Se ha demostrado que algunos agentes tensoactivos aumentan la velocidad de secreción de los enzimas microbianos extracelulares.

## MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS PARA EL CONTROL DEL PROCESO

Entre las materias primas utilizadas directamente para el control del proceso se encuentran los tampones, ácidos y álcalis para el control del pH, los antiespumantes para impedir la formación de espumas y los nutrientes que evitan problemas tales como la represión por el catabolito.

*Control del pH*

Con frecuencia se añade fosfato inorgánico en exceso a los procesos de fermentación debido a su buena capacidad tamponante en la región de pH comprendida entre 6,0 y 7,5. Los ácidos orgánicos se pueden utilizar también como agentes tamponantes para valores de pH inferiores. El medio también puede ser tamponado eficazmente frente a la producción de ácido mediante el empleo de carbonato cálcico. El pH puede controlarse también con la adición de hidroxisales, amoniaco líquido o gaseoso y ácidos sulfúrico y clorhídrico.

El pH del medio se controla con frecuencia de forma indirecta mediante un balance equitativo entre las fuentes de carbohidrato y nitrógeno. Los carbohidratos contribuyen frecuentemente a reducir el pH debido a la formación de ácidos orgánicos, y las sales de amonio producen usualmente condiciones ácidas debido a la liberación del ácido libre durante la asimilación del ión amonio. La asimilación del nitrato puede dar lugar a alcalinidad, aunque cuando se añade en forma de nitrato amónico se asimila preferencialmente el ión amonio. Las fuentes orgánicas de nitrógeno, como las proteínas hidrolizadas, el extracto de maíz y los solubles de destilería pueden hacer que el pH evolucione hacia la alcalinidad. Al manipular el pH del medio de esta manera hay que tener en cuenta los posibles efectos represivos de los constituyentes utilizados sobre la formación de producto.

*Espuma*

La espuma se produce frecuentemente en las fermentaciones debido a la desnaturalización de las proteínas en la interfase gas-líquido. Si no se controla, la espuma puede ir ascendiendo hasta ocupar totalmente la cabeza del fermentador y eventualmente puede dar lugar a la evacuación de gran parte del contenido del aparato a través de la salida de aire utilizado; además también puede causar la eliminación de células del medio.

Los antiespumantes son agentes tensoactivos que actúan reduciendo la tensión superficial de las espumas hasta dispersarlas. Estos compuestos varían en su eficacia con las condiciones de fermentación (composición del medio, cepas microbianas, etapa del crecimiento, configuración de las vías de aireación y del fermentador) y la selección del tipo de antiespumante se basa frecuentemente

en procedimientos de ensayo y error. Muchos antiespumantes tienen baja solubilidad y necesitan un soporte, como un aceite orgánico o mineral.

La cantidad de antiespumante debe ser mínima, puesto que puede afectar la velocidad de transferencia de oxígeno hasta un 50 %. Además, estos productos no deben ser tóxicos ni peligrosos, deben ser esterilizables por el calor y baratos. También pueden utilizarse rompedores mecánicos de espumas como alternativa a los agentes antiespumantes.

## IMPLICACIONES EN EL PROCESADO POSTERIOR

El diseño del medio de fermentación tiene fuertes implicaciones en el procesado posterior. El uso de materiales de fermentación brutos puede representar un ahorro en el costo de los nutrientes, pero da lugar a un proceso de recuperación más caro y complejo. El empleo de una elevada proporción de agentes antiespumantes hace que dichos agentes se recuperen con los sólidos durante la primera etapa de separación sólido-líquido, lo que puede dar problemas en el procesado de productos asociados con las células. Por tanto, a la hora de seleccionar las materias primas a utilizar en el proceso de fermentación hay que tener en cuenta su impacto económico en la productividad, en la purificación del producto y en el tratamiento de desechos. En general, en los procesos en los que el costo de fermentación es alto, el costo del medio puede representar una proporción substancial de los costos totales de manufactura, y por tanto es especialmente necesario utilizar materias primas baratas. En los procesos de fermentación en los que la recuperación del producto es muy costosa se tiende a utilizar materias primas más puras para minimizar los problemas de recuperación.

**Medios de fermentación microbiana**

Los compuestos petroquímicos, como hidrocarburos, alcoholes y ácidos, se utilizaron como medios de fermentación cuando el petróleo era barato, aunque prácticamente no se han usado en una extensión significativa. En la actualidad, las fuentes de carbono y energía más importantes en los procesos de fermentación son materias primas renovables que contienen azúcar y almidón y en menor extensión grasas y aceites. Hoy en día compiten con la producción de alimentos por el almidón y los productos basados en este hidrato de carbono, puesto que el déficit anual actual en los países en vías de desarrollo es de unas  $10^8$  Tm de alimentos. La lignocelulosa representa aproximadamente el 50 % de la producción anual mundial de biomasa, que alcanza las  $10^{11}$  Tm. Por el contrario, la producción anual de almidón y azúcar es muy inferior, de unas  $10^9$  y  $10^8$  Tm

respectivamente. Por tanto, a medio y largo plazo, los productos de hidrólisis de la lignocelulosa deberán ser las materias primas más importantes en los procesos de fermentación.

#### CARBOHIDRATOS

El almidón es el carbohidrato más importante utilizado actualmente en los procesos de fermentación. Puede emplearse en forma de granos o raíces, enteros o molidos, de plantas como el maíz, el arroz, el trigo, las patatas y la mandioca como almidón purificado, como almidón modificado o como dextrinas. Durante el calentamiento o esterilización de los gránulos el almidón gelifica, volviéndose extremadamente viscoso, por lo que usualmente se incluye en el proceso una etapa de hidrólisis enzimática que licúe o aclare el almidón, lo que puede llevarse a cabo bajo la acción de amilasas provenientes de fuentes microbianas o de cereales malteados. La extensión de dicha hidrólisis varía con el proceso de fermentación y depende de factores tales como si la cepa microbiana a utilizar produce o no amilasas y de si la síntesis del producto está sujeta a represión por el catabolito.

La celulosa presente en la madera está usualmente combinada con la hemicelulosa y la lignina en forma de lignocelulosa. La lignina hace a la celulosa resistente al ataque microbiano, y hasta ahora, los métodos químicos y enzimáticos que convierten la lignocelulosa en azúcares fermentables no son económicamente rentables. Sin embargo, la lignocelulosa se utiliza de forma limitada en las fermentaciones para obtener champiñones y la celulosa refinada se emplea como sustrato para la producción de enzimas celulolíticas.

La sacarosa se utiliza en los procesos de fermentación bien en forma cristalina o en forma bruta como zumos o melazas, subproducto de la manufactura de azúcares. Aunque el azúcar contenido en las melazas es obviamente más barato, la composición de este subproducto varía notoriamente con la fuente (caña de azúcar o remolacha), la calidad del cultivo y la naturaleza del proceso de refinado del azúcar, causando problemas en la reproducibilidad de la fermentación.

La lactosa se encuentra en el suero de leche a una concentración del 4 al 5 %, por lo que en algunos procesos de producción de alcohol se emplea suero entero o desproteínizado como fuente barata de hidratos de carbono. La baja concentración de carbohidratos en el suero hace que su transporte sea prohibitivo y en consecuencia las fermentaciones que utilizan este producto se llevan a cabo usualmente en lugares próximos a la factoría de quesos proveedora.

La glucosa se obtiene usualmente en los medios de fermentación a partir de la conversión enzimática directa del almidón. En algunos casos se utiliza glu-

cosa refinada, más costosa, en forma cristalina o de jarabe para la elaboración de productos de mayor valor.

En los procesos de fermentación se pueden utilizar aceites vegetales como el aceite de soja, palma y semillas de algodón como suplemento de los carbohidratos. El metanol, uno de los sustratos de fermentación más baratos, se utiliza para la producción de proteínas de organismos unicelulares, aunque como pueden utilizarlo sólo unas pocas cepas de levaduras y bacterias, su aplicación en los procesos de fermentación está limitada. El etanol, que puede ser metabolizado por muchos microorganismos como una única fuente de carbono, puede ser un material de partida potencial para la producción de otros productos de fermentación en el futuro. Por ejemplo, el ácido acético se produce usualmente por oxidación microbiana del etanol.

#### NITROGENO

Las fuentes más importantes de nitrógeno para la fermentación son el amoníaco, los nitratos, la urea y el nitrógeno presente en los cereales y raíces y sus subproductos. Los aminoácidos purificados se utilizan únicamente en casos muy especiales en los procesos de fermentación, usualmente como precursores. Los sustratos complejos también suministran con frecuencia vitaminas, factores de crecimiento y minerales, de importancia clave en los procesos de fermentación.

#### SUBSTRATOS COMPLEJOS

Los sustratos complejos brutos son una fuente barata de carbono, nitrógeno y otros nutrientes para los procesos de fermentación, e incluyen por ejemplo tejidos de plantas enteras y una serie de subproductos vegetales, animales y microbianos. En la Tabla 4.2 se encuentran algunos de los principales sustratos complejos utilizados en los procesos de fermentación.

#### Medios de cultivo de células animales

Históricamente se incorpora suero fetal de ternera al medio basal de cultivo de células de mamífero como una fuente esencial de factores de crecimiento. Sin embargo, sus existencias son limitadas y su precio elevado. Otros sueros utilizados ampliamente son los de ternera, ternera recién nacida y caballo. Aun-

Tabla 4.2. Substratos complejos utilizados con frecuencia en los medios de fermentación microbiana (Adaptado según Miller y Churchill, 1986)

Fuente	Ingredientes	Componentes mayoritarios (%)						
		Extracto seco	Proteínas	Carbohidratos	Grasa	Fibra	Cenizas	
Cereales enteros	Cebada	90.0	11.5	68.0	1.8	7.0	2.5	
	Cebada malteada	96.0	13.0	70.0	2.0	3.5	2.5	
	Maíz	82.0	9.9	69.2	4.4	2.3	1.3	
	Avena	86.5	12.0	54.0	4.5	12.0	4.0	
	Arroz	89.5	8.0	65.0	2.0	10.0	4.5	
Subproductos derivados de plantas	Trigo	90.0	13.2	69.0	1.9	2.6	1.8	
	Melazas de remolacha	77.0	6.7	65.1	0.0	0.0	5.2	
	Pulpa de remolacha	90.0	8.9	59.1	0.6	18.3	3.1	
	Melazas	78.0	3.0	54.0	0.4	-	9.0	
	Pulpa de agrios (seca)	90.0	6.0	62.7	3.4	13.0	6.9	
	Harina de germen de maíz	93.0	22.6	53.2	1.9	9.5	3.3	
	Harina int. glu. maíz (60%)	90.0	62.0	20.0	2.5	1.6	1.8	
	Extracto de maíz	50.0	24.0	5.8	1.0	1.0	8.8	
	Extracto de maíz en polvo	95.0	48.0	-	0.4	-	17.0	
	Harina int. sem. de algodón	94.0	41.0	28.9	3.9	13.5	6.7	
	Solubles de destilería secos	92.0	26.0	45.0	9.0	4.0	8.0	
	Harina integral de linaza	92.0	36.0	38.0	0.5	9.5	6.5	
	Salvado de arroz	91.0	13.0	45.0	13.0	14.0	16.0	
	Harina integral de soja	90.0	42.0	29.9	4.0	6.0	6.5	
	Harina int. soja (pob. en gr.)	90.0	45.0	32.2	0.8	6.5	5.5	
Subproductos derivados de animales	Sangre	93.0	80.0	2.5	<1.0	<1.0	3.0	
	Harina pesc. (arenq.) (70%)	93.0	72.0	-	7.5	1.0	-	
	Harina y harina de hueso	92.0	50.0	0.0	8.0	3.3	31.0	
Subproductos derivados de microorganismos	Lactosuero (seco)	95.0	12.0	68.0	1.0	0.0	9.6	
	Hidrolizado de levaduras	94.6	52.5	-	0.0	1.5	10.0	

que el suero fetal de ternera es la mayoría de las veces aplicable universalmente, el volumen potencial de producción de los demás sueros es mucho mayor. Mezclando suero fetal con otros sueros alternativos o suplementando niveles bajos de suero fetal con medios ricos en factores de crecimiento se han conseguido ahorros substanciales. Normalmente, el suero representa un 5-10 % del volumen del medio de cultivo, aunque si el medio basal ha sido optimizado para un tipo de célula en particular, puede reducirse hasta un 1-2 %. El suero contiene diversos factores esenciales para el metabolismo y proliferación celular, incluyendo factores de iniciación, proteínas ligadoras, factores de unión y compuestos de peso molecular bajo. En la Tabla 4.3 se indican las principales funciones del suero en los medios de cultivo celular.

En la Tabla 4.4 se muestra la composición de un medio basal, el conocido como BME (medio basal de Eagle), ampliamente utilizado en el cultivo de células de mamíferos. Los medios basales como el BME, tienen concentraciones relativamente elevadas de los nutrientes más comunes y son ideales para estimular la proliferación. Los medios más complejos, por ejemplo el de HAM F10/F12, tienen un mayor número de nutrientes, aunque las concentraciones de algunos constituyentes se han reducido para mantener el balance osmótico. Prácticamente todos los ingredientes del BME están presentes en los medios más enriquecidos. En la Tabla 4.5 se muestran algunos de los componentes suplementarios presentes en algunos medios más enriquecidos. Las células de los principales mamíferos, por ejemplo, de las especies humana, bovina, equina y de algunos primates, proliferan mejor en medios de cultivo basales y su crecimiento puede inhibirse mediante el empleo de medios mucho más enriquecidos. Para el crecimiento de células de mamíferos secundarios y de líneas celulares inmortales se utilizan generalmente medios suplementados con nutrientes intermedios. Los medios muy enriquecidos se utilizan normalmente con células que proliferan rápidamente. A veces se necesitan medios más complejos que permitan la ex-

Tabla 4.3. Funciones atribuidas al suero en los medios de cultivo

- Proporciona hormonas y factores de crecimiento necesarios para la función celular
- Suministra los factores necesarios para la unión al soporte
- Actúa como agente tamponante
- Se une e inactiva o secuestra compuestos tóxicos
- Contiene proteínas ligadoras que estabilizan y/o transportan nutrientes y hormonas a la célula
- Suministra nutrientes para el metabolismo de la célula
- Contiene inhibidores de proteasas
- Contiene elementos traza (por ejemplo, selenio)

Tabla 4.4. Composición del medio de cultivo celular BME (medio basal de Eagle)

Sales inorgánicas	Concentración (mg/l)	Aminoácidos	Concentración (mg/l)	Vitaminas	Concentración (mg/l)
CaCl <sub>2</sub>	200.0	L-arginina	17.4	Biotina	1.0
KCl	400.0	L-cistina	12.0	D-pantotenato de Ca	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200.0	L-glutamina	292.0	Cloruro de colina	1.0
NaCl	6800.0	L-histidina	8.0	Acido fólico	1.0
NaHCO <sub>3</sub>	2200.0	L-isoleucina	26.0	<i>l</i> -Inositol	1.0
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	140.0	L-leucina	26.0	Nicotinamida	1.0
		L-lisina	29.2	Piridoxal-HCl	1.0
		L-metionina	7.5	Riboflavina	1.0
		L-fenilalanina	16.5	Tiamina-HCl	1.0
		L-treonina	24.0	Otros compuestos	
		L-triptófano	4.0	D-glucosa	1000.0
		L-tirosina	18.0	Rojo fenol	10.0
		L-valina	23.5		

Tabla 4.5. Compuestos adicionales que pueden estar presentes en los medios más enriquecidos

Sales inorgánicas	Aminoácidos	Vitaminas	Otros compuestos
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	L-Alanina	L-Acido ascórbico	Piruvato sódico
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	L-Asparagina	Niacinamida	Glutati6n
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	L-Acido aspártico	Acido <i>p</i> -aminobenzoico	Acido lipoico
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	L-Cisteina-HCl·H <sub>2</sub> O	Vitamina B <sub>12</sub>	Acido linoleico
KNO <sub>3</sub>	L-Acido glutámico		Hipoxantina
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Glicina		Timidina
	L-Prolina		Putrescina·2HCl
	L-Hidroxiprolina		Hidroxitilpiperacina
	L-Serina		

presión completa de una función diferenciada. La diferenciación implica usualmente el cese de la proliferación.

El empleo de medios químicamente definidos, o medios sin suero, permite a los científicos investigar los procesos en cultivos celulares con el mínimo posible de influencias extrañas y facilita el aislamiento y purificación de productos provenientes del cultivo de células de mamíferos. Los medios libres de suero deben tener los componentes del suero necesarios para el cultivo, y satisfacer las principales funciones mostradas en la Tabla 4.3. Adaptando las células desde medios de crecimiento mínimos a medios complejos formulados puede substituirse la contribución nutricional del suero. La combinación de factores de crecimiento necesarios para el cultivo de células de mamíferos tiende a ser específica de cada célula. En la Tabla 4.6 se da una lista general de factores de crecimiento que pueden ser probados a la hora de confeccionar el medio libre de suero.

### Medios de cultivo para el crecimiento de células vegetales

La mayoría de los medios de cultivo de células vegetales tienen una composición química definida, consistente en una fuente de carbono orgánico, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y reguladores del crecimiento. La fuente

Tabla 4.6. Factores de crecimiento seleccionados para posible uso en medios libres de suero

- Factor estimulante de la formación de colonias (CSF)
- Estradiol
- Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
- Factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF)
- Fibronectina
- Hormona de crecimiento
- Hemina
- Hidrocortisona
- Insulina
- Factor de crecimiento nervioso (NGF)
- Fosfolípidos
- Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)
- Prolactina
- Prostaglandinas
- Acido retinoico
- Selenio
- Albúmina sérica
- Somatomedina
- Factor de crecimiento de las células T
- Factor de crecimiento transformante (TGF)
- Transferrina
- Triyodotironina

de carbono más utilizada es la sacarosa aunque también pueden emplearse otros mono- y disacáridos, por ejemplo glucosa, fructosa, maltosa y lactosa. La fuente más importante de nitrógeno en el medio son los nitratos, aunque a veces resulta beneficiosa la suplementación con sales amónicas. Algunas especies de células necesitan nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos, y la inclusión de nitrógeno orgánico tiene frecuentemente un impacto positivo en las primeras etapas de iniciación del cultivo. En la mayoría de los cultivos de células vegetales son necesarias hormonas vegetales, las auxinas, que inducen la división celular, y las citoquininas, que actúan como factores de regulación del crecimiento en las plantas, y que se utilizan frecuentemente combinadas para promover la división celular del cultivo.

### Mantenimiento del medio de cultivo

El medio para almacenamiento y subcultivo de cepas industriales clave debe ser diseñado de forma que se conserven las características necesarias que permitan el mantenimiento de un alto grado de viabilidad del cultivo y minimicen la variación genética. Por encima de todo, es esencial que el medio conserve la capacidad de producción particular por la cual la cepa se utiliza en fermentaciones industriales. En general, en el medio de mantenimiento se debe minimizar la producción de metabolitos tóxicos por el organismo, que pueden tener efectos desestabilizantes para la cepa. Las cepas que tiendan a ser inestables con respecto a las propiedades de producción requeridas deberían ser mantenidas, cuando esto sea posible, en medios selectivos para esa particular capacidad. Para muchos cultivos celulares existen medios de mantenimiento concretos para cada cepa, que sirven como buen punto de partida para el diseño del medio de conservación. Los catálogos de *American Type Culture Collection* son una excelente fuente de recetas para los medios de cultivo de mantenimiento.

## Capítulo 5

# Procesado de la corriente de salida

### Introducción

Este capítulo relativo al procesado posterior a la fermentación trata de la recuperación y purificación del producto deseado obtenido en el proceso de fermentación. El objetivo de los procesos de fermentación industrial es recuperar y refinar el producto hasta que alcance unas especificaciones dadas, consiguiendo un rendimiento de producto máximo con unos costos de recuperación mínimos. La naturaleza del proceso de recuperación está influenciada por el tipo de fermentación, las propiedades físicas y químicas del producto y los subproductos o contaminantes no deseados, la concentración del producto, su localización (intra o extracelular), la escala de operación, el tratamiento de los desechos, la estabilidad del producto y las especificaciones deseadas.

Las operaciones de fermentación y recuperación forman parte del proceso global, de forma que la naturaleza del proceso de fermentación puede influir de forma significativa en el proceso de recuperación. Por ejemplo, además del ahorro en los costos de fermentación o en la mejora del rendimiento conseguidos con el empleo de medios más complejos hay que tener en cuenta las posibles implicaciones en el procesado a la salida del fermentador. En los productos difíciles de separar de las células o de los materiales contaminantes del medio las actividades específicas (actividad del producto por unidad de peso de material biológico) pueden ser más importantes que los rendimientos absolutos del

producto; también se debe intentar eliminar o controlar la obtención de subproductos indeseables, difíciles de separar del principal producto de fermentación, mediante el empleo de cepas seleccionadas, o por modificaciones técnicas o por cambios en las condiciones de fermentación. Las variaciones entre cada lote en la fermentación, que dan lugar a la producción de caldos o lotes de células variables, pueden crear problemas en el procesado posterior. A este respecto son particularmente problemáticas las fermentaciones contaminadas. El tiempo de recolección es con frecuencia crítico para la estabilidad de las células o los productos.

La concentración de producto en el material de partida representa un factor clave en los costos globales de producción. En la Figura 5.1. se ilustra la relación entre la concentración y el precio de venta de un amplio rango de productos, en tanto que en la Figura 5.2 se ve la influencia del rendimiento en la etapa y del número de etapas en el rendimiento global. Aparte de los significativos costes de operación asociados con cada etapa de purificación, la pérdida de ren-

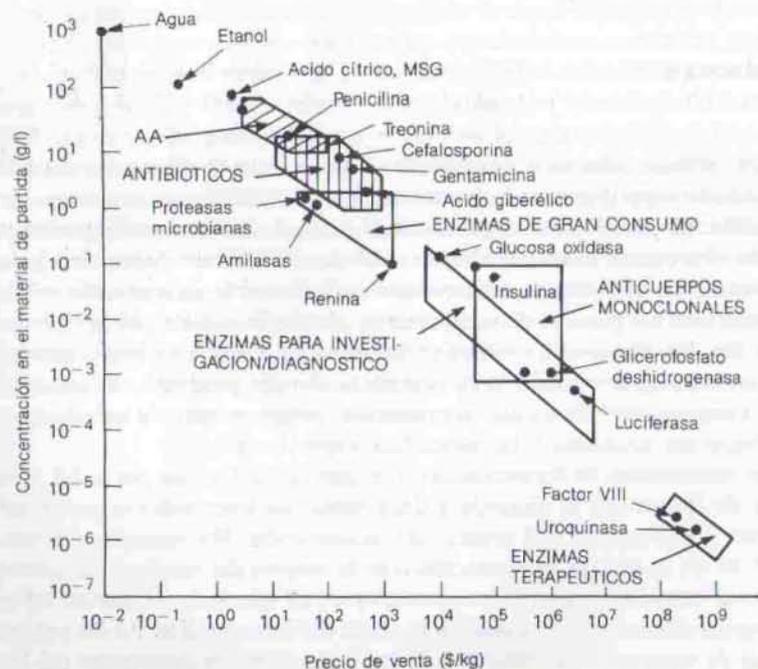


Fig. 5.1. Relación entre la concentración de producto en el material de partida y su precio de venta (reproducido con permiso de Dwyer, 1984).

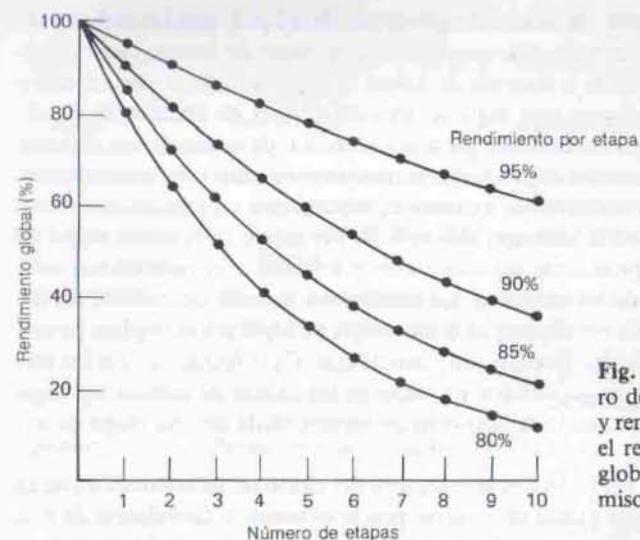


Fig. 5.2. Efecto del número de etapas de purificación y rendimiento de la etapa en el rendimiento del proceso global (reproducido con permiso de Fish and Lilly, 1984).

dimiento acumulativo observada en las purificaciones multietapa puede ser substancial, incluso cuando los rendimientos medios de cada etapa sean del 80-90 %. Por tanto, para una viabilidad económica óptima del proceso, hay que minimizar el número de etapas de purificación necesarias para conseguir un producto con unas características específicas.

Determinados procesos de purificación bioquímica necesitan apoyos analíticos importantes y algunos materiales biológicos exigen procedimientos de análisis complicados y largos. Estas etapas, que necesitan procesos analíticos importantes, deben evitarse siempre que sea posible puesto que los costos pueden hacer que la etapa de purificación sea antieconómica. Además, el tiempo consumido en el control aumenta el tiempo global del proceso.

### Procesos de separación

Los productos de los procesos de fermentación incluyen gases, moléculas solubles extracelulares secretadas en el caldo de fermentación y sólidos, por ejemplo células, que contienen moléculas solubles o insolubles intracelulares. Los gases, como el dióxido de carbono y el metano, producidos por ejemplo durante la producción de alcohol y durante la digestión anaerobia, pueden ser reco-

dos a partir de las líneas de salida de gases, purificados y comprimidos para uso comercial. En un limitado número de casos, el caldo de fermentación integral se utiliza directamente o después de haber sido evaporado o secado como producto final, como ocurre con algunas fermentaciones en tecnología de alimentos y en algunas fermentaciones para la obtención de enzimas con cultivos de superficie. En otros casos el producto se recupera del caldo de fermentación mediante un proceso de destilación, extracción, absorción o separación con membranas. Sin embargo, en la inmensa mayoría de los casos, la primera etapa de purificación para los productos extracelulares y solubles o intracelulares, consiste en la separación de las células y los sólidos del líquido de cultivo. En las fermentaciones con cultivos sumergidos esta etapa de separación implica procesos como la sedimentación, floculación, centrifugación o filtración. En las fermentaciones sobre substratos sólidos y a veces en los caldos de cultivo sumergido muy viscosos, la separación sólido-líquido va precedida de una etapa de extracción acuosa.

Una vez separadas las fases sólida y líquida del caldo de fermentación, cada una de las dos fracciones puede procesarse posteriormente o desecharse de una forma apropiada. Los sólidos, células incluidas, pueden prensarse hasta formar bloques o tortas, secarse al aire o liofilizarse, extraerse con solventes o desintegrarse para liberar los componentes intracelulares por autólisis, o por métodos químicos o mecánicos. Las células desintegradas pueden procesarse posteriormente separando una fracción sólida y otra soluble mediante técnicas de separación sólido-líquido.

Muchos productos biotecnológicos son solubles y se encuentran en el líquido de cultivo extracelular clarificado o en la fracción soluble intracelular, y pueden procesarse y purificarse posteriormente mediante técnicas de separación molecular que explotan propiedades como el tamaño, la carga, la solubilidad, la volatilidad, la afinidad biológica, etc.

En la Tabla 5.1 se resumen los procesos de destilación, evaporación y secado. La destilación se utiliza para recuperar productos de fermentación volátiles, como por ejemplo etanol, y para la recuperación y posterior reutilización de solventes empleados en otras etapas del procesado posterior a la propia fermentación. La evaporación se utiliza para obtener líquidos concentrados como productos finales o para la preparación de materias primas para el secado posterior por atomización o en tambor. Debe tenerse en cuenta la sensibilidad térmica del producto. El secado por atomización produce una evaporación rápida y los efectos del enfriamiento por la evaporación, evitan, al menos en las etapas iniciales de secado, el sobrecalentamiento, por lo que es un tratamiento térmico más suave que el secado en tambor. La liofilización se utiliza para secar materiales sensibles al calor, incluyendo células microbianas vivas y proteínas lábiles.

**Tabla 5.1.** Ejemplos de procesos de evaporación, destilación y secado

<i>Proceso</i>	<i>Naturaleza del equipo</i>	<i>Fundamentos de la operación</i>
Evaporación	Evaporador tipo tubo largo vertical y evaporadores de película descendente	El líquido se evapora al pasar a través de tubos verticales en contacto con el vapor de agua
Destilación	Plantas de destilación continuas y discontinuas	Evaporación del solvente por calentamiento de la solución, separación de los componentes vaporizados en función de su volatilidad, recuperación del producto volátil por condensación
Secado	Secado por atomización	El líquido o la pasta son atomizados en forma de gotitas dentro del secador y su paso a través de una corriente gaseosa caliente da lugar a la evaporación rápida
	Secado en tambor	La solución alimentada lentamente a la superficie de un tambor rotatorio caliente, se evapora. Los sólidos secos se descargan mediante el empleo de una hoja rascadora
	Liofilizador	El agua se separa del material congelado por sublimación

En la Tabla 5.2 se resumen los procesos empleados para la separación de las células y los sólidos de la fase líquida. En los recipientes cuyo contenido no se ve sometido a un proceso de mezcla, los sólidos o las células pueden sedimentar de forma natural sin manipulaciones químicas. Las cepas seleccionadas de levaduras de cervecía sedimentan en el fondo del fermentador al final del proceso de fermentación. Los agentes floculantes, que hacen que se agregen las células o las partículas microbianas elevan la velocidad de sedimentación, puesto que las partículas mayores tienden a sedimentar a una velocidad más alta. La sedimentación eficaz de células es particularmente importante en algunos procesos de fermentación con reciclado de células, en los que se reutilizan las células sedimentadas. Sin embargo, en muchos casos los procesos de floculación-sedimentación consumen demasiado tiempo, retardando la recuperación de productos inestables y aumentando a su vez el tiempo de fermentación. En tales casos se utilizan usualmente técnicas de centrifugación o filtración.

Tabla 5.2. Fermentadores celulares/procesos de separación sólido-líquido

Proceso	Naturaleza del equipo/aditivos	Fundamentos de la operación
Sedimentación	Tanque de sedimentación	Las células sedimentan en el fondo del recipiente debido a la fuerza de la gravedad
Floculación	Cola, gelatina, ácido tánico, iones divalentes, compuestos de amonio cuaternario, floculantes sintéticos	Agregación de las células o las partículas por neutralización de cargas superficiales iónicas iguales, repulsivas, o formación de puentes entre partículas por floculantes multivalentes
Centrifugación continua	Separador de sólidos	Retención de sólidos en el recipiente. Alimentación de sólidos 0-1 % vol.
	Separador expulsor de sólidos	Descarga intermitente. Alimentación de sólidos 0,01-20 % vol.
	Tobera de descarga del separador	Descarga continua. Alimentación de sólidos 1-30 % vol.
	Tornillo decantador	Descarga continua. Alimentación de sólidos 5-80 % vol.
Filtración discontinua	Filtro de placas (filtro prensa)	Pilas de placas filtrantes, cubiertas con paño o tela, dispuestas de tal forma que la pasta y el filtrado fluyan desde una placa y la siguiente, respectivamente
Filtración continua	Filtro rotatorio a vacío	La pasta se alimenta desde el exterior de un filtro de tambor. El filtrado es arrastrado a lo largo del filtro dentro del tambor mediante vacío. La torta de filtración se elimina automáticamente mediante una cuchilla
	Filtración de flujo trasversal	Véase Figura 5.7

La elección del equipo de centrifugación depende del tamaño del organismo y del caudal requerido, y en muchos casos hay que compensar la eficacia de la separación frente al caudal. Las centrifugas utilizadas en las fermentaciones a gran escala con recuperación de sólidos tienen que ser continuas y deben disponer de un mecanismo de descarga de sólidos. Por ejemplo las toberas de descarga son adecuadas para la recuperación de levaduras y bacterias, aunque tienden a atascarse con los micelios fúngicos o con materiales cuyo tamaño de partícula sea grande; las centrifugas que expulsan sólidos (Fig. 5.3), con mecanismos de descarga de sólidos continuos o intermitentes, pueden utilizarse para la recuperación de biomasa bacteriana o miceliana; la centrifuga de tornillo decantador (Fig. 5.4), que es adecuada para eliminar agua de materiales sólidos gruesos a concentraciones elevadas de sólidos, ha sido utilizada para la recuperación de levaduras y hongos.

Los filtros de placas (Fig. 5.5) son baratos y versátiles puesto que el área superficial puede ajustarse variando el número de placas, aunque no son adecuados para la eliminación de grandes cantidades de sólidos de los caldos puesto que las placas deben desmontarse para poder proceder a su recuperación.

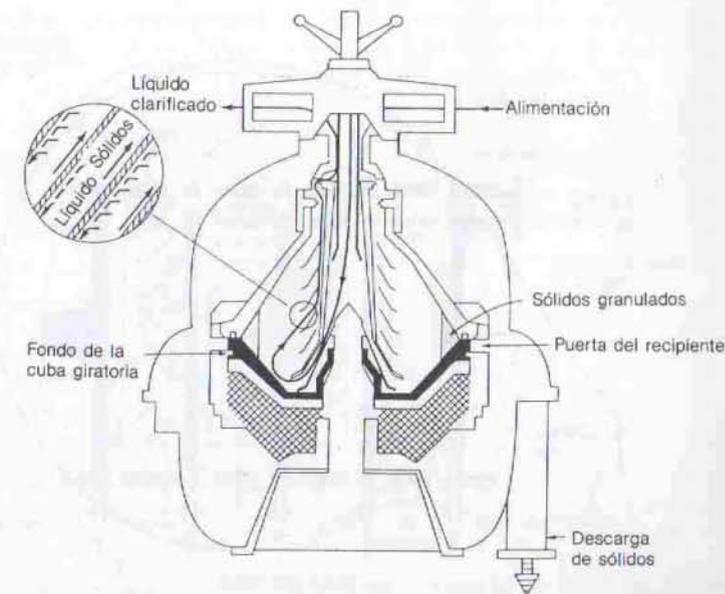


Fig. 5.3. Centrifuga de descarga de sólidos (reproducido con permiso de Bailey y Ollis, 1986).

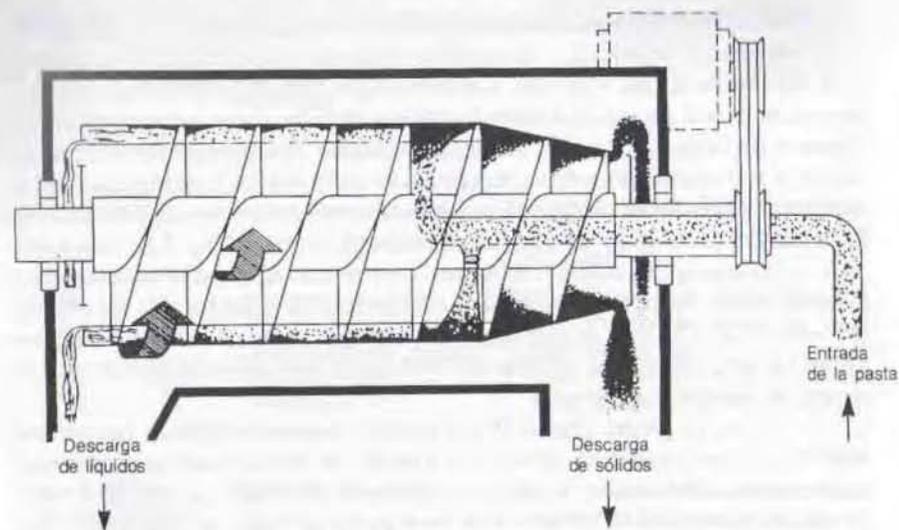


Fig. 5.4. Centrífuga decantadora de tornillo (reproducida con permiso de Penwalt Corporation, Sharples-Stokes Division, Pa.).

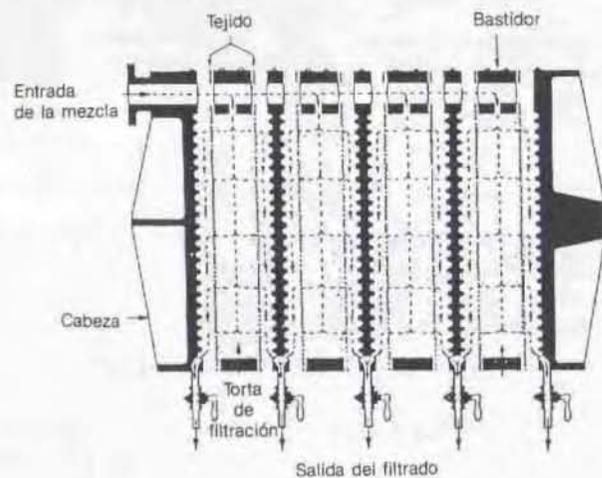


Fig. 5.5. Conjunto de placas y filtros (reproducido con permiso de Blackie and Son Limited, Glasgow and London, 1971).

Se utilizan ampliamente como dispositivos de limpieza final para eliminar cantidades bajas de sólidos residuales de los caldos de cultivo o de otros líquidos. Los filtros rotatorios de vacío (Fig. 5.6) se utilizan mucho para clarificar grandes volúmenes de líquido con descarga automática de sólidos. La acumulación de finos o de suspensiones gelatinosas de bacterias u otros materiales en los filtros puede hacer más lenta la filtración o incluso llegar a bloquearla, por lo que es una práctica común el empleo de auxiliares de filtración que mejoren la porosidad de la torta de filtración; estos auxiliares pueden incorporarse al filtro en forma de precapa o pueden mezclarse con el caldo de cultivo. La filtración con flujo tangencial (flujo cruzado) es un método efectivo para la separación de células a partir de líquidos en los procesos que están implicados productos de alto valor, ya que el movimiento paralelo del fluido con respecto a la membrana ayuda a reducir el espesor de la capa de células de la superficie del filtro (Fig. 5.7). La velocidad de flujo de filtración viene controlada usualmente por la resistencia ofrecida por esta capa de células, más que por la de la propia membrana.

En la Tabla 5.3 se resumen los procesos más importantes de ruptura de células microbianas. En la mayoría de los casos se utilizan métodos mecánicos

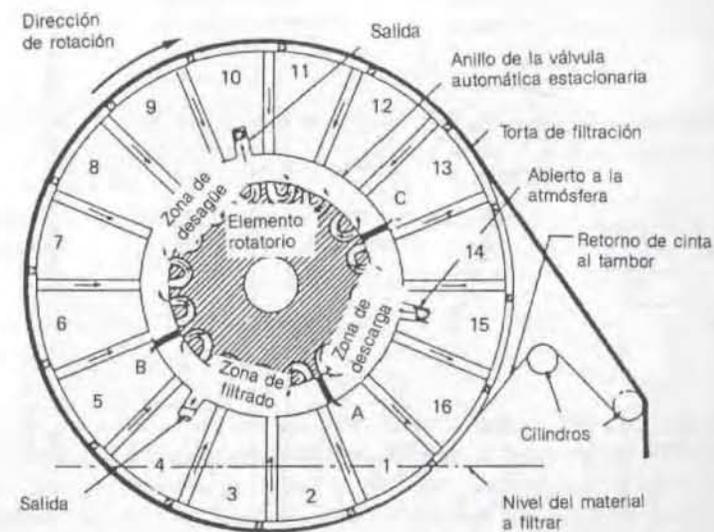


Fig. 5.6. Filtro de vacío rotatorio. Las secciones 1-4 son las filtrantes, las 5-12 son las de desaguado; la torta de filtración se descarga en la sección 13 (reproducido con permiso de Ametek, Inc.).

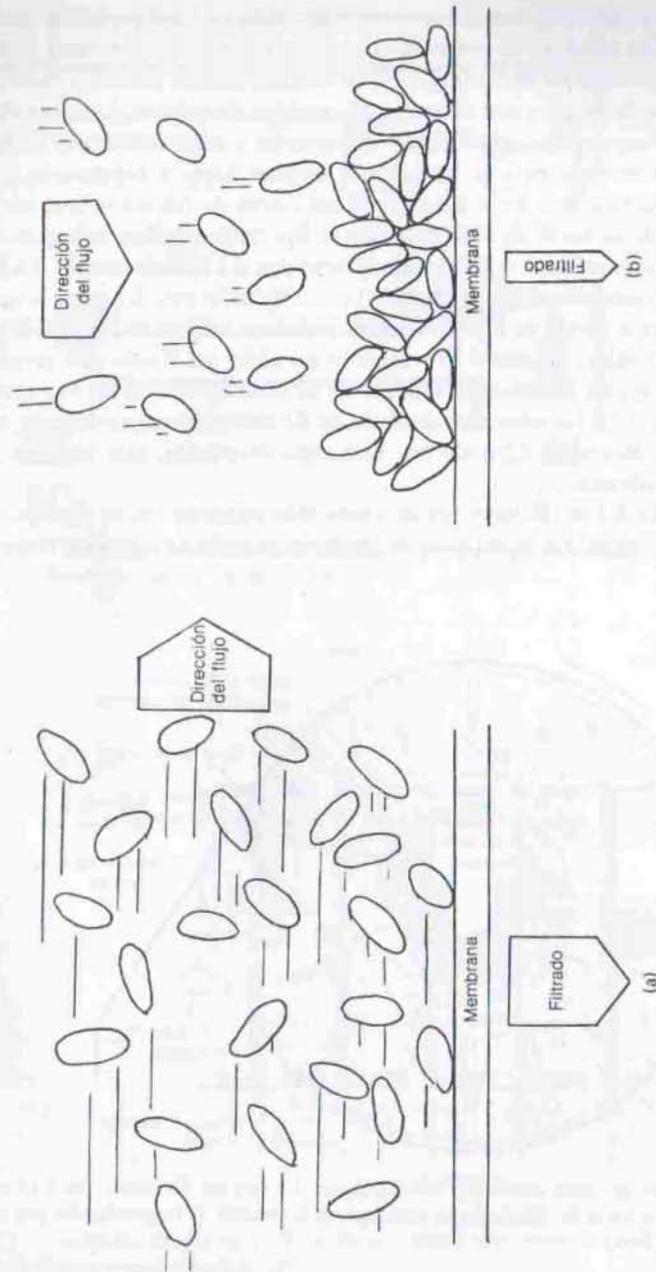


Fig. 5.7. Comparación entre la filtración en flujo cruzado (a) y la filtración convencional (b).

Tabla 5.3. Procesos importantes de ruptura celular

Proceso	Naturaleza del equipo/aditivos	Fundamentos de la operación
<b>Mecánico</b>		
Fuerzas de cizalla	Homogeneizadores líquidos a presión elevada	Paso de las células a presión elevada a través de un orificio diminuto seguido por una repentina caída de la presión. También están implicados otros mecanismos distintos al de las fuerzas de cizalla
Cizalla sólida	Homogeneizador a presión elevada	Extrusión por presión de las células congeladas a través de un orificio restringido con cristales de hielo que contribuyen al efecto cizallante
Agitación con perlas de vidrio	Agitación de las células a velocidades elevadas con perlas de vidrio	Desintegración celular mediante abrasión
<b>Química</b>		
Detergentes	Tweens, lauril sulfato sódico, colato de sodio, compuestos de amonio cuaternario	Modificación de las lipoproteínas de la membrana celular con liberación de sus constituyentes intracelulares
Solventes	Acetona, acetato de etilo, isopropanol	Solubilización del material lipídico de la membrana que conduce a la disrupción celular
Hidrólisis enzimática	Enzimas autolíticas de las propias células o enzimas líticas añadidos	Hidrólisis de los carbohidratos de las paredes celulares y constituyentes proteicos

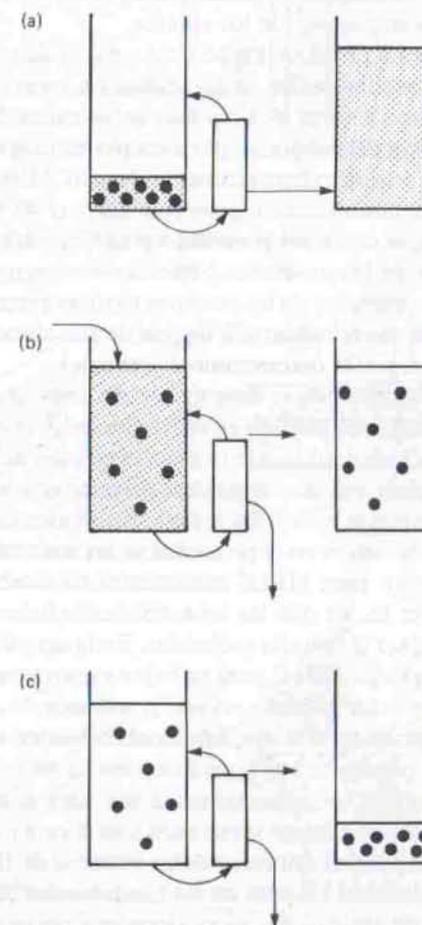
a escala de laboratorio o de planta piloto, en tanto que los métodos enzimáticos y con solventes se utilizan para producciones a gran escala de extractos de levaduras. Cuando se quieran recuperar los productos solubles intracelulares para ser sometidos a una purificación posterior deberán utilizarse procesos de disrupción celular que minimicen la desintegración y solubilización de la pared de la célula y de los componentes de la membrana.

En la Tabla 5.4 se muestran los procesos para la recuperación de productos solubles a partir de caldos de cultivo clarificados y de homogenados celulares.

**Tabla 5.4.** Recuperación de los productos solubles a partir de los caldos clarificados y de las células homogeneizadas

Proceso	Naturaleza del equipo/aditivos	Fundamentos de la operación
Separación por tamaños	Concentración mediante ósmosis inversa	El solvente es impulsado por la presión a través de una membrana con un tamaño de poro suficientemente pequeño para retener los solutos
	Ultrafiltración	Empleo de membranas con poro grande de forma que los solutos de peso molecular bajo sean forzados a atravesar la membrana
	Filtración en gel	Separación por tamaño mediante geles cromatográficos con tamaños de poro controlados con gran precisión. En una columna, el paso de las moléculas más pequeñas, que penetran en los poros en mayor grado se ve retardado, mientras que las moléculas más grandes son excluidas y eluidas primero
Precipitación	Adición de compuestos químicos o solventes orgánicos que reducen la solubilidad del producto	Reacción del precipitante con el soluto para producir productos insolubles, frecuentemente cristalinos El salado de las moléculas cargadas Potenciamiento de las interacciones electrostáticas mediante el empleo de solventes orgánicos que reduzcan la constante dieléctrica del medio Ajuste del pH resultante de la precipitación isoeléctrica Procesos de floculación
Adsorción	Adsorbentes inorgánicos—carbón, óxido de aluminio, hidróxido de aluminio, gel de sílice. Resinas macroporosas orgánicas	Unión del soluto a la fase sólida por fuerzas débiles de Van der Waals y posiblemente también mediante interacción iónica
Absorción por intercambio iónico	Polímeros orgánicos que contienen grupos reactivos con propiedades de cambiadores catiónicos o aniónicos	Cambio reversible de iones entre las fases líquida y sólida, por ejemplo $\text{Resina-COO}^- \text{Na}^+ + \text{Soluto} \rightleftharpoons \text{Resina-COO}^- \text{Soluto}^+ + \text{NaOH}$
Extracción líquido-líquido	Extracción con solventes	Extracción de un medio acuoso con un solvente orgánico inmisible; el soluto es más soluble en el solvente orgánico que en la fase acuosa

La ósmosis inversa y la ultrafiltración se utilizan extensamente para separar proteínas, enzimas y hormonas a partir de solutos de peso molecular bajo (Fig. 5.8) y dializarlos y concentrarlos. Los problemas de polarización por concentración, por la que se produce un incremento de la concentración de soluto en la zona adyacente a la membrana, existentes en los sistemas de membrana convencionales, se reducen en los sistemas de filtración de flujo cruzado. En la filtración de flujo cruzado el movimiento del fluido, paralelo a la superficie del



**Fig. 5.8.** Separación (a), diálisis (b) y concentración (c) de proteínas mediante ultrafiltración.

filtro, elimina continuamente el soluto acumulado. Los sistemas de membrana típicos consisten en fibras huecas o en apilamientos de hojas con una configuración de cartucho o de conjunto de placas (Fig. 5.9).

Los solventes orgánicos se utilizan ampliamente en la industria para precipitar proteínas y polisacáridos y para extraer antibióticos a partir de caldos de cultivo u homogenados celulares clarificados. Existen otros muchos procesos de separación que modifican la solubilidad del producto. Las técnicas de adsorción están limitadas por el número de centros de unión a la resina y tienden a utilizarse para ligar volúmenes pequeños, con productos de alto valor o para eliminar pigmentos o impurezas de los solutos.

Para aislar péptidos o proteínas específicas a partir de una mezcla de péptidos o proteínas relacionadas dentro de las células y a veces también del líquido extracelular, se necesitan a veces técnicas más sofisticadas. Esto es lo que ocurre cuando la aplicación del producto, por ejemplo en diagnóstico o terapéuticas, exige un nivel de pureza extremadamente elevado. Mientras que los costos de recuperación de los antibióticos representan entre el 40 % y el 60 % de los costos de producción, el costo del procesado post-fermentación representa del 80-90 % de los costos de los productos obtenidos con tecnologías de DNA recombinante. Entre los ejemplos de las potentes técnicas preparativas desarrolladas recientemente están la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la electroforesis y la cromatografía con inmunoabsorbentes.

Con la HPLC los productos se separan rápidamente con un alto grado de pureza y con poca o ninguna pérdida en el rendimiento. Inicialmente fue desarrollada como una técnica analítica, e implica el empleo de partículas porosas usualmente polares, muy rígidas, como fase estacionaria y solventes relativamente no polares como fase móvil. La separación se efectúa aprovechando las pequeñas diferencias existentes en la polaridad de las moléculas. También se han conseguido otros medios para HPLC consistentes en cambiadores de iones o en tamices moleculares en los que las separaciones se basan en las diferencias existentes entre la carga o el tamaño molecular. En la actualidad se dispone comercialmente de equipos de HPLC para trabajar a gran escala, capaces de procesar kilogramos de producto bruto en pocos minutos.

El empleo de la cromatografía con inmunoabsorbentes, en la que las proteínas y otras moléculas pueden unirse específicamente a anticuerpos monoclonales inmovilizados, también es potencialmente útil para el aislamiento de productos de alto valor con rendimientos elevados y en forma purificada. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse en los sistemas de HPLC para permitir separaciones a alta velocidad basadas en los fundamentos de la afinidad biológica. La purificación de anticuerpos monoclonales a partir de fluidos ascíticos o de células en suspensión puede verse dificultada por la presencia de globulinas no específicas, introducidas en el producto por el ratón huésped o en el medio

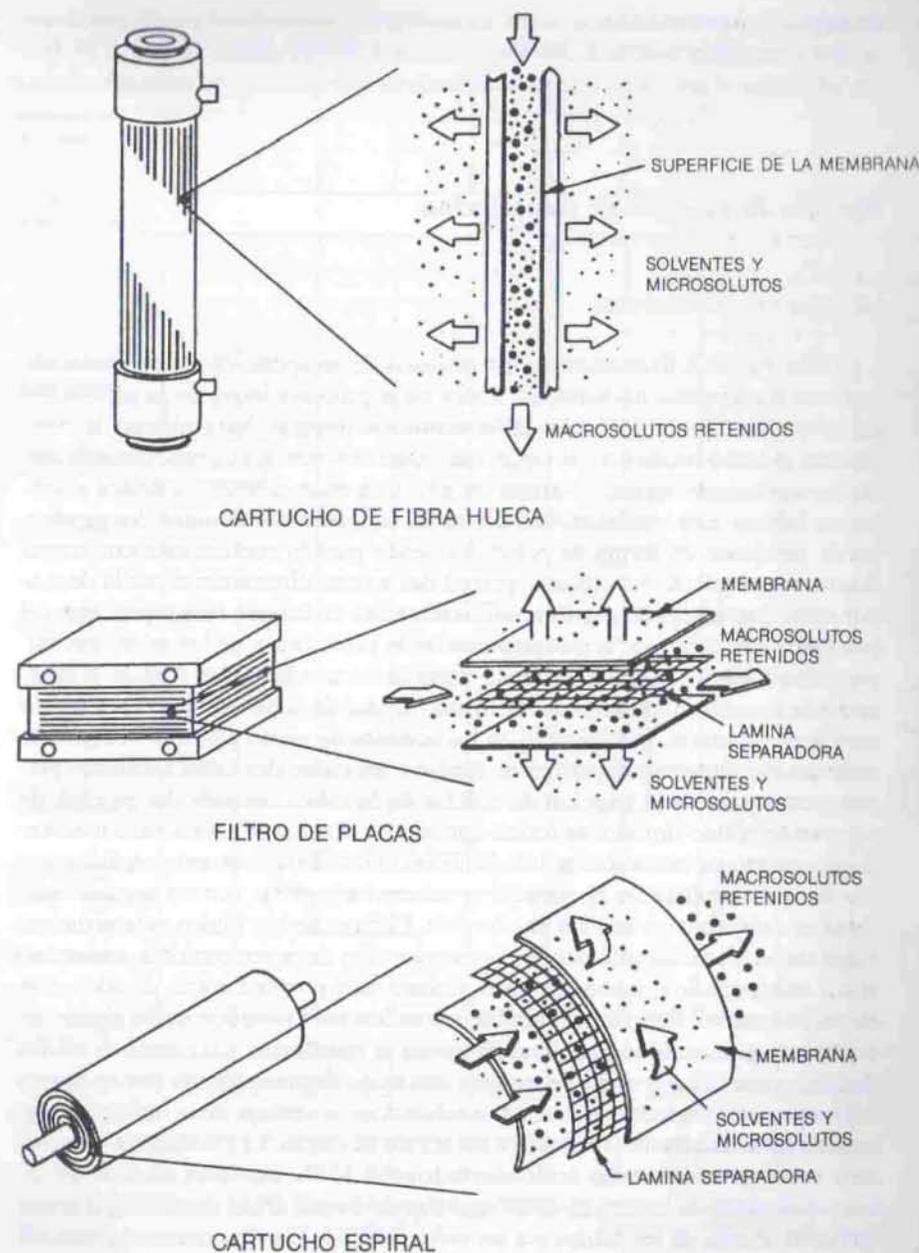


Fig. 5.9. Membranas utilizadas en la filtración en flujo cruzado (reproducidas con permiso de Tutunjian, 1985).

de cultivo suplementado con suero. El anticuerpo monoclonal puede purificarse de forma eficaz mediante cromatografía de afinidad específica con el antígeno, en la que el antígeno está inmovilizado a una fase estacionaria adecuada.

### Ejemplo de procesos de recuperación

#### METABOLITOS NO VOLÁTILES

En la Figura 5.10 se resumen los procesos de recuperación de un cierto número de metabolitos no volátiles. Todos estos procesos implican la separación inicial sólido-líquido del caldo de fermentación integral. Sin embargo, la riboflavina, el ácido itacónico y el lactato de calcio se solubilizan primeramente mediante tratamiento térmico o ajuste del pH. Con excepción de los ácidos glucónico y láctico, comercializados en forma de concentrados líquidos, los productos se recuperan en forma de polvo, habiendo pasado previamente por etapas finales de cristalización y secado, precedidas a veces directamente por la de evaporación. Las etapas de purificación intermedias varían con las propiedades del producto. Por ejemplo, la recuperación de la penicilina y de los esteroides implica operaciones de extracción. En la etapa de extracción líquido-líquido se aprovecha la elevada solubilidad de las formas ácidas de la penicilinas G y V en los solventes orgánicos, por ejemplo en los acetatos de amilo y butilo. A causa de su baja solubilidad en los solventes acuosos, los esteroides están asociados predominantemente a la fracción de sólidos de la célula después del proceso de separación sólido-líquido, de forma que la recuperación se lleva a cabo mediante un proceso de extracción sólido-líquido utilizando un solvente orgánico como la acetona. Después el extracto se concentra y extrae con un segundo solvente con objeto de cristalizar el esteroide. El intercambio iónico es la principal etapa de purificación utilizada en la recuperación de estreptomicina, aminoácidos y cefalosporina, precedida en el último caso por una etapa de adsorción en carbón activo. Esta técnica también se utiliza para producir ácido glucónico a partir de gluconato sódico. Para recuperar la riboflavina y el citrato de caldos de cultivo clarificados se puede emplear una etapa de precipitación con un agente reductor y cal, respectivamente, aprovechándose la ventaja de la naturaleza insoluble de la riboflavina reducida y del citrato de calcio. La riboflavina se reoxida y se disuelve utilizando ácido clorhídrico al 10 %. Las sales cálcicas del citrato y también de lactato se acidifican con ácido sulfúrico, dando lugar a una solución acuosa de los ácidos y a un precipitado de  $\text{CaSO}_4$  como subproducto (yeso), que se separa. La solubilidad de ácido itacónico en agua, de aproxima-

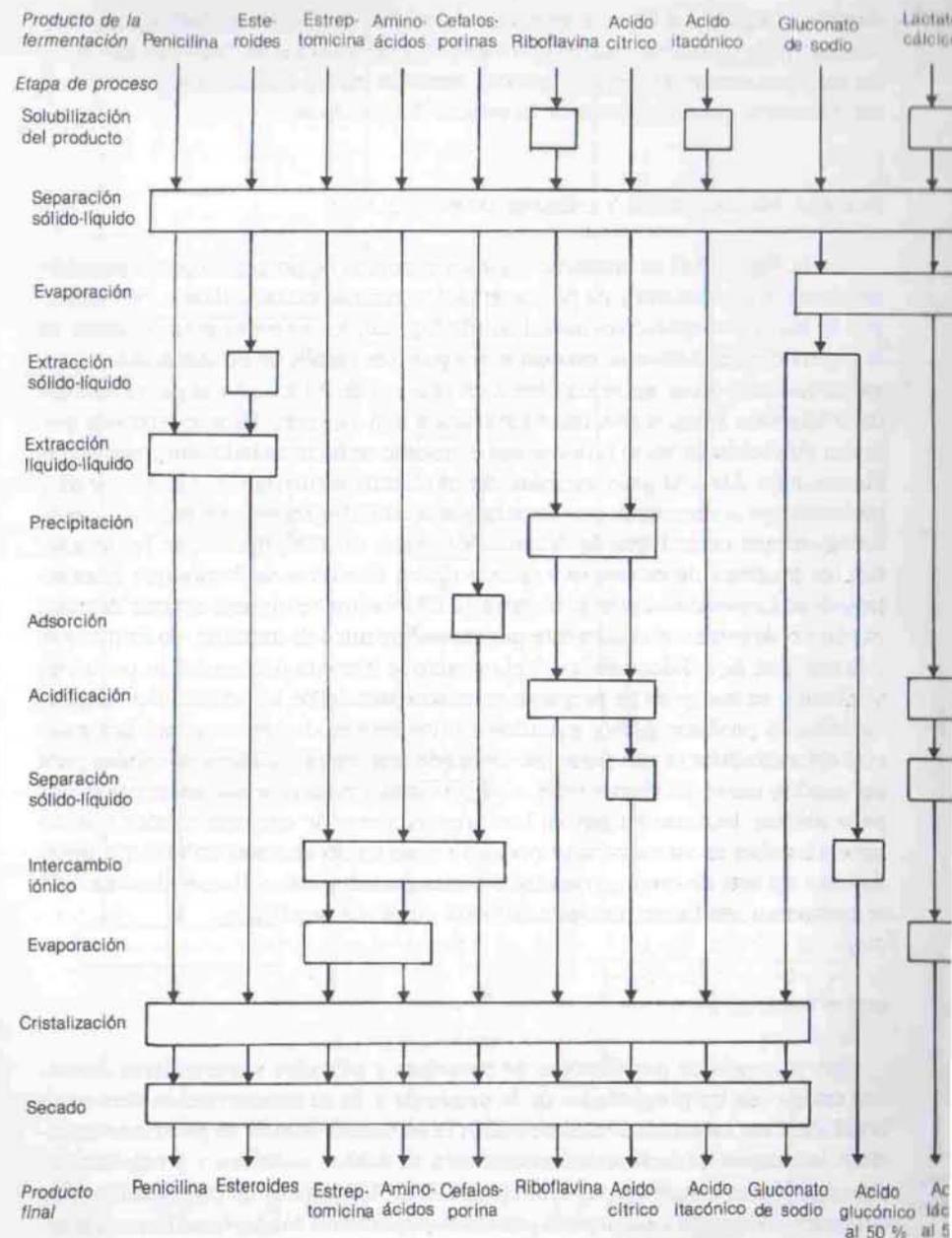


Fig. 5.10. Proceso seguido con diversos metabolitos microbianos no volátiles.

damente  $7 \text{ kg m}^{-3}$  a  $20^\circ\text{C}$  y  $60 \text{ Kg m}^{-3}$  a  $80^\circ\text{C}$ , facilita su cristalización directa a partir de caldos de cultivo clarificados. Los procesos de refinado adicionales incluyen etapas de recristalización, también incorporadas en algunos de estos procesos, para incrementar la pureza del producto.

#### BIOMASA, POLISACARIDOS Y ENZIMAS EXTRACELULARES

En la Figura 5.11 se muestran algunos ejemplos de procesos de recuperación de biomasa microbiana y de polisacáridos y enzimas extracelulares. Previamente a la etapa de separación inicial sólido-líquido, los enzimas extracelulares de la superficie del cultivo se extraen con agua (los caldos de polisacáridos viscosos necesitan a veces ser sometidos a un proceso de dilución) y el gas se elimina de la biomasa fúngica mediante separación con ciclones. Esta se recupera mediante filtración en vacío una vez que el micelio se ha mezclado con otros ingredientes para dar una gran variedad de productos texturizados. Las bacterias y las levaduras se recuperan por floculación o centrifugación, con el consiguiente desaguado en centrifugas de decantación o con otros equipos. Con las levaduras, los procesos de extrusión y secado deben diseñarse de forma que éstas tengan una viabilidad óptima. El extracto de levadura se obtiene a partir de pasta de células de levadura usualmente por procedimientos de autólisis, de forma que, una vez libre de sólidos celulares, el extracto se evapora o se seca. Las proteínas insolubles de bacterias se preparan mediante secado de los sólidos del fermentador hasta producir polvo, gránulos u otras formas de presentación. Los enzimas extracelulares se recuperan en forma de concentrados libres de células para ser usados como producto final o se precipitan mediante solventes orgánicos para obtener enzimas en polvo. Las preparaciones de enzimas sólidos que no generan polvo en su manejo se preparan mezclando enzimas en polvo o líquidos con agentes de unión, granulado o encapsulado. Los polisacáridos también se recuperan mediante precipitación con solventes orgánicos.

#### OTROS PRODUCTOS

Los procesos de purificación de proteínas y péptidos intracelulares dependen mucho de las propiedades de la molécula y de su concentración dentro de la célula. Con los enzimas intracelulares la secuencia común de purificación incluye las etapas de extracción, eliminación de ácidos nucleicos y precipitación, seguida de una o más etapas cromatográficas. El proceso de purificación más convencional tiende a incorporar etapas de separación sólido-líquido para la recogida de células, eliminación de desechos celulares y separación del precipita-

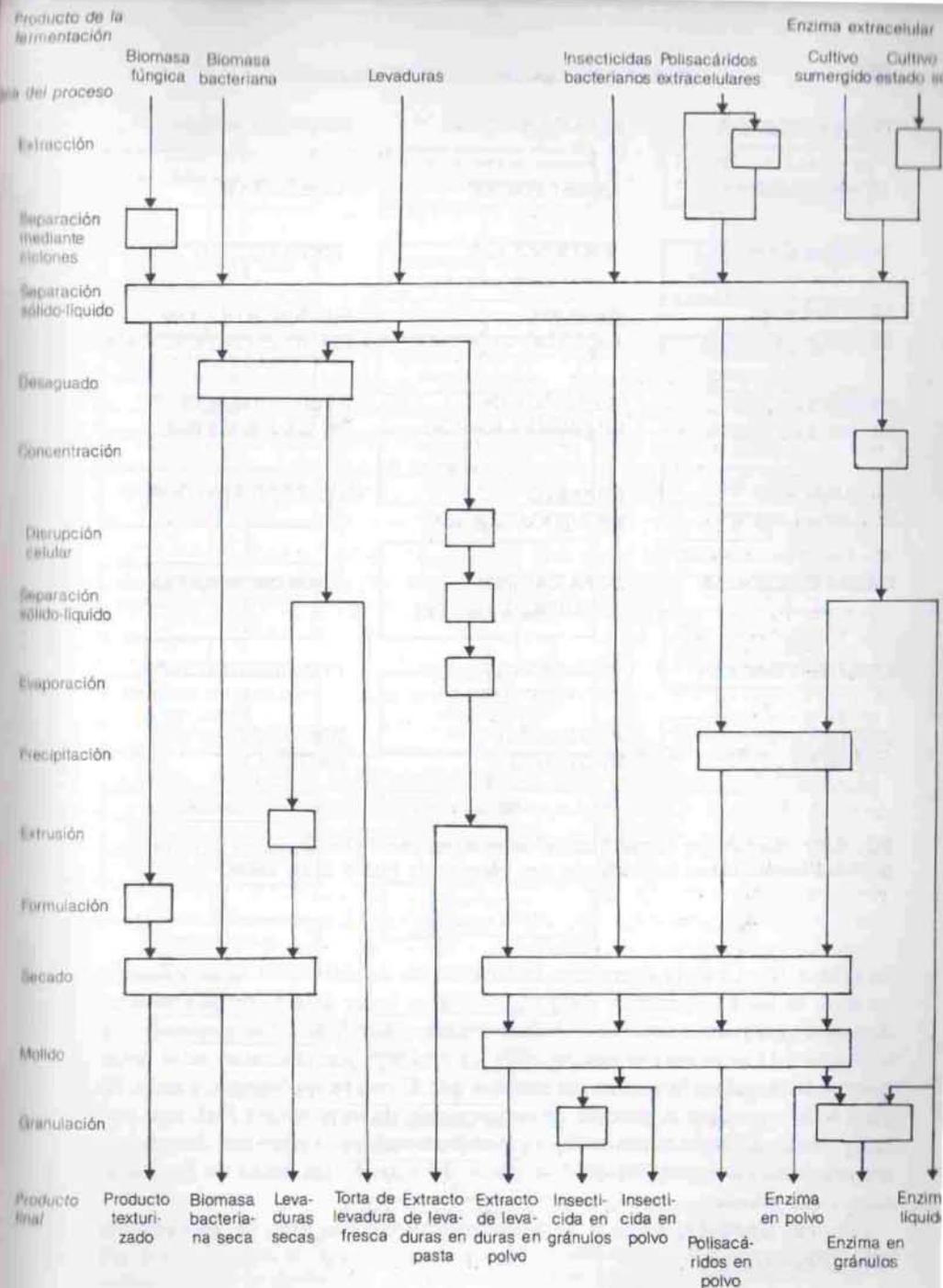


Fig. 5.11. Proceso de recuperación de biomasa microbiana, y polisacáridos y enzimas extracelulares.

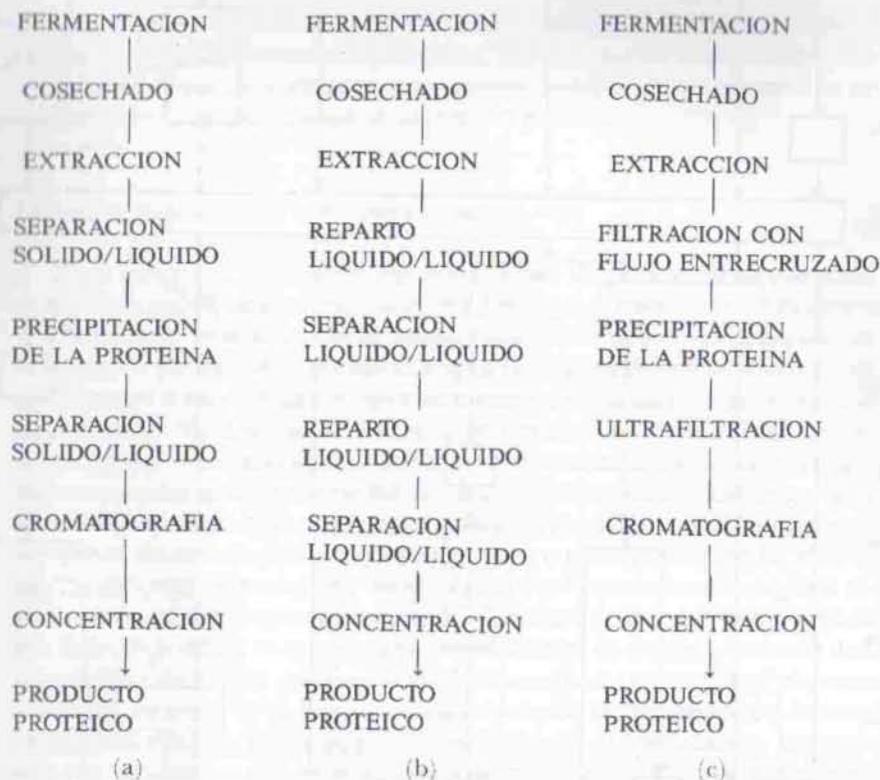


Fig. 5.12. Secuencias de purificación alternativas para la recuperación de proteínas y péptidos intracelulares (reproducido con permiso de Fish y Lilly, 1984).

do (Fig. 5.12). Una vía alternativa incluye etapas de extracción líquido-líquido en lugar de las de separación sólido-líquido y un tercer sistema emplea técnicas de membrana para la separación sólido-líquido y purificación de proteínas. En la Figura 5.13 se muestran tres procesos de recuperación utilizados en el aislamiento de proteínas humanas sintetizadas por *E. coli* recombinante, y en la Figura 5.14 se muestra el proceso de recuperación de largomicina F-II, una cromoproteína utilizada como antibiótico antitumoral, producido por *Streptomyces pluricolorescens* MCRL-0367, a partir del filtrado del caldo de fermentación y del micelio.

En los Capítulos 6 al 11 se mostrarán otros ejemplos de procesos de recuperación.

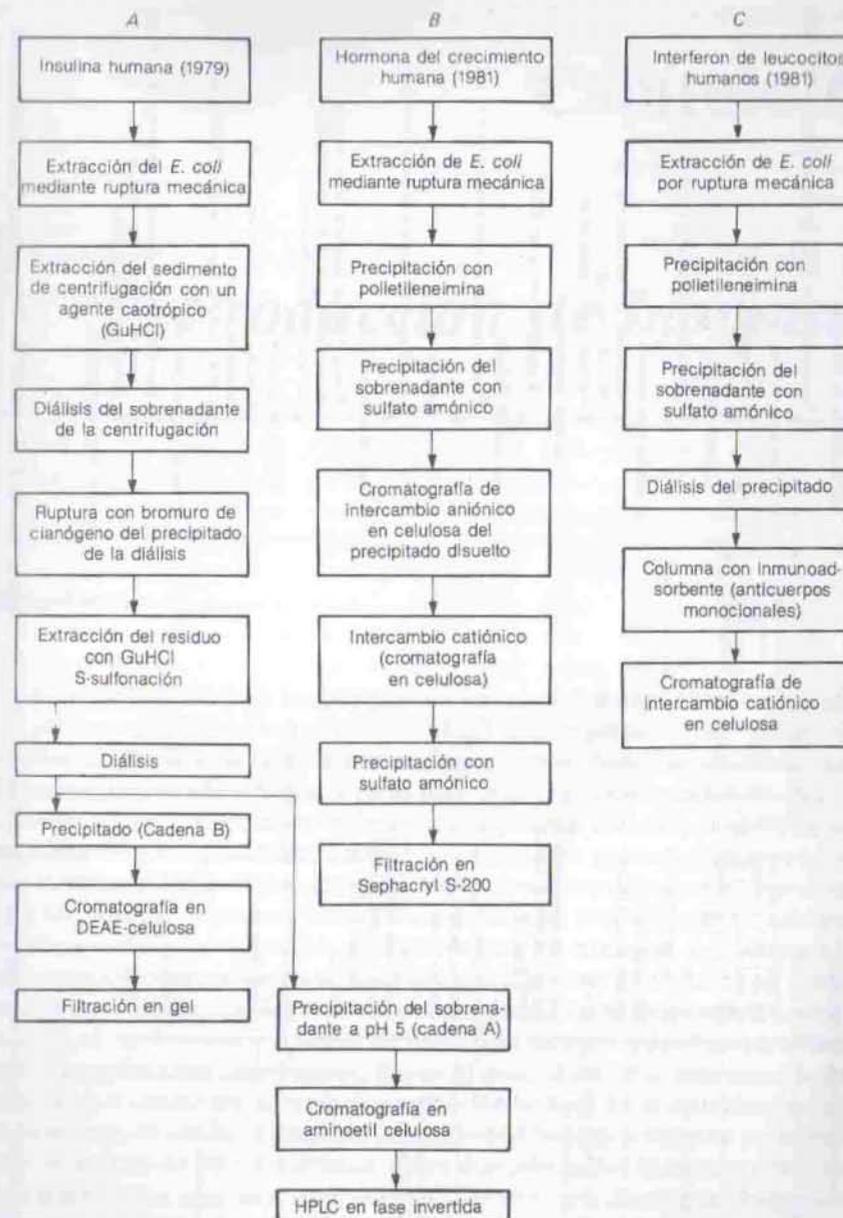


Fig. 5.13. Proceso de recuperación para el aislamiento de proteínas recombinantes humanas a partir de *Escherichia coli* (reproducido con permiso de McGregor, 1983).

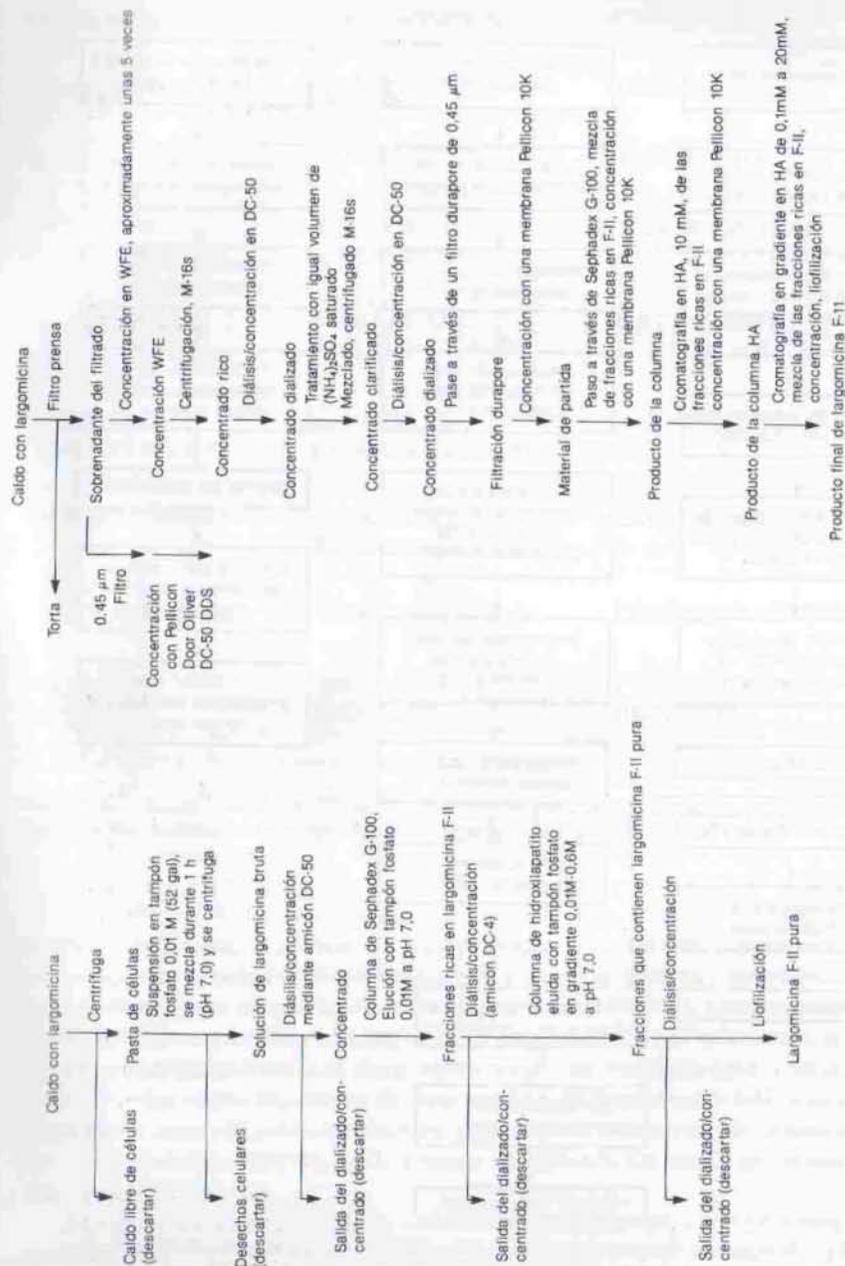


Fig. 5.14. Proceso de recuperación del antibiótico antitumoral largomicina F-II a partir de *Streptomyces pluricolorrescens* (reproducido con permiso de *Purification of Fermentation Products*, ACS Symposium Series 271, 1985, American Chemical Society).

## Capítulo 6

# Producción de biomasa

### Introducción

Este capítulo trata de los procesos de fermentación implicados en los que las células microbianas son el producto final más importante. Las células microbianas obtenidas se utilizan principalmente como fuente de proteínas para alimentación animal o humana (proteínas de organismos unicelulares, SCP), o como inóculo comercial en las fermentaciones de la industria de elaboración de alimentos y en agricultura, tratamientos de desecho y otras aplicaciones. Como mercancía, las proteínas de organismos unicelulares deben ser competitivas con las proteínas vegetales y animales comerciales en precio y en valor nutritivo y deben cumplir las exigencias de seguridad de los alimentos destinados a la alimentación humana o animal. Los principales factores que influyen en la economía de la producción de proteínas de organismos unicelulares son la productividad, el rendimiento y el precio de venta. Los inóculos microbianos, utilizados como auxiliares tecnológicos, tienen en general un valor más elevado. En este caso, el objeto del proceso de producción se basa en la optimización del rendimiento de células viables con una actividad biológica definida y con buenas características de supervivencia. Estos dos principales tipos de producto se van a considerar separadamente después. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se clasifican fundamentalmente como inóculos microbianos, aunque las levaduras de panadería o las de cervecera secas inactivas también se utilizan co-

mo fuente dietética de vitaminas y minerales traza, aunque a partir de ellas se obtienen cantidades considerables de extracto de levadura utilizada como fuente de aromas y de vitaminas.

## Producción de proteínas de organismos unicelulares

### SUBSTRATOS

Los principales sustratos utilizados en la producción de proteínas de organismos unicelulares son los alcanos, los alcoholes y los carbohidratos.

La *Candida utilis* se obtuvo como suplemento proteico mediante fermentación de caldos de sulfito desecho de plantas de celulosa en Alemania durante ambas guerras mundiales y por crecimiento en melazas en Jamaica al final de la Segunda Guerra Mundial. Posteriormente, un cierto número de compañías en USA y una en Finlandia produjeron *Candida* como levadura forrajera en caldos de sulfito utilizando el fermentador Waldhol abierto alemán. Sin embargo, debido a la superabundancia de las proteínas vegetales, estos procesos han llegado a ser antieconómicos. Más recientemente, en 1974 una compañía finlandesa desarrolló un proceso para la producción de proteínas de organismos unicelulares fúngicos para alimentación animal, el proceso Pekilo, haciendo crecer *Paecilomyces varioti* utilizando como sustrato caldos de sulfito. En 1982 se completó una segunda planta.

La celulosa proveniente de fuentes naturales y de restos de madera es un material de partida atractivo para la producción de proteínas de organismos unicelulares debido a su abundancia. En la madera, la asociación de la celulosa con la lignina hace que usualmente ésta sea bastante resistente a la degradación microbiana, por lo que frecuentemente se necesita un pretratamiento térmico o químico combinado con la hidrólisis enzimática. Los sistemas que utilizan organismos celulolíticos parecen ser prometedores, aunque todavía no se ha logrado su viabilidad económica.

El suero de leche entera o el desproteinizado son una fuente de carbohidratos que crean problemas de eliminación. Los principales problemas que plantea la producción de proteínas de organismos unicelulares con suero son usualmente el sustrato insuficiente, las variaciones estacionales del suministro y su elevado contenido en agua (> 90 %), lo que hace que su transporte sea prohibitivo. Aunque la mayoría de los organismos no utilizan lactosa como fuente de carbono, las levaduras *Kluyveromyces fragilis* crecen fácilmente en este carbohidrato por lo que se han construido plantas de fermentación destinadas a la

producción de proteínas de organismos unicelulares para alimentación humana o animal utilizando este microorganismo. Algunas de estas plantas han sido diseñadas para producir tanto proteínas de organismos unicelulares como etanol, en función de la demanda del mercado.

El proceso Symba diseñado en Suecia para producir proteínas de organismos unicelulares a partir de almidón de patata utiliza dos cepas de levaduras. Los *Saccharomycopsis fibuligera* producen los enzimas necesarios para la degradación del almidón y permiten el co-crecimiento de *Candida utilis*. El proceso de producción, destinado a la producción de alimentos para animales, fue diseñado para aprovechar los desechos del procesado de la patata, aunque se plantearon problemas debido a la falta de continuidad en el suministro de sustrato. La glucosa de calidad alimentaria fue el sustrato elegido por Rank Hovis McDougall para la producción de proteínas de organismos unicelulares fúngicas utilizando *Fusarium graminearum*. La estrategia adoptada fue la de tener en cuenta adicionalmente la ventaja que representaba el contenido de fibra miceliana para producir un rango de productos de alto valor añadido entre los que se incluían sucedáneos de la carne para consumo humano.

El proceso original de fermentación de alcanos para la producción de proteínas de organismos unicelulares, desarrollado por BP en su refinería de Laverna, Francia, utilizaba el 10-20 % de las ceras contenidas en el gas-oil. Los costos del sustrato eran muy bajos, por estar en forma bruta, aunque se necesitaba un proceso de extracción exhaustivo para eliminar de las levaduras el olor a gas-oil y los posibles carcinógenos. También existía una cierta tendencia a la contaminación microbiana debido a la naturaleza no aséptica del proceso. Estos inconvenientes hicieron que se cerrara la planta en 1975. Todas estas desventajas junto con el empleo de gas-oil bruto y de condiciones de no asepsia fueron tenidas en cuenta por Italproteine, una «joint venture» entre BP y ANIC. El proceso empleaba *n*-parafinas purificadas que eran utilizadas completamente por las células, simplificando la recuperación de las proteínas de organismos unicelulares. Sin embargo, la planta, de 100.000 Tm/año de capacidad, construida a tal efecto en Cerdeña en 1976, nunca fue autorizada a operar comercialmente. Las compañías japonesas Dainippon y Kanegufuchi, que trabajaban en líneas similares a la de Italproteine, fueron ganando espacio en Japón al ser sus productos aceptados para la alimentación animal, aunque la decisión inicial fue revocada a causa de una fuerte campaña de los consumidores basada en el temor de la presencia de residuos carcinogénicos. Liquichimia obtuvo la patente del proceso Kangufuchi en Italia, construyendo una planta de 100.000 Tm/año de capacidad, que no fue autorizada, al igual que la planta de Cerdeña. Se ha indicado que en Rumanía existe una planta, diseñada por Dainippon, que emplea *Candida pichia*.

El metano fue considerado inicialmente como materia prima para la producción de proteínas de organismos unicelulares ya que, al ser un gas, los problemas de purificación después de la fermentación eran mínimos. Las desventajas asociadas con los procesos basados en el metano están relacionadas con los mayores requerimientos de oxígeno necesarios para oxidar totalmente el metano comparado con las parafinas, la baja solubilidad del metano en el agua y el hecho de que la planta de fermentación debe estar construida a prueba de fuego, puesto que la mezcla metano-oxígeno es altamente explosiva. Sin embargo, el metano se transforma fácilmente en metanol, que necesita menos oxígeno y menos enfriamiento en el fermentador, es muy soluble en agua y tiene unos riesgos de explosión mínimos. La ICI, que manufactura metanol en grandes cantidades, ha escogido este sustrato para la producción de proteínas de organismos unicelulares destinadas a alimentación animal. La compañía ha diseñado un fermentador con presurización no mecánica que utiliza aire tanto para la agitación como para la aireación en el fermentador aséptico aerobio simple más grande del mundo, de 3.000 m<sup>3</sup> de capacidad. El proceso, capaz de producir 50-60.000 Tm/año de proteínas de organismos unicelulares con *Methylophilus methylotrophus*, estuvo en funcionamiento en 1979-80, aunque fue víctima del dramático incremento del precio del metanol. Las dificultades económicas de ICI con el proceso destinado a la alimentación animal y las mayores esperanzas comerciales del proceso *Fusarium* RHM condujeron a una «joint venture» entre estas compañías en 1983 con objeto de producir proteínas de organismos unicelulares a partir de *Fusarium* en la gran planta de fermentación de ICI. El etanol, cuyas ventajas como sustrato son similares a las del metanol, fue utilizado como sustrato por Pure Culture Products para la producción de proteínas de calidad alimentaria a partir de etanol de grado alimentario utilizando *Candida utilis* en 1975. Asimismo, la rentabilidad del proceso se resintió también como resultado del incremento de los costos del etanol.

#### RENTABILIDAD DE LA PRODUCCION DE PROTEINAS DE ORGANISMOS UNICELULARES

La filosofía inicial de compañías como BP e ICI para la producción de proteínas de organismos unicelulares era la de obtener, a bajo costo, proteínas de alto valor a partir del petróleo, para ser añadidas a los alimentos industriales, como substitutos de los aditivos proteicos importados, por ejemplo la harina integral de soja. Los factores que contribuyeron a la caída de las proteínas de organismos unicelulares derivadas de hidrocarburos y que tuvieron un mayor impacto comercial fueron, en 1973, el dramático incremento del precio del crudo, que elevó los costos de energía y de materia prima, el incremento paralelo en los costos de producción de las plantas y el menor incremento de precios experi-

mentado por los productos agrícolas, por ejemplo la soja, con respecto a los industriales. Si se tiene en cuenta que los precios del crudo se incrementaron en un factor de seis en 1973 y que el costo del sustrato para el proceso de obtención de proteínas de organismos unicelulares representa del 40 al 60 % de los costos totales de fabricación, se puede comprender el impacto negativo sobre los procesos de producción de estas proteínas a partir de hidrocarburos. La agricultura, principal competidor de proteínas de organismos unicelulares para la alimentación animal, tiene una gran capacidad para responder a las demandas del mercado manteniendo la estabilidad de los precios. Además de los cultivos convencionales destinados a la alimentación animal, como por ejemplo la soja, otros productos ricos en proteínas como los cacahuetes, semillas de colza, semillas de algodón y habas aladas van ganando una parte de este mercado mientras que la expansión de la producción de gasohol a partir de maíz ha suministrado nuevas fuentes de subproductos destinados a la alimentación animal. En consecuencia, la rentabilidad de las proteínas de organismos unicelulares destinadas a la alimentación animal no es excesivamente atractiva por lo que se están buscando productos de mayor valor. Rank Hovis McDougall y Pure Culture Products adoptaron una estrategia diferente y dirigieron sus productos hacia el mercado de la alimentación humana. En particular RHM aprovechó la ventaja de los componentes fibrosos de los hongos para producir sucedáneos de carne de alto valor añadido con un alto porcentaje de fibra y un 50 % de proteínas, además de otras ventajas apreciables, como su bajo contenido en sodio y en grasa.

Los principales factores económicos que influyen en la producción de proteínas de organismos unicelulares son la productividad, el rendimiento y el precio de venta. En la Tabla 6.1 se resumen la productividad y el rendimiento obtenidos en la producción de proteínas de organismos unicelulares utilizando diversas combinaciones organismo/sustrato. El peso seco de células y los factores de dilución son usualmente de 15-30 Kg m<sup>-3</sup> y 0,1-0,4 h<sup>-1</sup> respectivamente, con una productividad (peso de células obtenido por unidad de volumen por unidad de tiempo) de 1,5-12 Kg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>. Aunque la productividad está limitada frecuentemente por las velocidades de transferencia de oxígeno y por la eficacia en el enfriamiento del fermentador debido al metabolismo exotérmico, los valores más normales están comprendidos entre 3 y 5 Kg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>. Como el costo del sustrato representa una gran proporción del costo de fabricación de la mayoría de los productos de proteínas de organismos unicelulares, es esencial que el rendimiento celular (peso de células producido por unidad de peso de sustrato utilizado) sea elevado y la formación de subproductos sea mínima.

#### ELECCION DEL MICROORGANISMO

Los criterios clave utilizados para la elección de cepas destinadas a la producción de proteínas de organismos unicelulares son los siguientes:

- (1) Los sustratos necesarios como fuente de carbono, energía y nitrógeno y la necesidad de suplementos nutritivos.
- (2) Velocidades de crecimiento específico, productividad y rendimientos elevados con un sustrato dado.
- (3) Tolerancia de pH y temperatura.
- (4) Necesidades de aireación y riesgos de formación de espumas.
- (5) Morfología del crecimiento en el fermentador.
- (6) Seguridad y no patogenicidad, ausencia de productos tóxicos.
- (7) Facilidad de recuperación de las proteínas de organismos unicelulares.
- (8) Composición proteica, contenido de RNA y valor nutricional del producto.
- (9) Propiedades estructurales del producto final.

En general, los hongos tienen la capacidad de degradar un amplio rango de productos vegetales complejos, particularmente los polisacáridos de las plantas, y toleran pHs bajos, contribuyendo a reducir las infecciones en el fermentador. El crecimiento de los hongos en forma de filamentos cortos altamente ramificados en vez de como gránulos es esencial a la hora de optimizar la velocidad de crecimiento; sin embargo, esta morfología filamentosa produce caldos de fermentación reológicamente más complejos, que son difíciles de airear.

Generalmente, las bacterias crecen a velocidades más rápidas que los hongos y a mayores temperaturas, por lo que reducen las exigencias de enfriamiento del fermentador. Las fermentaciones con bacterias y levaduras son mucho más fáciles de airear, pero al contrario que los hongos, que se recuperan fácilmente por filtración, las bacterias y las levaduras requieren el uso de técnicas de sedimentación, incluyendo la centrifugación.

Usualmente los productos bacterianos tienen una composición proteica más favorable que las levaduras o los hongos. El contenido proteico de las bacterias está comprendido entre el 60 y el 65 %, mientras que el de los hongos utilizados para la producción de biomasa y el de las levaduras está comprendido entre el 33 y el 45 %. Sin embargo, junto con los mayores niveles proteicos bacterianos, también existe un nivel mayor del 15 al 25 % de RNA indesable nutricionalmente.

Los microorganismos utilizados en la producción de proteínas de organismos unicelulares deben ser seguros y aptos para consumo alimentario; no deben ser patógenos y tampoco formar toxinas, deben ser estables genéticamente de forma que se mantengan las cepas con características fisiológicas y bioquímicas óptimas durante el proceso a través de cientos de generaciones. Además, las instituciones responsables consideran que la degeneración de las cepas puede desembocar en la producción de una cepa con características nutricionales indeseables.

**Tabla 6.1.** Productividad y rendimiento de la biomasa productora de las proteínas de organismos unicelulares, «exfermenter», conseguidas en plantas de producción o a escala piloto (reproducido con permiso de Solomon, 1983)

Substrato	Organismo	Rendimiento ( $\gamma$ ) (kg de células/kg de sustrato utilizado)	Peso de células seco (x) (kg m <sup>-3</sup> )	Velocidad de dilución (h <sup>-1</sup> )	Productividad (kg m <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )
n-Parafina	Levaduras	0.95	15-20	0.11	ca. 2
n-Parafina	Levaduras	1.2			3
Metanol	Bacterias	0.4			2
Etolanol	Levaduras	0.8			4.5
Melazas	Levaduras	0.85			5.2
Metanol	Bacterias	0.5	20-25	0.4	8-10
Aguas residuales de sulfito	Hongos	ca. 0.5	17	0.2	2.8-3.4
Metanol	Bacterias	ca. 0.5	30	0.16-0.19	4.8-5.7

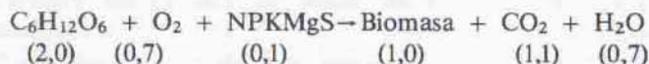
**Tabla 6.2.** Composición (%) de las proteínas de organismos unicelulares comparadas con las de harina de soja y leche en polvo

Componente	Levaduras de alcaños	Bacterias del metanol	Fusarium graminearum*	Alga	Harina de soja	Leche en polvo
Proteína cruda	60.0	80.0	44.3	72.6	42.0	34.0
Grasas	9.0	9.5	13.8	7.3	4.0	1.0
Ácidos nucleicos	5.0	15.0				
Salés minerales	6.0	9.5	3.1	4.7	6.5	8.0
Aminoácidos	54.0	65.0			40.0	
Humedad	4.5	2.8	0	3.6	10.0	5.0

\* Después de la reducción del ARN

## DISEÑO DEL FERMENTADOR

La economía dicta que la producción debe realizarse en el mínimo número de fermentadores a gran escala. Un parámetro clave que influye en la consecución de una productividad de biomasa elevada en operaciones a gran escala es la elevada velocidad de transferencia de oxígeno, que fomenta velocidades de respiración altas, lo que a su vez incrementa la producción de calor metabólico y la necesidad de un sistema de refrigeración eficaz. Suponiendo un balance de masa del organismo productor de biomasa de:



y un desprendimiento de calor de 3 a 4 Kcal g<sup>-1</sup> de masa celular, una productividad de masa celular de 4 kg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> necesita una velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) de 2,8 Kg m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> y desprende un calor de 14.000 Kcal m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>. Con objeto de maximizar la productividad de la fermentación es esencial operar en procesos continuos, manteniendo velocidades de crecimiento microbiano elevadas y minimizando el tiempo de residencia en el fermentador.

En la Figura 6.1 se ilustran algunos de los fermentadores utilizados para la producción de organismos unicelulares. Los biorreactores agitados mecánicamente con deflectores (Fig. 6.1a) con mezcladores de turbina y con alimentación de aire mediante difusores han sido utilizados por la BP para los procesos a escala piloto con n-alcenos desarrollados en Escocia y para los tres fermentadores de 1.800 m<sup>3</sup> instalados en Cerdeña. Los sistemas de turbina convencionales no son muy satisfactorios para los fermentadores muy grandes, y un cierto número de procesos de producción de proteínas de organismos unicelulares a gran escala utilizan recipientes agitados con aire. Con el gas-oil, la BP utiliza un diseño con tubo de retorno agitado por aire (Fig. 6.1b), en el que se optimizó la relación existente entre la velocidad creciente de las burbujas de aire en el tubo y la productividad del fermentador minimizando a la vez las necesidades energéticas. El fermentador agitado por aire modificado, diseñado por Kanegufuchi, en el que el medio de fermentación es conducido por la fuerza del aire que afluye desde un recipiente grande a través de un bucle circulatorio externo, fue utilizado en la planta de Liquichimica que utilizaba alcanos (Fig. 6.1c).

El fermentador piloto ICI con presurización utilizado en la producción de proteínas de organismos unicelulares a partir de metanol, es asimismo, una combinación de un reactor agitado por aire y otro de bucle y consiste en una columna agitada por aire, un tubo de retorno donde se elimina el calor y un espacio para la explosión del gas (Fig. 6.1d). El fermentador de producción en cambio

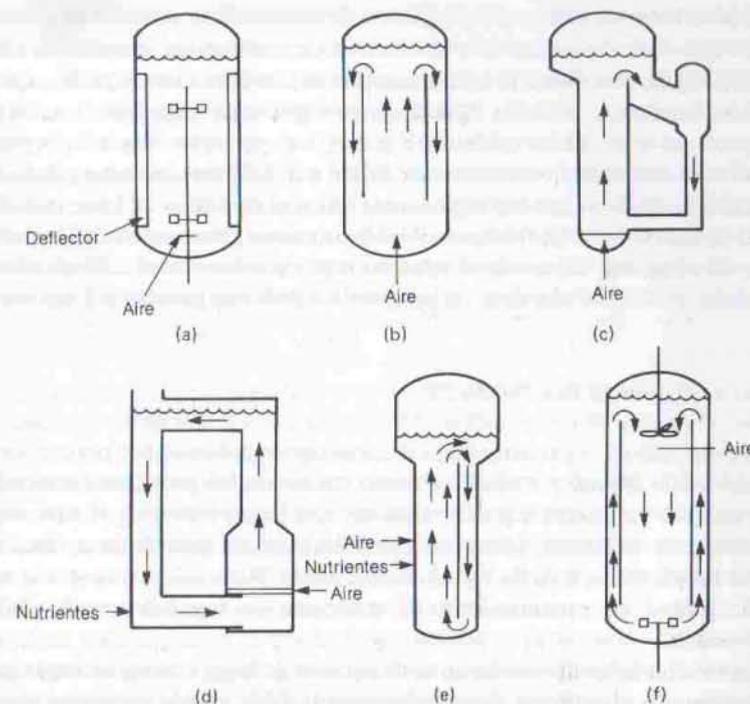


Fig. 6.1. Fermentadores utilizados en la producción de proteínas de organismos unicelulares. Véase el texto para más detalle.

no tiene el tubo de retorno externo (Fig. 6.1e), y está equipado con un difusor de aire complejo que contiene 3.000 salidas, lo que facilita la aireación, la agitación y la distribución eficaz del metanol, que se utiliza como sustrato y que es tóxico a concentraciones elevadas.

Los fermentadores agitados por aire pueden utilizarse para el crecimiento en forma de gránulos de los hongos, pero únicamente son apropiados para la producción de proteínas de organismos unicelulares fúngicos con crecimiento en forma de filamentos. Los micelios filamentosos largos y/o altamente ramificados, incluso a densidades celulares bajas (< 10 Kg m<sup>-3</sup>), tienden a desarrollar viscosidades pseudoplásticas elevadas y dan lugar a una transferencia de oxígeno ineficaz. Los gránulos también son ineficaces en la transferencia interna de oxígeno. Además, existe una relación compleja entre la fuerza de cizalla y la morfología celular. Las velocidades de cizalla bajas inducen micelios no

ramificados largos, y tienen pocos puntos de desarrollo y velocidades de crecimiento bajas. Para optimizar la transferencia de masa en las fermentaciones de biomasa fúngica con *Fusarium graminearum* se diseñó un fermentador, que se para estas funciones, con dos agitadores con ejes separados que funcionan a sus respectivas velocidades óptimas (Fig. 6.1f) como consecuencia de la puesta en marcha de una «joint venture» entre RHM e ICI. El fermentador piloto para la producción de proteínas de organismos unicelulares de la ICI fue modificado para producir la «Micoproteine RHM», aunque aparecieron dificultades a la hora de aumentar de escala el proceso con *Fusarium* en el fermentador de producción de ICI. No obstante, las perspectivas para este proceso son optimistas.

#### CALIDAD Y SEGURIDAD DEL PRODUCTO

Las proteínas de organismos unicelulares tienen aplicaciones potenciales en la alimentación animal y humana y como concentrados proteicos funcionales, por lo que sus características nutricionales son importantes en el caso de ser utilizados como alimento, siendo además relevantes en todas estas aplicaciones las consideraciones acerca de su seguridad. En la Tabla 6.2 se muestra la composición global de preparaciones de proteínas de organismos unicelulares seleccionadas.

Al comparar la composición en aminoácidos de las proteínas de organismos unicelulares con la proteína de referencia de la FAO, puede verse que algunas preparaciones bacterianas tienen un perfil de aminoácidos, incluyendo el contenido de metionina, comparable favorablemente con los de la FAO. Las proteínas de levaduras, hongos y semillas de soja tienden a ser deficientes en metionina. El valor nutritivo de las proteínas de organismos unicelulares puede determinarse mediante estudios de alimentación de animales. Los métodos de evaluación se basan en la determinación del coeficiente de digestibilidad, utilización proteica neta (NPU), balance de nitrógeno y eficacia proteica (PER).

La calidad funcional puede relacionarse con propiedades tales como su eficacia de unión a la grasa y al agua, la estabilidad de las emulsiones, la dispersabilidad, la formación de geles, la posibilidad de batido y espesado o con la textura de las células o de los micelios enteros.

La ingestión humana de RNA a partir de alimentos no convencionales debe estar limitada a dos onzas por día. La ingestión de derivados de las purinas, provenientes de la ruptura del RNA, conducen al incremento de los niveles de ácido úrico del plasma, lo que puede ocasionar trastornos metabólicos en el hombre y algunos primates, como por ejemplo la gota y la formación de cálculos en el riñón. El contenido alto de ácidos nucleicos no causa problemas a la mayoría de los animales, puesto que el ácido úrico se transforma en alantoína, que

se excreta fácilmente en la orina. Por consiguiente, cuando la biomasa esté destinada al consumo animal no es necesaria la eliminación de ácidos nucleicos, pero cuando se destina al consumo humano, este proceso es esencial. En el pasado se recomendaban los tratamientos con álcali, pero éstos dan lugar a la producción de lisinoalanina, un factor nefrotóxico. Los métodos más recientes se basan en mantener la temperatura a unos 64 °C, con lo que se inactivan las proteasas fúngicas permitiendo a las RNAasas endógenas hidrolizar el RNA liberando nucleótidos a partir de las células o los caldos de cultivo celulares. Una estancia de 30 minutos a 64 °C en un reactor tipo tanque con agitación continua reduce los niveles de RNA en las células de *F. graminearum* desde unos 80 mg g<sup>-1</sup> hasta 2 mg g<sup>-1</sup>.

#### PROCESOS DE FERMENTACION DE LAS PROTEINAS DE ORGANISMOS UNICELULARES

En esta sección se discutirán los procesos de fermentación utilizados en la producción de proteínas de organismos unicelulares a partir de especies de *Candida* que crecen en alcanos, de *Methylophilus methylotrophus* en metanol, de *Kluyveromyces fragilis* en lactosuero y de *Fusarium graminearum* en glucosa.

En la Figura 6.2 se muestra el diagrama de flujo del proceso de la BP con *n*-parafina y *Candida*, en el que la fermentación se produce en condiciones estériles. Para obtener 1 kg de proteínas de organismos unicelulares se necesitan aproximadamente de 1 a 1,2 kg de parafina, 0,14 kg de NH<sub>3</sub> gaseoso, y 0,05 kg de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y otras sales. El amoníaco introducido, junto con el aire, se utiliza como fuente de nitrógeno y para controlar el pH. Las necesidades de oxígeno

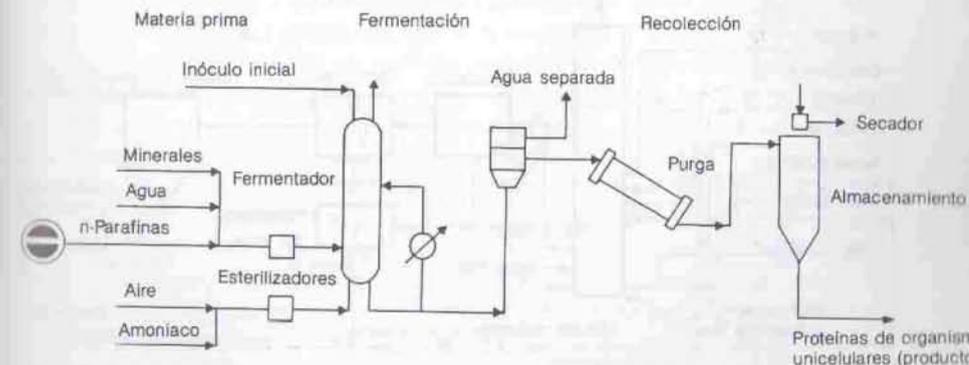


Fig. 6.2. Proceso BP para la producción de proteínas de organismos unicelulares con *n*-parafina (reproducido con permiso de *Hydrocarbon Processing*, Noviembre, 1974).

por unidad de biomasa producida por el crecimiento de microorganismos aerobios en n-hexadecano es 2,5 veces superior a la requerida para el crecimiento en glucosa, con cantidades de hasta 2,2 kg de  $O_2$  por kg de biomasa. El calor desprendido es de 6.600 kcal/Kg de biomasa, por lo que, en consecuencia, los fermentadores necesitan una fuerte agitación. A causa de la naturaleza insoluble de los alcanos, en el fermentador con agitación los caldos se encuentran en forma de suspensiones de gotitas de alcano cuyo tamaño oscila entre 1 y 100  $\mu m$ . La asimilación de los hidrocarburos por las células parece implicar el contacto de éstas con gotitas minúsculas de hidrocarburo, de 0,01 a 0,5  $\mu m$  de diámetro. La creación de una microemulsión en la interfase de las gotitas mediante un agente tensoactivo, que puede ser producido por las células, facilita la adherencia de las gotitas a la célula. El principal mecanismo de degradación de los alcanos por las *Candida* es la oxidación terminal, con la producción secuencial de alcohol primario, aldehído y ácido, seguido por la  $\beta$ -oxidación del ácido graso a acetato. Las células se recuperan por centrifugación, obteniendo un producto con un 15 % de sólidos secos que se evapora hasta el 25 % de sólidos secos y se seca por atomización.

En la Figura 6.3 se esquematiza el proceso de producción de proteínas de organismos unicelulares a partir de metanol con *Methylophilus methylotrophus*. La fermentación se lleva a cabo asépticamente en el fermentador a presión ICI con reciclado. La fuente de nitrógeno es el amoníaco gaseoso y el pH se mantiene entre 6,0 y 7,0. La velocidad de crecimiento de las células es de aproximadamente  $0,5 h^{-1}$  y el rendimiento celular es de 0,5. El metanol se oxida por deshidrogenación a formaldehído, que puede ser asimilado y convertido en ma-

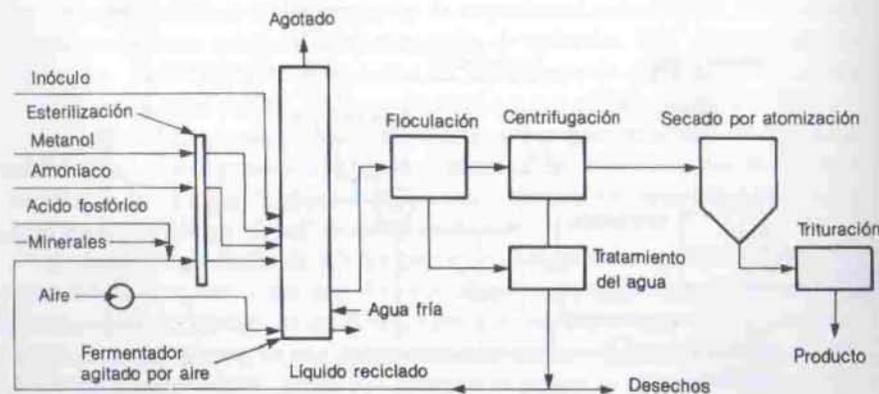


Fig. 6.3. Esquema de un proceso típico de producción de proteínas de organismos unicelulares a partir de metanol (reproducido con permiso de Litchfield, 1983).

sa celular o bien ser oxidado posteriormente a  $CO_2$  con producción de energía. En los *Methylophilus*, el formaldehído se asimila por la vía de la ribulosa monofosfato y se convierte finalmente en fructosa-6-fosfato (Fig. 6.4). Las células se recuperan por aglomeración seguida de centrifugación, secado instantáneo y trituración. En el proceso se recicla el agua del fermentador.

En la Figura 6.5 se ilustra el proceso de producción de biomasa o alcohol mediante el crecimiento de *K. fragilis* en lactosuero, que contiene aproximadamente un 5 % de lactosa, 0,8 % de proteínas, 0,7 % de minerales y 0,2-0,6 % de ácido láctico, y que puede requerir la suplementación con biotina. La producción de biomasa necesita un proceso de fermentación aerobio mientras que para la de etanol la aireación es mínima. Para la biomasa de calidad alimentaria puede recuperarse todo el producto fermentado, que contiene levaduras, proteínas séricas residuales, minerales y ácido láctico. Para la preparación de un producto de calidad alimentaria, las células se recogen por centrifugación, lavado y secado. El rendimiento celular es del 0,45 al 0,55 de la lactosa consumida.

En la Figura 6.6 se ilustra el diagrama de flujo del proceso de fermentación para obtener «Micoproteine RHM» en un medio que contiene jarabe de glucosa de calidad alimentaria, amoníaco, sales y biotina. El pH se controla hasta 6,0 mediante la adición de amoníaco, alimentado en la corriente de entrada de aire. La concentración celular es de  $15-20 Kg m^{-3}$ , consiguiéndose una velocidad de crecimiento específico de hasta  $0,2 h^{-1}$ . Una vez llevada a cabo la separación por ciclones y después de una etapa de reducción del contenido de RNA, las células se recuperan mediante un filtrado a vacío rotatorio y se utilizan para la producción de un amplio rango de productos.

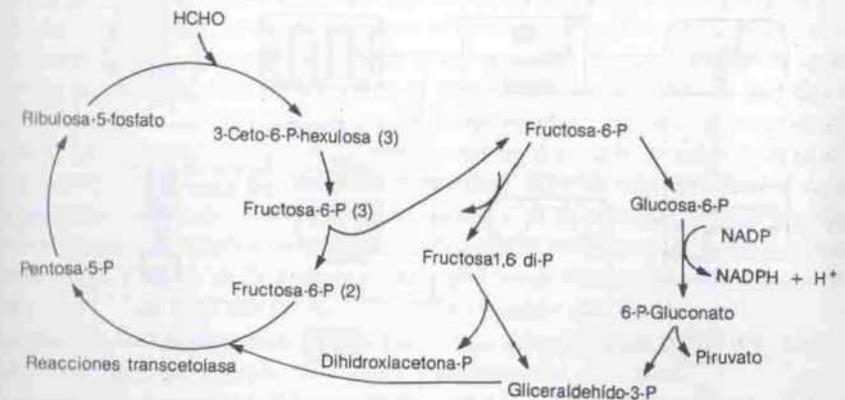


Fig. 6.4. Ciclo de la ribulosa monofosfato.

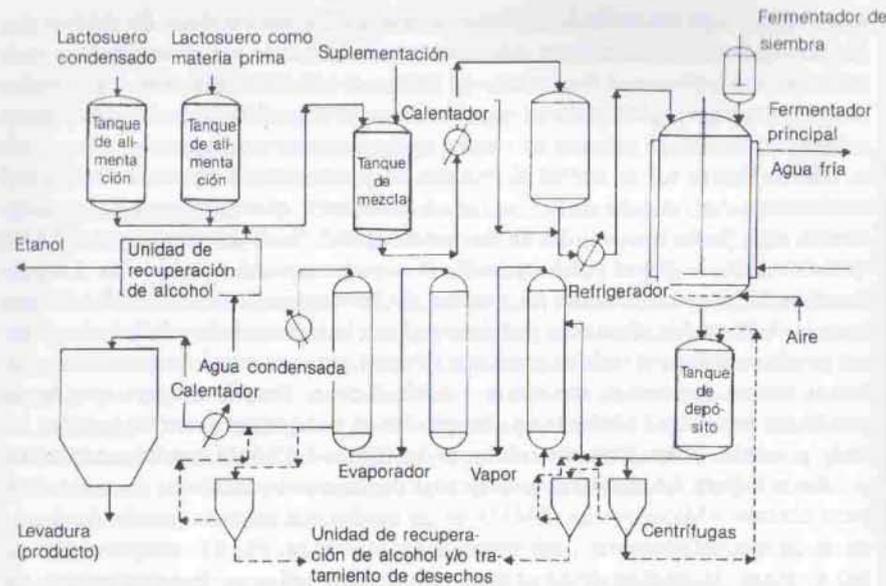


Fig. 6.5. Diagrama para la producción de alcohol y levaduras a partir de lactosuero (reproducido con permiso de Bernstein *et al.*, 1977).

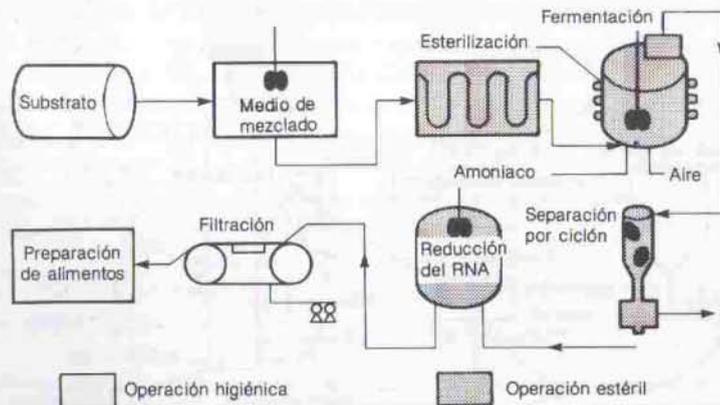


Fig. 6.6. Proceso de Rank Hovis McDougall Mycoprotein (reproducido con permiso de Anderson y Solomons, 1984).

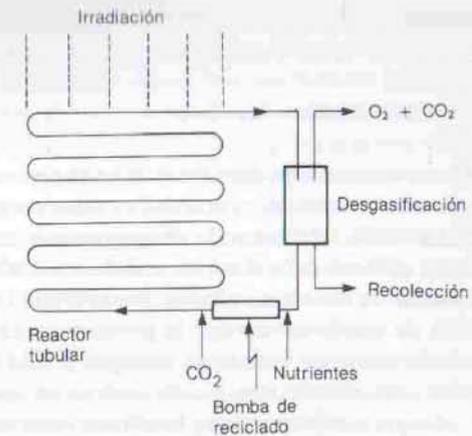


Fig. 6.7. Diagrama de un reactor con bucle tubular para la fotosíntesis de células simples (reproducido con permiso de Pirt, 1982).

PRODUCCION DE PROTEINAS DE ORGANISMOS UNICELULARES FOTOSINTETICOS

Todos los procesos de producción de proteínas de organismos unicelulares discutidos hasta ahora se basan en el reciclado de materia orgánica lo que obliga al proceso a un costo relativamente elevado y un volumen de producto bajo. La agricultura convencional tiene una eficacia fotosintética baja, pues sólo almacena aproximadamente el 1 % de la energía solar disponible. Mediante procesos situados en la interfase entre la agricultura tradicional y la producción de biomasa, se han cultivado organismos fototrópicos en lagunas grandes y las algas han sido utilizadas como componentes de la dieta humana por los aztecas de América Central y por los nativos africanos del área del lago Chad. Los biorreactores tubulares con bucle a gran escala con sistemas de cultivo continuo totalmente controlados para el cultivo de células fotosintéticas pueden almacenar hasta el 18 % de la energía solar y producen densidades celulares de más de 20 g l<sup>-1</sup> de peso seco (Fig. 6.7). Se ha sugerido que con biorreactores fotosintéticos adecuados podría conseguirse una solución a los problemas globales de suministro de energía, alimentos y compuestos químicos.

## Inóculos microbianos

### CULTIVOS «STARTER» EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los cultivos «starter» se utilizan actualmente en el procesado de alimentos para inducir diversos cambios en sus propiedades, tales como la modificación de la textura, la conservación, el desarrollo de aromas o la mejora nutricional. La utilización de estos cultivos debe tener en cuenta estos efectos, cumpliendo a la vez con las exigencias de la automatización del proceso, calidad del producto y reproducibilidad, lo que lleva consigo la producción de cultivos con una actividad definida en términos de viabilidad, eficacia y vida útil. Las principales aplicaciones de los cultivos «starter» se encuentran en las industrias de panadería y lechería, aunque también existen levaduras «starter» destinadas a la fermentación de bebidas alcohólicas y a la producción de alcohol industrial. El proceso de producción de estas últimas es similar al empleado en la manufactura de levaduras de panadería, que además se utilizan con frecuencia en las fermentaciones alcohólicas. En esta sección se van a discutir las levaduras de panadería y los cultivos «starter» en las industrias lácteas y cárnicas.

#### Levaduras de panadería

Las levaduras de panadería, *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas en la elaboración del pan, degradan los azúcares a una mezcla de alcohol y dióxido de carbono gaseoso que queda retenido en la masa. Con la excreción de compuestos como cisteína y glutatión, que rompen los puentes disulfuro intramoleculares y con la producción de gas, las levaduras actúan modificando química y mecánicamente el gluten, proteína mayoritaria del trigo.

En función de las condiciones medioambientales, las fermentaciones con levaduras de panadería pueden dirigirse a favor de la producción de alcohol o de biomasa. En un medio anaerobio la producción de alcohol es óptima, obteniéndose un rendimiento de biomasa teórico máximo en estas condiciones de  $\gamma_s = 0,075$ , mientras que en un medio aerobio en presencia de concentraciones elevadas de azúcar, también se forman cantidades substanciales de alcohol debido al efecto Crabtree. Manteniendo concentraciones bajas de azúcares en fermentaciones aerobias de levaduras con alimentación continua de azúcar se favorece la producción de biomasa, alcanzando un rendimiento de biomasa teórico máximo de  $\gamma_s = 0,54$ . Cuando el oxígeno está en exceso, un cultivo de levaduras que crecen en concentraciones 1,1 mM de glucosa ( $0,2 \text{ g l}^{-1}$ ), presenta una velocidad de respiración máxima ( $Q_{O_2}$ ), una velocidad de crecimiento específico  $\mu$  de 0,2 a 0,25 y una producción de etanol despreciable; en estas condi-

ciones el coeficiente respiratorio ( $RQ = Q_{CO_2}/Q_{O_2}$ ) vale aproximadamente 1,0. A concentraciones superiores de glucosa, la respiración o transferencia de oxígeno disminuye, se produce etanol y el coeficiente respiratorio se incrementa.

Las melazas son el sustrato más utilizado en la producción de levaduras de panadería, aunque, al ser deficientes generalmente en nitrógeno y fósforo con respecto a las necesidades nutritivas de las levaduras, deben ser suplementadas con sales amoniacales y ácido ortofosfórico u otras formas adecuadas de fosfato. La biotina, necesaria para el crecimiento de las levaduras de panadería, se encuentra en cantidad suficiente en las melazas de caña, aunque no así en las de remolacha, que en consecuencia deben ser suplementadas con esta sustancia. Por otra parte, puede emplearse una mezcla de melazas de remolacha con al menos el 20 % de melazas de caña. La urea puede reemplazar a las sales amoniacales como fuente de nitrógeno, siempre que se incorpore al medio suficiente biotina, necesaria también para su hidrólisis.

La producción de levaduras es un proceso discontinuo que necesita hasta ocho etapas. Los volúmenes de un fermentador de producción típico oscilan entre 50 y 350 m<sup>3</sup> o más. Las dos primeras etapas de inoculación exigen usualmente fermentaciones asépticas, en tanto que las etapas posteriores de inoculación y producción generalmente no las requieren y tampoco necesitan recipientes a presión. La etapa final de desarrollo del inóculo y la principal etapa de producción de biomasa implican una alimentación creciente de molasas. El principal objetivo de la etapa de producción es conseguir un rendimiento elevado de levaduras viables con un equilibrio óptimo de propiedades, actividad fermentativa alta y buena capacidad para ser almacenada. Esta última propiedad se mejora permitiendo que la aireación continúe una vez detenida la alimentación de melazas, lo que influye positivamente en la uniformidad de las levaduras y reduce la síntesis de RNA y proteínas.

En el fermentador de producción la fermentación aerobia tiene lugar a 28-30 °C, por lo que tiene que ser refrigerado puesto que se generan 3,5 Kcal por g de levadura sólida producida. Los pH están comprendidos entre 4,1 y 5,0; en el valor más bajo de este rango se reduce la contaminación bacteriana pero aumenta la absorción del material colorante de las melazas. La mayoría de los procesos de fermentación comerciales se inician a valores de pH inferiores (4,0-4,4) y finalizan a pH más elevados (4,8-5,0). Las concentraciones de levadura obtenidas están comprendidas entre 40 y 60 g l<sup>-1</sup> (seco).

La cantidad de oxígeno necesaria para el crecimiento de las levaduras es de aproximadamente 1 g o 31 mM por g de levaduras sólidas. En las últimas etapas de la fermentación discontinua de levaduras, éstas pueden producirse a una velocidad de hasta 5 g por litro y por hora, de forma que el sistema de aireación del fermentador debe tener una capacidad de transferencia de oxígeno de aproximadamente 150 mM por litro por hora. En general, se utilizan sistemas de inyección de gas eficaces sin agitación.

La separación sólido-líquido se lleva a cabo mediante centrifugación continua, produciendo una pasta de levaduras del 18-20 %, que es concentrada posteriormente hasta un 27-28 % de sólidos mediante filtración rotatoria a vacío durante la cual puede utilizarse almidón como auxiliar de fermentación. Pueden conseguirse niveles más elevados de sólidos mediante salado previo a la filtración, que reduce osmóticamente el contenido de humedad celular. La torta desmenuzable producida por filtración es un producto final ampliamente comercializado. También la torta de levaduras puede mezclarse con emulsionantes con objeto de facilitar la extrusión. Las levaduras secas activas se producen usualmente mediante secadores de lecho fluidizado en los que el aire caliente insuflado se dirige hacia las partículas a velocidades capaces de suspender la levadura en un lecho fluido. Para ciclos de secado rápido de 10 a 30 minutos, se emplean temperaturas de aire de 100-150 °C al comienzo del ciclo mientras que la levadura mantiene una temperatura de 24-40 °C. El contenido final de humedad es del 7 %.

#### ← Cultivos «starter» para las industrias lácteas

En la manufactura de productos lácteos fermentados se emplean microorganismos para producir ácido láctico, para secretar metabolitos de aroma y sabor característico y para conseguir otros cambios químicos deseables. Las especies bacterianas más importantes utilizadas para la elaboración de quesos son las mesófilas *Streptococcus cremoris* y *S. lactis*, que son homofermentativas y producen solamente ácido láctico. En la manufactura del yogur, el inóculo consiste principalmente en dos cepas homofermentativas termofílicas, *S. thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, a los que a veces se les incorpora *L. acidophilus* a concentraciones bajas. Los mohos blancos *Penicillium camemberti* y sus biotipos, *P. candidum* y *P. caseiocolum*, se utilizan en la manufactura de quesos madurados cuya superficie está recubierta por mohos, como el Brie y el Camembert, y los mohos azules, como *P. roqueforti*, en la producción de quesos madurados con mohos internos, como el Gorgonzola y el Stilton.

La tecnología para la producción de esporas fúngicas es relativamente simple y se basa en métodos de cultivo en superficie a pequeña escala, disponiéndose de esporas en forma pulverulenta producidas por diversas firmas comerciales.

Las dos especies mesofílicas bacterianas utilizadas como «starter» son susceptibles de ser invadidas por bacteriófagos, lo que representa la principal causa de fallos en la fabricación del queso, y en consecuencia el mayor esfuerzo en el desarrollo de cultivos «starter» va dirigido hacia la superación de los problemas relacionados con la infección por bacteriófagos. Durante los años treinta y cuarenta de este siglo se mantuvieron por subcultivo durante años cultivos

«starter» mezclados brutos de queso. La intensificación de la elaboración de quesos debido a la demanda acelerada incrementó la susceptibilidad de esta forma de cultivo bruto ante los fallos debidos a los bacteriófagos. En la elaboración comercial de quesos se introdujeron como «starter» cepas únicas y entonces la variabilidad de su actividad representó un serio problema. Entre las medidas tomadas para controlar la contaminación por bacteriófagos se encuentran la propagación aséptica de los «starter», la limpieza del equipo utilizado en la elaboración del queso, el empleo de tinas cerradas y el acortamiento de los tiempos de maduración, aunque estas precauciones fueron insuficientes para resolver el problema. A partir de los años cincuenta, los suministradores de cepas comerciales proporcionaron mezclas de cultivos «starter» liofilizados y posteriormente congelados definidos o indefinidos a las factorías de quesos tanto para las preparaciones «madre» como para las utilizadas como «starter» en producción. La mayoría de las cepas *S. cremoris* y *S. lactis* son sensibles únicamente a un número específico de tipos de fagos, y por tanto la sensibilidad y resistencia es distinta entre las diversas cepas de una especie individual. Los niveles de fagos pueden controlarse mediante rotación frecuente de cepas no relacionadas con fagos. La introducción de medios inhibidores de fagos con iones fosfato que acomplejan a los iones calcio necesarios para la propagación bacteriófaga, minimiza la concentración de fagos durante la preparación del «starter». Se han introducido cultivos concentrados comerciales que se inoculan directamente a los tanques de obtención de «starter» y a las tinas. Las cepas lácticas comerciales aceptables deben ser efectivas en cuanto a la producción de ácido y de aromas. Desde comienzos de los años ochenta se han desarrollado con éxito cepas insensibles a los bacteriófagos.

En la Figura 6.8 se muestra un diagrama de flujo para la producción a gran escala de cultivos lácticos «starter». El objetivo de los procesos de fermentación y recuperación es el de conseguir rendimientos elevados de producto libre de bacteriófagos. El medio de fermentación contiene usualmente nutrientes complejos como leche, suero, extracto de levaduras, peptonas, mono o disacáridos, vitaminas, tampones, sales e inhibidores de fagos, y puede esterilizarse mediante un proceso UHT. La temperatura óptima de crecimiento varía en función de la cepa, aunque generalmente está comprendida entre 25 y 30 °C para los *Streptococcus* y entre 30 y 37 °C para los *Lactobacilos*. El pH también debe controlarse, generalmente en el rango de 5,4 a 6,3, prefiriéndose un valor de 6,0 unidades, lo que se logra con amoníaco gaseoso u otros álcalis o tampones internos. Usualmente el proceso de fermentación se lleva a cabo con agitación suave. Una vez completada la fermentación, el caldo se enfría y puede concentrarse asépticamente por filtración para dar un cultivo concentrado que puede ser inoculado directamente o almacenado en forma congelada o liofilizada.

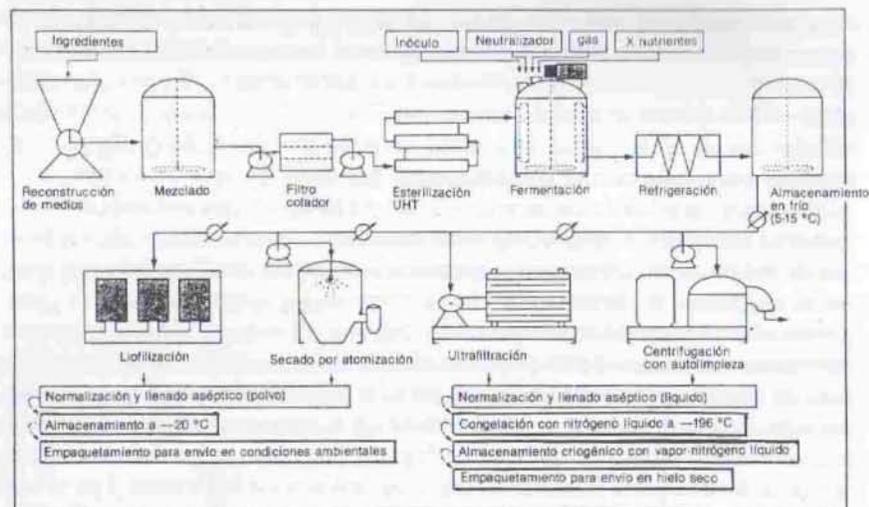


Fig. 6.8. Esquema de flujo para la producción a gran escala de cultivos iniciadores («starter») lácticos (reproducido con permiso de Porubscan y Sellars, 1979).

### Cultivos «starter» para las industrias cárnicas

El objetivo principal de la fermentación de los productos cárnicos es el de su conservación. Un proceso de fermentación microbiana que da lugar a la aparición de acidez produce la eliminación de humedad, suministrando un margen deseable de seguridad, mejora la estabilidad y las propiedades relacionadas con la calidad, como por ejemplo aromas y sabores, que no se pueden imitar simplemente con el empleo de aditivos químicos. La mayoría de los derivados cárnicos fermentados consisten en fiambres secos o semisecos, consiguiéndose mejoras en el proceso de elaboración de estos productos mediante la adición de azúcar, que acelera la producción de ácido láctico, y nitratos, que disminuyen el potencial de oxidación-reducción de la carne al convertirse en nitritos, dando lugar a la estabilización del color de la carne al impedir la oxidación de la hemoglobina y suministrando un medio ambiente favorable a los productores de ácido láctico micro-aerófilos, evitando el desarrollo de bacterias indeseables. Las características deseables de los «starter» cárnicos son: (a) capacidad para producir ácido láctico, (b) tolerancia a la sal, especias, nitratos y nitritos y (c) capacidad para reducir el nitrato. Actualmente, esta industria utiliza nitritos en vez de nitratos con objeto de eliminar la necesidad de «starter» reductores de nitrato en algunas fermentaciones cárnicas.

Tabla 6.3. Otras aplicaciones de los inóculos microbianos

Aplicaciones	Especies microbianas	Función
Insecticidas	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Patóg. para las larvas de lepidópteros
	<i>Bacillus pupilliar</i> <i>Bacillus alvi</i> , <i>Bacillus circulans</i> y <i>Bacillus sphaericus</i> } <i>Serratia piscatorum</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Aerobacter aerogenes</i> }	Patógenos para el escarabajo japonés Patógeno para los mosquitos Matan las larvas de mariposa al reducir su pH intestinal
Tratamiento de minerales	<i>Beauveria tenella</i> <i>Vetivillium lecanii</i> <i>Hirsutella thompsonii</i> <i>Metarhizium</i> sp.	Patógenos para las larvas de chinche Controla los áfidos y la mosca blanca Controla los ácaros de los cítricos Controla los lepidópteros
	<i>Thiobacillus</i> spp. <i>Beeggiatoa</i> spp. <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Chromobacterium</i> spp. }	Oxida el azufre Oxida el H <sub>2</sub> S en los suelos Mineralización del fosfato y disolución del fósforo
Fijación de nitrógeno	Procariotas que fijan el nitrógeno simbiótico y que viven libres	Interés en la producción de inóculos de leguminosas de las especies <i>Rhizobium</i> para incrementar la fijación de nitrógeno
Aceleración del crecimiento de las plantas mediante hongos micorrizales	Endomycorrhizae de la familia Endogonaceae, phylum Zygomycota (hongos arbusculares-vesiculares). Ectomicorrhizae de los phylum Dikaromycota- la mayoría son Basidiomycetos	Incrementa la absorción de nutrientes y agua por la raíz, y protege frente a las enfermedades
Para ensilaje	<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , otras bacterias productoras de ácido	Reducción del pH para acelerar el ensilado
Probióticos	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , bacterias del rumen	Incrementa la digestibilidad de los productos destinados a la alimentación animal
Tratamiento de desechos	Metanógenos <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. y <i>Nocardia</i> spp.	Digestión anaerobia Degrada los alcanos y desechos resistentes
	Bacterias productoras de enzimas extracelulares	Hidroliza las proteínas, los carbohidratos y las grasas de los desechos

Los organismos empleados con éxito como inoculantes «starter» en las industrias cárnicas son: (i) *Pediococcus cerevisiae*, con capacidad de producir ácido pero no de reducir al nitrato, (ii) *Micrococcus*, que reducen el nitrato y contienen catalasa para los peróxidos producidos durante el proceso de fermentación, y (iii) otras bacterias productoras de ácido, como *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* y *Leuconostoc mesenteroides*. Se dispone comercialmente de cepas puras y mezclas de estos cultivos en forma congelada o liofilizada, y se prevee que en el futuro la industria cárnica vaya a hacer mucho mayor uso de los inoculantes microbianos, no solamente en los derivados fermentados sino también en el control del crecimiento de microorganismos indeseables.

#### OTRAS APLICACIONES DE LOS INOCULANTES MICROBIANOS

Los inoculantes microbianos se utilizan en una gran variedad de campos distintos al alimentario. En la Tabla 6.3 pueden encontrarse ejemplos de las actuales y también de algunas otras aplicaciones potenciales.

## Capítulo 7

### *Fermentaciones de los alimentos*

Los microorganismos han sido utilizados durante siglos para modificar los alimentos, y tanto éstos como las bebidas fermentadas constituyen un sector primario y extremadamente importante de la industria alimentaria. En este capítulo se van a describir algunas de las aplicaciones de los procesos de fermentación en la producción de bebidas alcohólicas, elaboración de quesos, fabricación de pan, alimentos basados en soja fermentada, procesado de la carne y elaboración del vinagre.

#### Bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas se producen a partir de diversas materias primas, pero especialmente a partir de cereales, frutas y productos azucarados. Entre ellas hay bebidas no destiladas, como la cerveza, el vino, la sidra y el sake, y destiladas, como el whisky y el ron, que se obtienen a partir de cereales y melazas fermentadas, respectivamente, en tanto que el brandy se obtiene por destilación del vino. Otras bebidas destiladas, por ejemplo el vodka y la ginebra, se elaboran a partir de bebidas alcohólicas neutras obtenidas por destilación de melazas, cereales, patatas o lactosuero fermentados. Además también se obtienen una gran variedad de vinos de alta graduación mediante adición de alcohol

destilado a los vinos normales con objeto de elevar su contenido alcohólico hasta el 15 o el 20 %; entre éstos se incluyen productos tan notables como el jerez, el oporto y el madeira.

Un detalle común importante en la producción de todas estas bebidas alcohólicas es el empleo de levaduras para convertir los azúcares en etanol. Por consiguiente, la primera parte de esta sección se concentrará en la biología de las fermentaciones de levaduras y seguidamente se discutirán los procesos concretos de obtención de la cerveza, el whisky y el vino.

#### BIOLOGIA DE LAS FERMENTACIONES CON LEVADURAS

Aproximadamente el 96 % de la fermentación del etanol se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o especies relacionadas, particularmente *S. uvarum*. El etanol se produce en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), en la que el piruvato producido durante la glicosilación se convierte en acetaldehído y etanol. La reacción global es la siguiente:



El rendimiento teórico de 1 g de glucosa es de 0,51 g de etanol y 0,49 g de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, en la práctica, aproximadamente el 10 % de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO<sub>2</sub> alcanzan el 90 % del valor teórico. El ATP formado se utiliza para las necesidades energéticas de la célula.

La envoltura de la célula de levadura incluye una membrana plasmática, un espacio periplásmico y una pared celular constituida principalmente por polisacáridos y una pequeña cantidad de péptidos. La pared tiene una estructura semirrígida permeable al soluto que proporciona a las levaduras una considerable fuerza compresional y tensil. Los grupos carboxilo de los péptidos de la pared celular confieren a las levaduras utilizadas en la elaboración de cerveza una capacidad de floculación importante, lo que facilita la separación sólido-líquido después de la fermentación. Se cree que la floculación se debe a la formación de puentes salinos entre los iones calcio y estos grupos carboxilo de la pared celular.

#### Condiciones de la fermentación

En la fermentación las levaduras utilizadas para la elaboración de cerveza (*S. cerevisiae*) utilizan los azúcares sacarosa, fructosa, maltosa y maltotriosa en este orden. La sacarosa es hidrolizada primeramente por la invertasa localizada en el espacio periplásmico extracelular. Los azúcares son transportados a través

de la membrana celular por transporte activo o pasivo, mediado por permeasas producidas constitutivamente o inducibles. La maltosa y la maltotriosa son hidrolizadas intracelularmente por la  $\alpha$ -glucosidasa. El *Saccharomyces uvarum* (*S. carlsbergensis*) se distingue taxonómicamente del *S. cerevisiae* en que también utiliza melibiosa. El *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces lactis*, que a diferencia de *S. cerevisiae* pueden fermentar la lactosa, tienen un sistema lactosa-permeasa para transportar la lactosa dentro de la célula, donde se hidroliza a glucosa y galactosa, que entran en la glicolisis. Excepto los *Saccharomyces diastaticus*, que no son adecuadas para la elaboración de cerveza, todas las levaduras *Saccharomyces* son incapaces de hidrolizar el almidón y las dextrinas, y por consiguiente, el empleo de materiales basados en almidón para la fermentación alcohólica requieren la acción de enzimas exógenos como las  $\alpha$ -y  $\beta$ -amilasas de la malta o enzimas microbianos como  $\alpha$ -amilasa, amiloglicosidasa (glucoamilasa) y pululanasa. Los azúcares mayoritarios del mosto son la glucosa y la fructosa y puesto que el *S. cerevisiae* metaboliza preferencialmente la glucosa; el azúcar no fermentado que permanece en el vino resultante es la fructosa. Por el contrario, las levaduras del vino de Sauternes fermentan la fructosa más rápidamente que la glucosa.

El mosto de cerveza producido a partir de malta contiene 19 aminoácidos además de otros nutrientes. Estos aminoácidos son asimilados a distintas velocidades durante la fermentación. Un aminoácido permeasa general (GAP) puede transportar todos los aminoácidos básicos y neutros excepto la prolina. En las levaduras existen al menos otros 11 sistemas de transporte de aminoácidos más específicos. La prolina permeasa es inhibida por otros aminoácidos y por el amoniaco.

Aunque las fermentaciones alcohólicas son en gran medida anaerobias, las levaduras necesitan algo de oxígeno para sintetizar algunos esteroides y ácidos grasos insaturados componentes de la membrana. El mosto de la cerveza contiene normalmente niveles subóptimos de esteroides y ácidos grasos insaturados, pero cuando el medio se suplementa con ácido oleico u oleanoico, la necesidad de oxígeno desaparece.

Muchas cepas de *S. cerevisiae* pueden producir concentraciones de etanol de hasta el 12-14 %. Existe un cierto interés en el empleo de levaduras tolerantes de cantidades elevadas de alcohol en los procesos de fabricación de cerveza con gravedad elevada y en la producción de alcohol para la destilación con vistas a incrementar la productividad de la planta y disminuir los costos de destilación. Existen cepas seleccionadas capaces de producir hasta un 18-20 % de alcohol, aunque la velocidad de fermentación se ve fuertemente reducida cuando la concentración de etanol aumenta. Los mostos con un contenido muy elevado de azúcares fermentan únicamente con levaduras osmofílicas como *Saccharomyces rouxii* y *S. bailli*, que poseen una gran capacidad para fermentar la fructosa.

La composición en fosfolípidos de la membrana plasmática es importante para la tolerancia del etanol, observándose un incremento de ésta cuando el contenido de ácidos grasos insaturados aumenta. La tolerancia alcohólica puede elevarse suplementando el medio de crecimiento con ácidos grasos insaturados, vitaminas y proteínas. Los factores fisiológicos tales como la forma de aporte del sustrato, la acumulación de etanol intracelular, la presión osmótica y la temperatura influyen en la tolerancia de las levaduras al etanol. Los enzimas glicolíticos de las levaduras, hexoquinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato decarboxilasa son sensibles a la concentración de etanol.

En las levaduras, los valores de pH comprendidos entre 3 y 6 son la mayoría de las veces favorables al crecimiento y actividad fermentaria; esta última es mayor cuanto mayor sea el pH y se produce una caída notable a valores de pH de 3-4. El pH influye en la formación de subproductos; por ejemplo, a valores de pH elevados se incrementa la formación de glicerol. El pH del mosto de uva está generalmente comprendido entre 3 y 3,9 debido a su elevado contenido de ácidos (5-15 g/l), principalmente tartárico y málico, de forma que, como la mayoría de las bacterias, con excepción de las bacterias del ácido acético y láctico prefieren pH más neutros, la susceptibilidad del mosto de vino a la contaminación bacteriana es reducida.

Las temperaturas óptimas de la fermentación, la respiración de las levaduras y el crecimiento celular son claramente diferentes. La velocidad de fermentación aumenta generalmente con la temperatura entre los 15 y los 35 °C y los niveles de glicerol, acetona, buteno-2,3-diol, acetaldehído, piruvato y 2-cetoglutarato se elevan en los caldos de fermentación. La formación de niveles elevados de alcohol también depende de la temperatura. En los vinos blancos, la menor temperatura de fermentación da lugar a vinos más frescos y afrutados, y el riesgo de infección bacteriana y de producción de ácidos volátiles como resultado es reducido. Para la producción de vino tinto se utilizan temperaturas más elevadas, de 22 a 30 °C, y la fermentación con los hollejos conduce a la intensificación del color y a la producción de un rico aroma.

#### Compuestos organolépticos

En la producción de bebidas alcohólicas deben controlarse las fermentaciones de forma que, por un lado se asimilen los carbohidratos y otros nutrientes y se conviertan en alcohol y en compuestos con aromas característicos y deseables, y por otro lado, se minimice la formación de aromas y sabores indeseables. Entre los componentes del aroma y sabor se encuentran otros alcoholes diferentes del etanol, ésteres, compuestos carbonílicos, ácidos orgánicos, compuestos azufrados, aminas y fenoles.

Cuantitativamente, y en función de su papel en el aroma y sabor, los componentes más importantes presentes en las bebidas alcohólicas son los alcoho-

les superiores, denominados también alcoholes de fusel o aceites de fusel, entre los cuales los más significativos en la cerveza y el vino son el alcohol amílico, el isoamílico y el 2-fenoetanol. El vino tinto tiene una concentración mayor de estos compuestos que el vino blanco. Las bebidas destiladas tienen un espectro bastante diferente de alcoholes superiores, que incluyen butanoles y pentanoles. El glicerol, alcohol polihídrico, está presente en casi todas las bebidas alcohólicas. En el vino, el glicerol se encuentra a concentraciones de hasta el 1 % (peso/volumen) y confiere cuerpo a esta bebida.

En muchas bebidas y licores, los ésteres constituyen un grupo importante de compuestos volátiles debido a su penetrante aroma afrutado. Entre ellos, el acetato de etilo está presente en muchas bebidas a concentraciones organolépticamente importantes. Otros ésteres importantes incluyen el formiato de etilo y el acetato de isoamilo.

El acetaldehído, con propiedades organolépticas indeseables, se produce como un compuesto intermedio durante las fermentaciones alcohólicas, obteniéndose niveles altos por tasas de levaduras elevadas o excesiva aireación. El diacetilo y la pentano-2,3-diona, formados fuera de las células de la levadura por decarboxilación oxidativa del  $\alpha$ -acetolato y el  $\alpha$ -cetohidroxibutirato, tienen aromas y sabores indeseables característicos. Las levaduras pueden reducir el diacetilo y la pentano-2,3-diona. La presencia de exceso de diacetilo en la cerveza se produce cuando el  $\alpha$ -acetolactato aparece en una etapa en la que las levaduras ya han sedimentado o han perdido su capacidad para reducir el diacetilo a acetoina. El exceso de diacetilo en la cerveza también puede deberse a la presencia de organismos que la deterioran, como *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

Durante la fermentación primaria del mosto de la cerveza se producen cantidades considerables de  $\text{SH}_2$  provenientes de la reducción de los compuestos azufrados. Aunque en la cerveza pueden ser aceptables cantidades pequeñas de compuestos azufrados, y en la cerveza normal el  $\text{SO}_2$  está usualmente presente a concentraciones por debajo de su umbral de sabor, el exceso produce aromas y sabores desagradables. El dióxido de azufre influye positivamente en la fermentación alcohólica, puesto que se une al acetaldehído y además inhibe algunas de las reacciones de oxidación indeseables. En el mosto del vino, el  $\text{SO}_2$  inhibe algunos microorganismos indeseables, entre ellos las bacterias del ácido láctico y ácido acético, así como algunas levaduras naturales que producen un exceso de ácidos volátiles, piruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato. Además la producción del desagradable sabor del ácido acético también inhibe las fermentaciones de levaduras, particularmente combinado con el etanol. *Saccharomyces cerevisiae* es más susceptible a esta inhibición que *Saccharomyces ludwigii* y *Schizosaccharomyces pombe*. En los mostos cuya acidez total es baja, es muy útil emplear  $\text{SO}_2$  para inhibir la fermentación malo-láctica por las bacterias del ácido láctico, impidiendo la disminución posterior del nivel de ácido. Una concentración elevada de  $\text{SO}_2$  puede retrasar el comienzo de la fermentación.

## FERMENTACION MALO-LACTICA

El bajo pH del mosto y del vino suministran un medio selectivo para el crecimiento de las bacterias del ácido acético y del ácido láctico, aunque la supervivencia de las primeras sea usualmente corta debido a las propiedades reductoras del medio. Las bacterias lácticas del vino son anaerobias facultativas u organismos microfilicos que son homofermentivos (todas las *Pediococcus* y algunos *Lactobacillus* producen ácido láctico a partir de glucosa) y heterofermentivos (todos los *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* producen ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> a partir de la glucosa). Las bacterias lácticas pueden metabolizar los ácidos málico y tartárico presentes en el vino a concentraciones elevadas, así como al ácido cítrico, presente en cantidades más bajas. En las regiones del norte productoras de vino puede ser deseable la reducción bacteriana de los ácidos, mientras que en otras regiones, en las que la concentración de ácidos es pequeña, es importante impedir la posterior pérdida de acidez. También existen métodos químicos para reducir la acidez. La reducción de los ácidos puede impedir el deterioro de los vinos de pH elevado. A pH 3,3-3,4, los *Leuconostoc oenus* fermentan el ácido málico aunque los *Pediococcus* no lo hacen. Los *Leuconostoc* se adaptan bien a los pH bajos y generalmente se prefieren siempre que se desee una fermentación malo-láctica. Una fermentación malo-láctica por *Pediococcus* va con frecuencia acompañada de la formación de diacetilo e histamina, indeseables.

## ELABORACION DE LA CERVEZA

*Materias primas y preparación de la malta*

Los cereales malteados se han utilizado tradicionalmente en la elaboración de cerveza porque el proceso de malteado da lugar a la producción de los enzimas necesarios para la extracción y conversión del almidón en azúcares fermentables. En el proceso de malteado, los granos se sumergen en agua a temperaturas de 10 a 25 °C durante 48-60 horas, tiempo durante el cual el contenido de humedad crece desde el 10-12 % al 44-50 %. Una vez remojado el grano, la germinación se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 15 y 21 °C, dependiendo del tipo de malta, en tambores o en compartimientos con suelo perforado, controlando la humedad y el flujo de aire, con lo que se producen diversos enzimas hidrolíticos, entre ellos  $\alpha$ -amilasa, bioglucanasas y peptidasas que conducen a la degradación enzimática de hemicelulosa,  $\beta$ -glucano, péptidos y algo de almidón. La  $\beta$ -amilasa, ligada a otras proteínas en la cebada no germinada, se libera durante este proceso. Una vez logrado el grado de modificación deseado,

do, la malta se seca hasta que su contenido de humedad sea de aproximadamente el 6 % inicialmente a una temperatura de 65 °C, y después a 80-85 °C para reducir aún más su humedad, hasta el 4,5 %, con lo que se detienen los procesos respiratorios de la germinación, se inhibe el crecimiento microbiano y se fomenta la reacción de Maillard, que contribuye a dar el aroma y color obscuro a la malta.

La malta de buena calidad tiene suficiente actividad enzimática como para facilitar la extracción y conversión de mezclas de maceración que contienen hasta el 60-70 % de cereales además de la propia malta. Los enzimas microbianos industriales pueden substituir a la malta como fuente enzimática para la producción de mosto de cerveza, y por consiguiente, las bebidas alcohólicas basadas en cereales pueden obtenerse ahora a partir de una gran variedad de cereales, como cebada, trigo, arroz y maíz, o combinaciones de cereales, con o sin la inclusión de cereal malteado.

*Maceración y filtración*

Durante la maceración, las materias primas se extraen con agua, con lo que se solubilizan, hidrolizan enzimáticamente y extraen del cereal los carbohidratos y otros nutrientes necesarios para la fermentación bajo condiciones de calentamiento controlado. En esta operación, la relación agua:grano es usualmente de 2,5-3,0 a 1,0. La temperatura empleada varía de una cervecería o destilería a otra y depende de consideraciones tales como la naturaleza del cereal utilizado, las propiedades de los enzimas dependientes de la temperatura, las características del producto deseado y la naturaleza y capacidad del equipo. La mayoría de los sistemas de maceración corrientes se clasifican bajo los epígrafes de sistemas de infusión o decocción o como una combinación de ambos. En la maceración por infusión, empleando malta bien elaborada, el grano se introduce en una cámara de maceración, cuyo fondo está constituido por una placa filtrante (Fig. 7.1), parcialmente llena de agua caliente, a una temperatura que se mantiene constante a unos 65 °C para permitir la conversión enzimática y la extracción del mosto. A continuación el mosto se separa por filtración y la masa que sale se deshace para lavar los azúcares residuales hasta que el peso específico del líquido que sale es de 1,005.

En los sistemas de decocción, la harina se macera a una temperatura menor, de aproximadamente 50 °C, que se va aumentando transfiriendo parte de la masa a una caldera, donde hierve y retorna después hasta la masa restante. En los sistemas de decocción doble, esta operación se lleva a cabo dos veces (Fig. 7.2a). Una vez macerado, el mosto se separa de la masa agotada por filtración en una tina denominada cámara de clarificación (similar a una cámara de maceración, aunque con menor profundidad), o mediante el empleo de un filtro de placas.

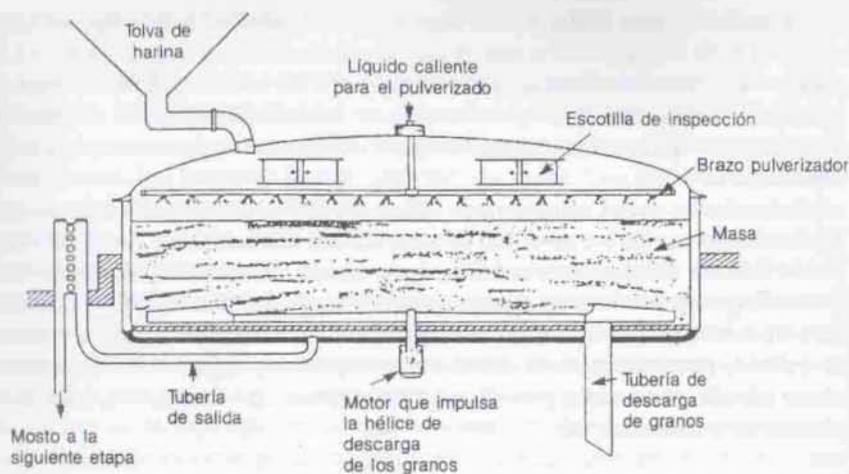


Fig. 7.1. Cámara de amasado por infusión (reproducido con permiso de Hough, 1985).

La temperatura óptima de las proteasas,  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasa y  $\beta$ -glucanasa de la malta dicta las condiciones de la maceración. En el proceso por infusión la temperatura de la masa favorece la actividad de la amilasa y la  $\beta$ -glucanasa, siendo más satisfactoria con las maltas bien modificadas en las que durante el malteado ya se ha producido una degradación proteica considerable. La masa sometida a decocción tiene usualmente temperaturas iniciales de 50-55 °C para una actividad proteolítica óptima, a 63-65 °C para la degradación óptima del almidón y los  $\beta$ -glucanos y a 73 °C para la separación óptima del mosto. En América del Norte, las harinas de maíz y arroz, que deben cocerse para que gelatinice bien el almidón, son ampliamente utilizadas como adjuntos con un sistema de maceración doble (Fig. 7.2b). La temperatura de la primera maceración, que contiene harina y algo de malta, se eleva a 65-70 °C con objeto de reducir la viscosidad del almidón previo a la ebullición. Durante este proceso, la masa de malta mayoritaria se mantiene a una temperatura de 45-50 °C para favorecer la proteólisis. Al combinar la harina con la masa mayoritaria, la temperatura se eleva hasta 67 °C, lo que favorece la amilólisis y después se calienta hasta 73 °C con objeto de reducir la viscosidad antes de la filtración. Cuando una masa se convierte predominantemente utilizando enzimas microbianos, las temperaturas utilizadas reflejarán la actividad y estabilidad térmica de estos enzimas.

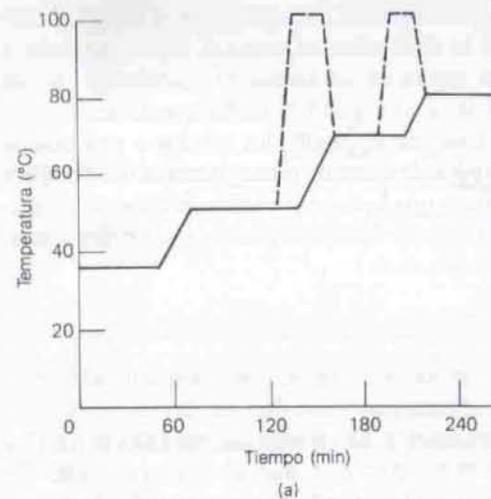
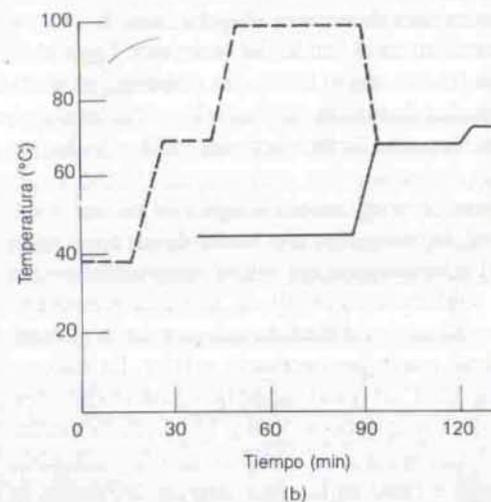


Fig. 7.2. Perfiles de temperatura-tiempo de un:

(a) programa de un sistema de decocción doble y



(b) procedimiento de amasado doble.

#### Separación del mosto

Una vez clarificado el mosto, se hierve durante 60-90 minutos con objeto de favorecer (a) la inactivación de los enzimas, (b) la esterilización del mosto, (c) la precipitación de las proteínas y los taninos, (d) la extracción de sustancias amargas derivadas del lúpulo, (e) la producción de color, aromas y sabores por la caramelización del azúcar, la formación de melanoidina y la oxidación

de los taninos y (f) la destilación de los volátiles. Seguidamente se separa el precipitado proteico formado durante la ebullición así como el lúpulo agotado y el resto de los sólidos, a veces con ayuda de un agente de floculación, en un separador de torbellino o mediante la combinación de un tanque de sedimentación y un filtro o una centrifuga. Una vez separados los sólidos o residuos, el mosto se enfría mediante un cambiador de calor de placas hasta la temperatura inicial de fermentación y se airea hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea de 5-15 mg/l para favorecer la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroles por las levaduras.

### Fermentación de la cerveza

El mosto se inocula con levaduras hasta un recuento de aproximadamente  $10^7$  células por ml o mayor si se necesita una velocidad de fermentación más elevada. Tradicionalmente, en la producción de cerveza inglesa (ale) entre 15 y 22 °C se utilizaban levaduras de fermentación alta, que ascendían a la superficie hacia el final de la fermentación, y podían por tanto ser separadas en forma de espuma, mientras que en la producción de cerveza «lager» entre 8 y 15 °C se utilizaban levaduras que sedimentaban en el fondo del recipiente hacia el final de la fermentación (levaduras de fermentación baja). Sin embargo, en particular con la introducción de los grandes depósitos fermentadores cilindrocónicos y el uso de centrifugas, la distinción entre fermentaciones «altas» y «bajas» tiende a desaparecer.

En las fermentaciones típicas para obtener cerveza «lager», el recuento inicial de levaduras es de  $10^7$  células/ml, la concentración inicial de carbohidratos es de 12 °P (peso específico 1.050) y la temperatura inicial aproximadamente 10 °C. Al cabo de unos 3 días la población de levaduras se ha incrementado 4 ó 5 veces. La temperatura tiende a aumentar a medida que avanza la fermentación y cuando se alcanza el máximo puede ser necesario enfriar. La concentración de carbohidrato desciende a 2-2,5 °P (peso específico 1.080-1.010) después de cinco días. Si la temperatura se mantiene entre 6 y 10 °C, la fermentación dura unos 10 días. En la Fig. 7.3 se muestra el curso de una fermentación tradicional de cerveza «lager» llevada a cabo en la zona inferior del rango de temperatura. Todas las fermentaciones producidas entre 15 y 22 °C se completan usualmente en unos 3 días.

Durante el proceso de fermentación, el pH disminuye aproximadamente una unidad a partir de un valor inicial de 5,2. Muchos ácidos, especialmente el ácido acético, formado por oxidación del acetaldehído, contribuyen a esta caída del pH.

Los azúcares fermentables que normalmente constituyen el 70-80 % de los carbohidratos del mosto se convierten en etanol durante la fermentación. El

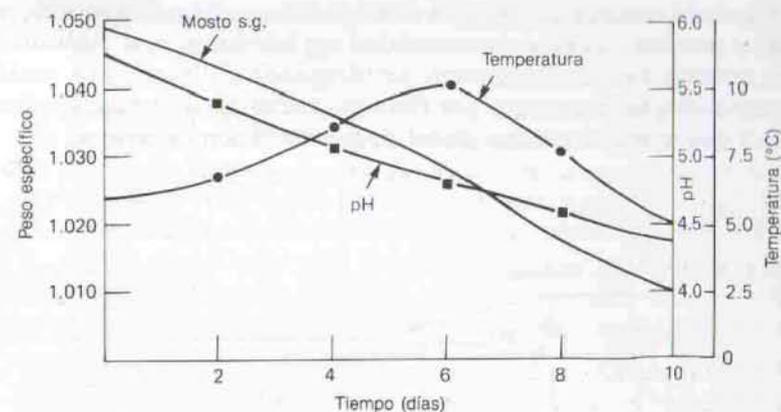


Fig. 7.3. Evolución con el tiempo de un proceso de fermentación tradicional de cerveza «lager».

20-30 % de los carbohidratos residuales consiste principalmente en dextrinas superiores o dextrinas límite no susceptibles de ser atacadas por las amilasas de la malta debido a la presencia de enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1-6. En la producción de cerveza baja en carbohidratos, estas dextrinas límite pueden ser hidrolizadas a azúcares fermentables por la amiloglucosidasa microbiana. En principio, este enzima debe hacerse actuar sobre el mosto antes de su ebullición, ya que ésta lo inactiva. La amiloglucosidasa es también efectiva en la hidrólisis de las dextrinas límite durante la etapa de fermentación, y no se inactiva con la pasterización posterior por lo que puede permanecer activa en el producto final.

### Maduración y acondicionamiento final de la cerveza

La cerveza recién fermentada debe someterse a diversos tratamientos antes de ser envasada finalmente para su distribución. La maduración implica una fermentación secundaria por las levaduras residuales que pasan a la cerveza desde el fermentador primario. Durante este proceso, se asimila el diacetilo así como las pequeñas cantidades de maltotriosa residual, y la concentración de algunos ésteres aumenta. El dióxido de carbono, producido en la fermentación secundaria, o el dióxido de carbono añadido, ayuda a purgar la cerveza de oxígeno,  $H_2S$  y compuestos volátiles no deseados. A veces se añaden aditivos para clarificar el mosto y ajustar el aroma, sabor y color de la bebida, y para favorecer la estabilidad de la espuma así como la microbiológica. Los tiempos y la temperatura utilizados varían de una cervecería a otra, aunque usualmente se utilizan temperaturas bajas, de 2 a 6 °C, con un período de almacenamiento que oscila entre 4 días y 4 semanas.

Después del acondicionamiento, la cerveza contiene células microbianas, precipitados proteicos y sustancias coloidales, que hay que separar mediante diversos procesos, como la floculación, centrifugación y filtración. La estabilidad microbiológica se consigue por filtración esteril y/o pasterización. En la Figura 7.4 se resume el proceso global de la elaboración de cerveza.

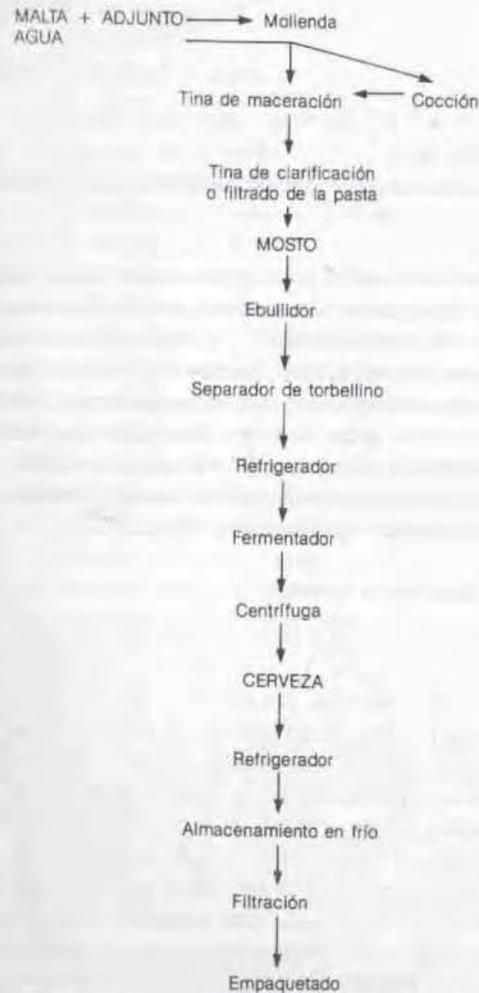


Fig. 7.4. Resumen de los procesos que intervienen en la elaboración de cerveza.

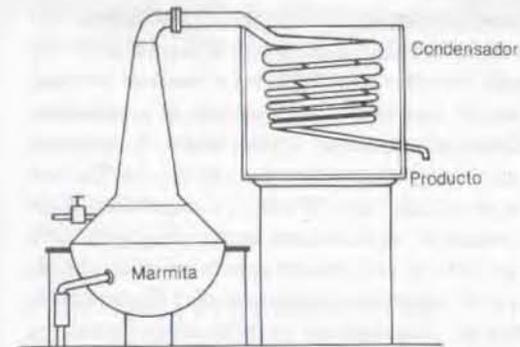


Fig. 7.5. Alambique.

#### PRODUCCION DE WHISKY

El whisky es la bebida alcohólica obtenida por destilación de un extracto acuoso fermentado de cebada malteada y otros cereales, y sus propiedades varían en función de las materias primas utilizadas y de la naturaleza de los procesos de fermentación y destilación. El whisky escocés se obtiene a partir únicamente de malta o de una mezcla de whisky de malta y de un whisky escocés más ligero, obtenido a partir de una mezcla de cebada malteada y no malteada, no cocida. El característico aroma y sabor a turba del whisky escocés de malta se debe al empleo de este tipo de carbón para el secado de los granos. El whisky bourbon, producido en Estados Unidos, y el whisky de centeno de Canadá, se obtienen a partir de mezclas en las que predomina el maíz y el centeno respectivamente, con malta y otros cereales como componentes minoritarios.

#### Maceración

En Escocia e Irlanda se obtiene un mosto claro mediante un proceso de maceración por infusión. Las técnicas de preparación del mosto son similares a las empleadas en la industria cervecera, excepto que se añade amiloglucosidasa, que permanece activa a lo largo de todo el proceso de fermentación optimizando la fermentabilidad del mosto. En América del Norte, debido a que los puntos de gelatinización de su almidón son más altos, los cereales no malteados, particularmente el maíz, deben someterse a un proceso de precocción antes de mezclarse con los otros componentes de la masa para su conversión enzimática, para lo cual se utilizan sistemas de cocción a presión continuos y discontinuos a temperaturas comprendidas entre 110 y 170 °C.

En el proceso de cocción discontinuo americano, el maíz triturado se amasa con agua hasta formar una pasta y se introduce en un horno agitado a una concentración de aproximadamente un 25 % (peso/volumen). La  $\alpha$ -amilasa termoestable hidroliza parcialmente el almidón gelificado (prelicuefacción), reduciendo la viscosidad de la pasta lo suficiente como para permitir que la agitación continúe. El enzima se inactiva cuando la temperatura supera los 110 °C y el almidón restante gelifica. La masa se enfría hasta 70-100 °C, dependiendo de las características de estabilidad térmica de la  $\alpha$ -amilasa empleada en la etapa de post-licuefacción. Cuando el almidón se ha licuado totalmente bajo la acción de la  $\alpha$ -amilasa, la temperatura se reduce nuevamente a 60 °C y se añade amiloglucosidasa para que convierta las dextrinas en glucosa (sacarificación). En los procesos continuos para la cocción y licuación del maíz se logra un mayor control y eficacia en el empleo del equipo. La temperatura de la masa se eleva a 150 °C por inyección de vapor en una cámara de cocción y después se enfría rápidamente hasta 80-90 °C para la postlicuación, esperando 30-60 minutos antes de transferirla al tanque de sacarificación. Cuando la mezcla final está formada por malta y maíz, pueden combinarse en la etapa de sacarificación, lo que permite a los enzimas de la malta contribuir al proceso hidrolítico.

En la producción de whisky, una parte de los restos (stillage) de las destilaciones previas de whisky pueden mezclarse con el agua empleada en la maceración de los granos de cereal, con objeto de reducir algo el pH de la pasta, dada su capacidad tamponante, y servir como fuente de nitrógeno para la nutrición de las levaduras; además es un eficaz sistema de reciclado de desechos.

#### *Fermentación del whisky*

Los whiskys escoceses e irlandeses se obtienen por fermentación de mostos clarificados, mientras que en Norteamérica se fermenta directamente la pasta sin eliminar los sólidos.

Al contrario que en las cervecerías, los mostos utilizados en la elaboración de whisky no están lupulados. Además, no se someten a un proceso de cocción, por lo que la actividad enzimática se manifiesta a lo largo de la fermentación y la concentración de bacterias contaminantes puede ser superior. La mayoría de las bacterias aerobias mueren durante la fermentación anaerobia, aunque por otro lado, en estas condiciones pueden desarrollarse *Lactobacillus* y *Streptococcus*, aunque, siempre que su número esté controlado, los metabolitos excretados por ellos contribuyen a las cualidades organolépticas de la bebida; si crecen en exceso, se observa una disminución global del rendimiento de alcohol y pueden aparecer propiedades organolépticas indeseables. Las levaduras de destilería se seleccionan en base a su adaptabilidad a las condiciones de trabajo y a su capacidad para producir destilados con alto rendimiento en etanol y en componentes del aroma.

Cuando los fermentadores están equipados con sistemas de refrigeración eficaces, la temperatura de fermentación se ajusta a 33 °C y se mantiene durante el proceso mediante enfriamiento. Sin embargo, las destilerías que no disponen de sistemas de refrigeración inician el proceso a una temperatura inferior, unos 20 °C, con objeto de que durante la fermentación la temperatura no supere los 33 °C. Frecuentemente se considera el empleo de temperaturas inferiores al comienzo del proceso, cuando las levaduras están creciendo, puesto que cuanto más alta sea la temperatura más se retardará el crecimiento de las levaduras y se favorecerá el de las bacterias. Una fermentación de whisky de malta típica produce una concentración de etanol del 9 al 12 % en 36-48 horas a partir de un mosto cuya densidad inicial es de 1.050 a 1.060.

#### *Destilación y maduración del whisky*

Los alambiques se diseñan para separar selectivamente los compuestos volátiles, particularmente los productores de aroma, y dar lugar a compuestos que generan aromas adicionales como resultado de las reacciones químicas ocurridas durante este proceso. Los principales componentes del alambique tradicional (Fig. 7.5) son la marmita de cobre y el serpentín del condensador. Estos alambiques, que proporcionan un grado pequeño de rectificación, se utilizan exclusivamente para destilar whisky de malta escocés y la mayor parte del whisky irlandés y dan productos ricos en ésteres, aldehídos y alcoholes superiores. Los alambiques continuos se emplean generalmente en el procesado del whisky de grano y disponen de dos columnas, denominadas analizador y rectificador. La alimentación, precalentada, se vaporiza en el analizador y la mayor parte del agua y las sustancias menos volátiles se eliminan en el rectificador. La cantidad eliminada depende del producto, ya que un whisky puede contener algunos o todos estos compuestos, aunque, en el caso de alcoholes neutros, no debe estar presente ninguno.

El whisky se deja madurar normalmente en barricas de roble, al menos durante el tiempo marcado por la ley, aunque puede prolongarse más cuando se quiera obtener un producto de más alta calidad. Durante la maduración, se producen diversas reacciones físicas y químicas, entre las que se incluyen la extracción de los componentes de la madera, la oxidación de los productos destilados y de los extractos de la madera, y la interacción de los diversos componentes del destilado con los extraídos de la madera. La etapa final consiste en la mezcla de whiskies madurados para conseguir diversos productos individuales.

#### ELABORACION DEL VINO

El proceso de producción del vino blanco se basa en el prensado de la uva y la separación de las pepitas y las pieles del jugo mediante prensas de tornillo

o hidráulicas con objeto de obtener un mosto claro para la fermentación, al que se añade dióxido sulfuroso, que inhibe los enzimas oxidantes y el crecimiento de microorganismos indeseables. El mosto prensado se libera de material particulado mediante centrifugación, filtración o sedimentación, y se inocula con levaduras del vino a temperaturas inferiores a 20 °C. Durante el proceso de fermentación la temperatura va ascendiendo, pero no debe superar los 36-38 °C para no matar las levaduras. Cuando finaliza la fermentación, se obtiene una concentración de etanol del 8 al 15 % en volumen. El vino se separa de las levaduras, se clarifica, se estabiliza y se almacena.

En el caso del vino tinto, la fermentación del mosto se lleva a cabo con las pieles durante 3-10 días o más, utilizando las uvas prensadas como material de partida, y manteniendo una temperatura de 20-30 °C, que impida una excesiva extracción de tanino, ya que el etanol producido acelera la extracción de color. El color también puede extraerse mediante un tratamiento corto de las uvas prensadas a temperatura elevada, 85 °C, lo que usualmente da lugar a una menor extracción de tanino. En el caso del vino tinto, donde es deseable una fermentación maloláctica, puede retrasarse la separación del vino y las levaduras, dando lugar a la liberación de algunos aminoácidos mediante autólisis, que favorecen el crecimiento de las bacterias responsables de la fermentación secundaria.

Para la clarificación inicial del vino se utilizan filtros de tela y rejillas grandes, y después el vino bruto filtrado se refina mediante floculación y absorción de los sólidos suspendidos y se filtra nuevamente con un filtro de placas. A continuación se deja envejecer en tanques durante períodos comprendidos entre unas pocas semanas y hasta dos años antes de ser embotellado; durante este tiempo se producen algunas reacciones químicas, por ejemplo, de oxidación y esterificación.

### Fabricación del queso

La fabricación de productos lácteos madurados por microorganismos ocupa el segundo lugar, después de la producción de bebidas alcohólicas, entre las industrias que se basan en procesos microbiológicos. Aunque tanto los quesos duros como los blandos son quizás los productos lácteos más importantes elaborados con la acción de microorganismos, también existen otros productos significativos, como el yogur, la crema agria, la mantequilla, la leche ácida, el kefir, el koumiss y la leche al estilo búlgaro. En esta sección vamos a tratar de la fabricación del queso.

Las etapas generales en la elaboración del queso son:

- (1) Tratamiento previo de la leche
- (2) Coagulación
- (3) Separación de la cuajada sólida y del suero líquido
- (4) Moldeado de la cuajada
- (5) Maduración del queso

En general, para la elaboración de queso es mejor emplear leche con un recuento bacteriano relativamente bajo ya que si éste es alto puede crear problemas asociados con la producción excesiva de gas y con el desarrollo de aromas desagradables. Algunos enzimas de la leche pueden influir en la elaboración del queso y en su calidad; por ejemplo, la lactoperoxidasa inhibe algunas bacterias lácticas importantes en la fabricación del queso; las lipasas y las proteasas pueden modificar el aroma, sabor y propiedades reológicas del queso al hidrolizar la grasa y la caseína de la leche, respectivamente. La concentración microbiana de la leche y la actividad enzimática se reducen por pasteurización. Los quesos cottage y de crema se elaboran usualmente con leche pasteurizada. La homogeneización de la leche, que reduce el tamaño de los glóbulos grasos, se emplea en la elaboración del queso de crema, en algunos quesos blandos y en los quesos para untar. La cuajada resultante es más blanda y generalmente se acelera la lipólisis y el desarrollo del aroma. También se obtienen quesos a partir de leche cuyo contenido de grasa se ha alterado. La nata, utilizada en la fabricación de queso de crema, tiene un contenido graso superior al de la leche normal, mientras que para el queso cottage se emplea leche desnatada. El color natural del queso puede blanquearse utilizando peróxido de benzoilo, enmascarse por coloración artificial, y oscurecerse mediante colorantes naturales, por ejemplo el annato.

La coagulación de la leche se consigue generalmente mediante el proceso combinado de la reducción del pH y de la acción de enzimas. La acidificación se lleva a cabo mediante el empleo de cultivos «starter» lácticos que fermentan la lactosa a ácido láctico (véase Capítulo 6, epígrafe dedicado a los cultivos «starter» de las industrias lácteas). La acidez reduce la solubilidad de las caseínas a medida que el pH se aproxima a 4,6, su pH isoelectrico, y acelera la coagulación enzimática del queso. La reducción posterior del ácido favorece la sinéresis del suero (extracción) de la cuajada y controla el desarrollo de la flora microbiana indeseable. Además, tanto los ácidos como otros metabolitos producidos por los cultivos lácticos contribuyen al aroma y sabor del queso. Los enzimas que cuajan la leche se caracterizan por su capacidad para hidrolizar específicamente la fracción  $\kappa$ -caseína de la leche sin atacar a las otras fracciones mayoritarias de la caseína. La  $\kappa$ -caseína estabiliza las micelas de caseína de la leche frente a la presencia de iones calcio en una suspensión coloidal, por lo que la

liberación hidrolítica de un macropéptido de la  $\kappa$ -caseína bajo la acción del enzima, desestabiliza la micela haciéndola que coagule.

Los enzimas adecuados para la fabricación del queso deben tener una relación de cuajado frente a actividad proteolítica general elevada para impedir el exceso de degradación enzimática que podría reducir el rendimiento. Los enzimas más utilizados con este objetivo son el cuajo de ternera, extraído del cuarto estómago de las terneras, una mezcla al 50 % de cuajo de ternera y pepsina porcina, y los cuajos microbianos, producidos sobre todo por *Mucor miehei*. La coagulación de la leche se puede acelerar incrementando la temperatura hasta 45 °C, o retardar con temperaturas menores. La hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína puede separarse de la etapa de coagulación enfriando el cuajo y calentando posteriormente la leche hasta conseguir que coagule; esta técnica se utiliza en los procesos continuos de elaboración de queso.

Después de la coagulación, se separa la cuajada sólida del suero líquido, en un proceso denominado sinéresis del suero, que puede acelerarse mediante diversos medios, entre ellos cortando la cuajada, aumentando la temperatura, reduciendo el pH con bacterias lácticas y también utilizando diversas técnicas de separación física.

Durante el proceso de maduración del queso tienen lugar una gran variedad de reacciones, que conducen al desarrollo del aroma y sabor. En algunos casos, son microorganismos específicos, por ejemplo, *Propionibacterium* (queso suizo), *Penicillium roqueforti* (azul), o *Penicillium camemberti* (camembert), los que proporcionan el aroma y sabor, en tanto que en otros son los enzimas, por ejemplo, las esterasas pregástricas, (Romano y Provolone) las que más contribuyen a estas propiedades. Otros, como los Cheddar y Gouda, dependen de la combinación de diversas reacciones complejas de maduración.

En la Figura 7.6 se muestran los procesos generales seguidos para la elaboración del queso, aunque, naturalmente varían de un tipo de queso a otro.

## Fabricación del pan

La mayor parte del pan se obtiene mezclando harina, especialmente de trigo, con agua, algún tipo de levaduras, sal, sacarosa y grasas del tipo «shortening». Una vez transcurridos varios minutos desde la mezcla de los ingredientes, el pan se incuba a temperaturas comprendidas entre 25 y 35 °C con objeto de impulsar la fermentación de los azúcares de la masa por las *S. cerevisiae*, formando alcohol y dióxido de carbono, cuyas burbujas quedan atrapadas en la masa. Después de la fermentación, el proceso de panificación de la masa eva-

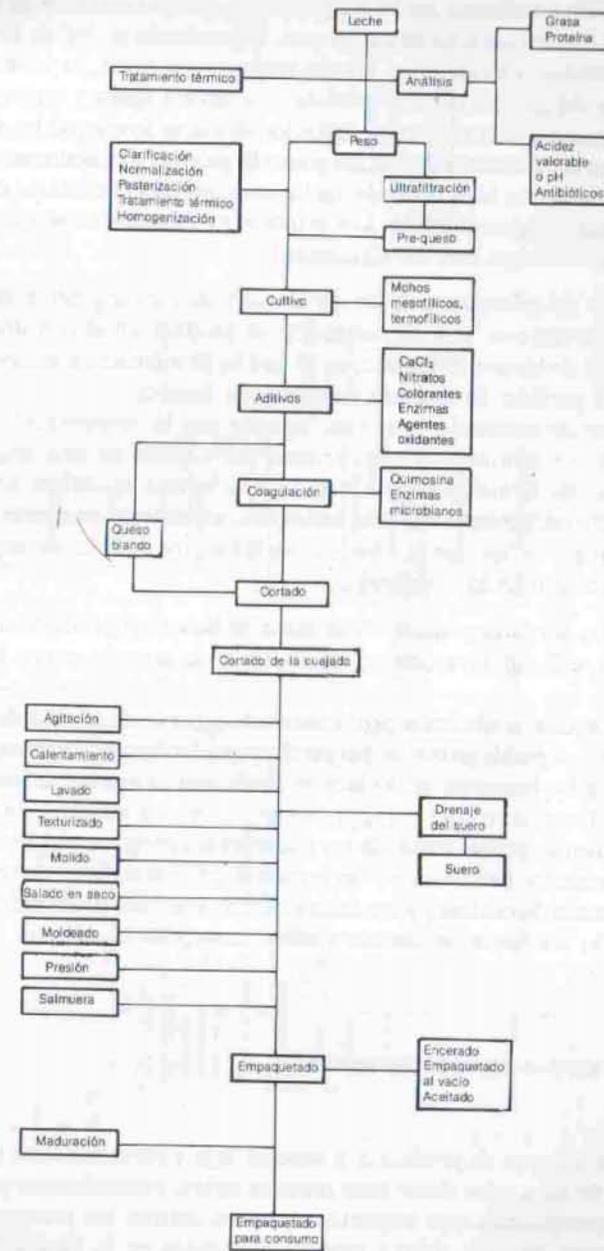


Fig. 7.6. Diagrama de flujo de un proceso de elaboración de quesos (reproducido con permiso de Irving y Hill, 1985).

pora el etanol pero no elimina las burbujas de gas, que permanecen en ella contribuyendo a la textura característica del pan. El resultado global de la fermentación por levaduras consiste en el hinchamiento de la masa, la modificación de la estructura del gluten, el desarrollo de una textura ligera y esponjosa y la aparición del aroma y sabor del pan. Entre los azúcares fermentables de la masa se encuentran la sacarosa añadida así como la glucosa y la maltosa, producidas a partir del almidón bajo la acción de los enzimas  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas del cereal o de la  $\alpha$ -amilasa fúngica añadida. Los principales métodos de elaboración de la masa del pan de trigo son los siguientes:

- (1) Proceso de amasado sencillo, en el que todos los ingredientes se mezclan previamente y la fermentación se produce en el conjunto.
- (2) Proceso de bizcocho y masa, en el que la fermentación se lleva a cabo en una porción de la masa denominada bizcocho.
- (3) Proceso de mezclado continuo, seguido por la fermentación de toda la masa en conjunto o en porciones del tamaño de una hogaza.
- (4) Proceso de fermentación en líquido, que es una modificación del método (2), particularmente adecuado para procesos de mezclado-amasado continuos, en los que el bizcocho se substituye por un sistema de fermentación líquido bombeable.

Los métodos sin fermentación de la masa se basan en procesos de amasado/aireación y utilizan bicarbonato de sodio o de amonio como fuente de burbujas.

Las masas agrias se obtienen principalmente a partir de harina de centeno, aunque también se puede partir de harina de trigo. La harina de centeno carece de elasticidad y las bacterias ácido láctico acidifican la masa, haciéndola más apta para panificación, en tanto que la fermentación con levaduras la hace hincharse. Los enzimas, provenientes de los microorganismos contenidos en la masa agria, degradan los pentosanos y las proteínas del cereal disminuyendo la viscosidad de la masa de centeno, y los ácidos láctico y acético producidos durante la fermentación confieren un aroma y sabor característico al pan.

### Alimentos basados en soja fermentada

Las fermentaciones de productos a base de soja y otras materias primas relacionadas se llevan a cabo desde hace muchos siglos, especialmente en Oriente. Entre las fermentaciones más importantes se encuentran los procesos de producción de salsas de soja, miso y tempeh, ilustrados en la Figura 7.7.

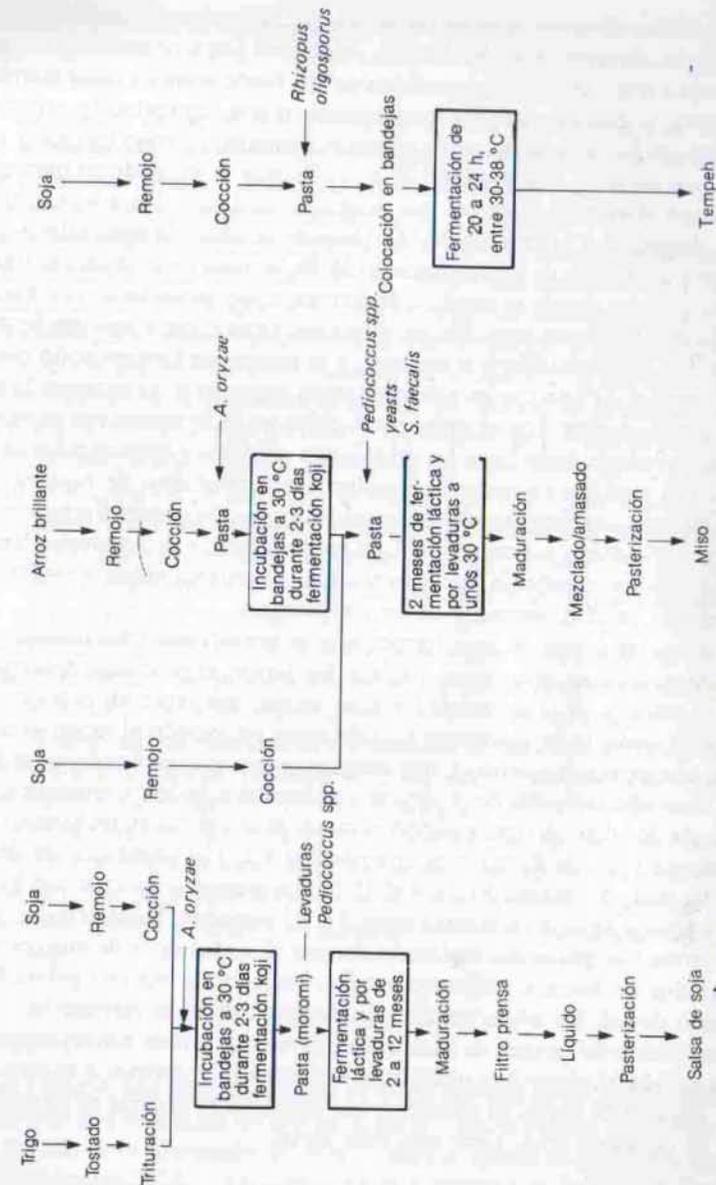


Fig. 7.7. Proceso global de producción de salsa de soja, miso y tempeh.

Aunque existen diversos tipos de salsas de soja, la producida predominantemente en Japón, denominada «koikuchi», se obtiene por fermentación de una mezcla de soja y trigo, que da lugar a una salsa con fuerte aroma y color marrón-rojizo oscuro. El proceso consiste inicialmente en una fermentación primaria de una mezcla al 50 % de soja cocida al vapor, empapada y trigo tostado y triturado, con un nivel de humedad del 27 al 37 %, que se extiende en bandejas y se incuba con *Aspergillus oryzae*, que tiene actividad amilolítica y proteolítica elevada, durante 2 ó 3 días a 25-30 °C. Después de añadirle agua salada, para hacer que el contenido de sodio alcance el 18 %, la masa o «moromi» se transfiere a tinajas grandes donde se produce la fermentación secundaria, con bacterias halofílicas y levaduras osmofílicas; el proceso tiene lugar a una temperatura de 35-40 °C, con agitación intermitente, y el tiempo de fermentación oscila entre 2 y 12 meses. Al finalizar esta fermentación secundaria, se recupera la salsa líquida y se pasteriza. Los enzimas producidos en la fermentación primaria o fermentación «koji» hidrolizan las proteínas a péptidos y aminoácidos libres y convierten el almidón en azúcares simples. Estos productos de ruptura son a su vez metabolizados por otros microorganismos, produciendo diversos compuestos aromatizantes y saborizantes. Utilizando inóculos de levaduras, bacterias y hongos puros el proceso de fermentación se controla mejor y se obtiene un producto de calidad, aroma y sabor consistentes.

En Oriente, las pastas de soja fermentada se preparaban tradicionalmente en casa para su utilización en sopas y salsas. En Japón, el producto, denominado miso, se elabora en la actualidad a gran escala, mediante un proceso que implica inicialmente la fermentación koji del arroz empapado al vapor (o cebada, o soja, con menor frecuencia), que después se extiende en bandejas, se inocula con cepas seleccionadas de *A. oryzae* y se incuba a 28-35 °C durante aproximadamente dos días. A continuación el material se mezcla en recipientes con soja empapada y cocida al vapor en una relación 1:2, y se añade cloruro de sodio para dar una concentración del 4 al 13 %. La mezcla se inocula con bacterias y levaduras y se deja fermentar entre 1 y 52 semanas. Finalmente, el producto se amasa y se pasteriza, pudiendo obtener distintos tipos de miso con diferentes grados de dulzura, salinidad y color, variando la materia prima koji, el contenido de sal, los edulcorantes y la duración de la fermentación.

La producción de tempeh se basa en una fermentación en bandejas de soja remojada cocida al vapor inoculada con *Rhizopus oligosporus*, e incubada a 30-38 °C durante 24 horas. El producto, que usualmente se corta en rebanadas, se sala y se consume frito, tiene una vida corta.

## Productos cárnicos fermentados

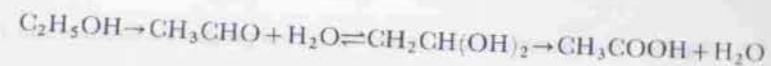
La mayoría de los productos cárnicos fermentados consisten en fiambres (secas o semisecas), con una relación humedad-proteína que oscila entre 1,5 y 3 a 1. En general, la etapa de fermentación microbiana tiene lugar a una temperatura óptima, previa a la de calentamiento y/o secado.

La fermentación microbiana, que da lugar a la formación de ácido, ayuda al procesado de muy distintas formas, puesto que contribuye a la estabilidad y alarga la vida del producto, facilita la posterior eliminación de humedad y genera aromas y sabores característicos. Generalmente se recomienda que el pH del producto sea inferior a 5,3, basados en la creencia de que dicho valor sirve para controlar los *Staphylococcus aureus*. El proceso de fermentación para reducir el pH por debajo de 5,3 deberá ajustarse a las normas de seguridad temperatura/tiempo especificadas, comprendidas entre 23,9 y 43 °C durante un período de incubación de entre 80 y 18 horas. Con frecuencia se utilizan inóculos comerciales, como los *Pediococcus*, que tienen una buena capacidad para producir ácido láctico. Los *Staphylococcus carnosus*, especies inocuas coagulasa-negativas, se emplean de forma rutinaria en la producción de embutidos secos. Los nitritos influyen positivamente en la conservación de la carne, puesto que controlan el desarrollo de *Clostridium botulinum*. Las especies de *Micrococcus* capaces de reducir los nitratos a nitritos, de forma controlada, contribuyen a la curación de la carne así como al control de los *C. botulinum*. También pueden utilizarse cultivos «starter» en el procesado del bacon, con objeto de eliminar cualquier nitrito residual presente, disminuyendo o anulando la formación de nitrosaminas, carcinógenos, durante la fritura.

Se puede predecir que a partir del mayor empleo de los inóculos comerciales, los procesos de fermentación de los productos cárnicos se caracterizarán por su elevado nivel de control del proceso, lo que dará lugar a productos de calidad y consistencia reproducibles y manteniendo siempre las mayores condiciones de seguridad.

## Vinagre

El vinagre, una solución acuosa de ácido acético, se obtiene mediante la fermentación por oxidación de una solución diluida de etanol. El proceso metabólico se basa en la conversión del etanol, bajo la acción de la alcohol deshidrogenasa, en acetaldehído y del acetaldehído hidratado en ácido acético por la acción de la acetaldehído deshidrogenasa:



La materia prima de la fermentación del vinagre de alcohol (white spirit) consiste usualmente en etanol purificado diluido. Los vinagres de vino, sidra, malta y arroz se obtienen por fermentación alcohólica de zumos de uva, manzana, cebada malteada y arroz, respectivamente. La fermentación del vinagre requiere también una fuente de nitrógeno y una combinación apropiada de minerales y con frecuencia es necesaria la suplementación con nutrientes. Las modernas fermentaciones de vinagre consisten en procesos sumergidos muy aireados. El acetator Frings (Fig. 7.8), muy utilizado en la producción comercial de vinagre, es un fermentador provisto de deflectores, cuyo fondo contiene una turbina de cuerpo hueco que gira a 1.450-1.750 rpm, cuya rotación hace que el aire sea succionado a través del rotor hueco y se distribuya radialmente a lo largo de toda la sección transversal del fermentador.

Los procesos comerciales típicos, que producen ácido acético del 12 al 15 %, se llevan a cabo de forma semicontinua. Las concentraciones de alcohol y de ácido acético al comienzo del ciclo son del 7-10 % y del 5 % respectivamente;

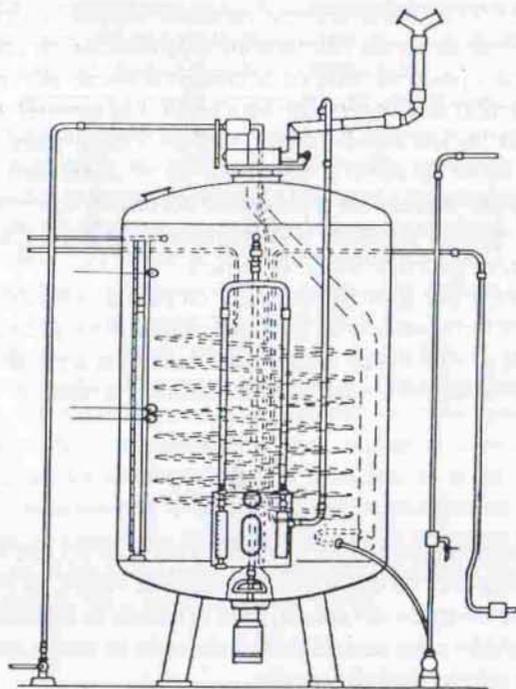


Fig. 7.8. Sección de un acetator Frings (reproducido con permiso de Greenshields, 1978).

la fermentación se efectúa entre 27 y 32 °C hasta que la concentración de alcohol desciende al 0,1-0,3 %, momento en el cual se descarga una parte del vinagre (aproximadamente la tercera parte) y el recipiente se vuelve a llenar con una mezcla que contiene del 0 al 2 % de ácido acético y del 12 al 15 % de etanol y el ciclo se repite. Un alcalógrafo mide la concentración de etanol y hace que las operaciones de descarga y llenado se puedan llevar a cabo automáticamente, sin interrupción del proceso de aireación/mezclado de forma que impida el agotamiento total del etanol en el caldo de fermentación. El mezclado rápido continuo es esencial para minimizar los gradientes de concentración. Los tiempos del ciclo varían de 24 a 48 horas.

Las bacterias acidoacéticas, que oxidan el etanol a ácido acético y pueden existir a valores bajos de pH, pertenecen a los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, estrechamente relacionados. Los cultivos puros de estos organismos se caracterizan por su alto grado de variabilidad y en las fermentaciones industriales se pueden desarrollar posteriormente cultivos mezclados a partir de cultivos puros. Los cultivos industriales se seleccionan en función de que toleren una acidez elevada y de que las velocidades de producción de acetato sean altas. Estas bacterias son extremadamente sensibles y se mueren en ausencia de oxígeno y etanol y también resultan dañadas a gradientes de concentración de etanol y acetato. La sensibilidad a la falta de oxígeno aumenta a medida que lo hace la concentración total de ácido acético más etanol. No obstante, con una aireación suficiente, puede conseguirse una utilización del 80 % de oxígeno sin producir efectos adversos en la fermentación. La sobreoxidación, esto es la conversión de ácido acético en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  puede impedirse manteniendo la concentración de ácido acético por encima del 6 % e impidiendo el agotamiento total del etanol.

---

## Capítulo 8

### *Compuestos químicos industriales*

#### **Compuestos químicos orgánicos**

En la actualidad casi todos los compuestos orgánicos se obtienen a partir del petróleo y el gas natural. Los problemas asociados con esta dependencia incluyen la fluctuación de los costos del petróleo, la incertidumbre del suministro y finalmente la preocupación por el agotamiento de estos combustibles fósiles no renovables. A medida que las reservas de petróleo se van agotando y su precio se eleva, las compañías petrolíferas van derivando hacia el carbón como fuente principal de recursos químicos y de producción de energía. La mayoría de los esquemas de procesos de obtención de compuestos químicos a partir del petróleo pueden ajustarse fácilmente al empleo de carbón como materia prima y en consecuencia en la industria química no se necesitarán inversiones importantes. Sin embargo, puesto que el carbón, al igual que el petróleo, es una fuente no renovable, es de esperar una transición gradual hacia el empleo de biomasa como materia prima que solucione a largo plazo los problemas asociados con el agotamiento del petróleo y del carbón.

Actualmente, el etanol se produce mediante fermentación, para utilizarlo como combustible y como materia prima química, en Estados Unidos y Brasil, a partir de materias primas como el almidón de maíz y de la caña de azúcar, respectivamente. Aunque hay campo para la expansión de procesos que utilizan recursos basados en el azúcar y el almidón, su empleo a gran escala para la

producción de compuestos químicos y de energía crearía tensiones en el suministro mundial de alimentos. El uso extensivo de biomasa para la producción de energía y de compuestos químicos dependería más probablemente de la lignocelulosa como materia prima. La biomasa como fuente de recursos tiene una desventaja inherente puesto que el rendimiento energético por unidad de peso es de aproximadamente 1/3 del del petróleo, por lo que en consecuencia, los costos en el transporte de la biomasa hasta las plantas de procesamiento químico podrían ser significativos.

Las materias primas transformadas por conversión microbiana en compuestos químicos útiles deben ser sometidas a diversos pretratamientos antes de someterlas a la fermentación. Por ejemplo, el jugo de la caña de azúcar se extrae mediante técnicas de molienda y lavado, la preparación de los cereales para su fermentación implica operaciones como la molienda, el amasado, el calentamiento y la conversión del almidón en glucosa mediante licuefacción y sacarificación enzimática. La biomasa de lignocelulosa requiere un pretratamiento más drástico, así como procedimientos de hidrólisis. Los métodos de pretratamiento comunes para eliminar la lignina y exponer la celulosa cristalina, que incluyen el empleo de ácidos, bases, vapor y procedimientos mecánicos, aumentan significativamente los costos de procesamiento. Los procesos de biodeslignificación mediante microorganismos como el *Chrysosporium pruinosum*, pueden eliminar en principio la lignina, aunque las velocidades comunes de actuación microbiana son demasiado lentas para ser económicamente rentables. Además, la estructura cristalina de la celulosa la hace más difícilmente atacable por los ácidos y por la hidrólisis enzimática que los polisacáridos como el almidón, por lo que el desarrollo de procesos biotecnológicos mejorados para la producción y aplicación de celulasas está considerado como un requisito previo para la utilización eficaz de la lignocelulosa como recurso.

En la Figura 8.1 se muestran las rutas metabólicas para la producción de diversos compuestos químicos mediante fermentación. Las fermentaciones corrientes viables comercialmente incluyen procesos de producción de etanol, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido itacónico y ácido láctico. En el pasado las fermentaciones industriales se utilizaron para la producción de acetona, butanol, glicerol y ácido fumárico, aunque en su manufactura se utilizan en la actualidad comúnmente más rutas químicas, más baratas, basadas en el petróleo. Se están realizando investigaciones acerca del desarrollo de la fermentación acetona-butanol con vistas a hacerla económicamente rentable, en tanto que otros procesos de fermentación para la producción de ácido acético y 2,3-butanodiol como fuentes de compuestos químicos tienen un potencial comercial real.

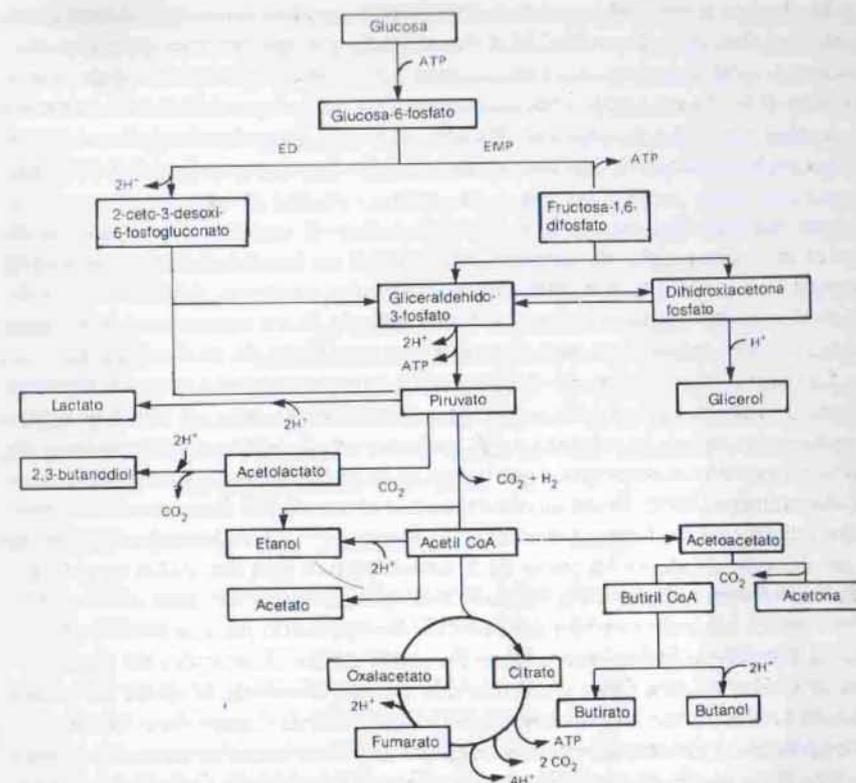


Fig. 8.1. Ruta metabólica para la biosíntesis de diversos productos químicos (reproducido con permiso de Ng *et al.*, 1983).

#### PRODUCCION DE ETANOL

El uso de procesos de fermentación para la producción de alcohol industrial tiene varias ventajas:

- La tecnología necesaria existe ya actualmente
- Los alcoholes se pueden obtener a partir de fuentes renovables
- Pueden utilizarse como substratos desechos y ciertos productos agrícolas no comestibles
- Los procesos de recuperación son relativamente simples
- Los combustibles alcohólicos se queman más limpiamente que las gasolinas

El alcohol industrial se produce con diversos grados, aunque la mayor parte es alcohol denominado «190» (92,4 % en peso), con aplicaciones químicas, cosméticas y farmacéuticas. En aplicaciones químicas especiales se utiliza etanol anhidro (99,8 % en peso), y como combustible para el gasohol (véase después) se emplea alcohol casi anhidro (99,2 % en peso). La mayoría de las veces se utiliza exclusivamente la destilación como medio de recuperación del etanol, mediante columnas simples en una o dos etapas con una sección de extracción y otra de rectificación, con lo que se produce alcohol con una concentración de etanol de hasta el 95,7 % en peso, condiciones en las que el agua y el etanol forman una mezcla azeotrópica con volatilidades idénticas. La producción de alcohol anhidro requiere generalmente la adición de un tercer compuesto químico, por ejemplo el benceno, que altere el equilibrio de la destilación.

Las principales fuentes de carbohidratos para las fermentaciones destinadas a obtener etanol son los azúcares de la remolacha y la caña, el almidón de los cereales y las raíces, la celulosa de la madera y los desechos y subproductos de otros procesos como las aguas sulfitadas de la industria papelera y el lactosuero. Actualmente, el 95 % del alcohol mundial obtenido por fermentación se produce a partir de las hexosas mediante *S. cerevisiae*. Los aspectos biológicos de la producción de alcohol a partir de *S. cerevisiae* han sido discutidos en el Capítulo 7. Debido al interés en la utilización de hemicelulosa, también están siendo investigados algunos posibles procesos de fermentación para la producción de etanol a partir de pentosas. Aunque las cepas de *Saccharomyces* no metabolizan la xilosa, existen otras levaduras que pueden convertir la xilosa en etanol y lactato. También se está investigando la capacidad de *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* y otras bacterias termofílicas para ser usadas como fermentadoras de las pentosas. Aunque los organismos estudiados hasta ahora producen cantidades excesivas de productos laterales indeseables o únicamente producen concentraciones bajas de alcohol, su capacidad para fermentar a temperaturas más altas puede permitir la recuperación continua del alcohol, reduciendo así los efectos inhibitorios del producto final. Las bacterias *Zymomonas mobilis* también tienen interés puesto que convierten la glucosa en etanol con un rendimiento del 5 al 10 % mayor que la mayoría de las levaduras; sus desventajas son su baja tolerancia al alcohol y su pequeño tamaño, que hace difícil la separación de las células. También tiene interés el empleo de especies de *Clostridium* termorresistentes, como *C. thermocellum* y *C. thermohydrosulfuricum*, que convierten la celulosa en etanol. También se están investigando métodos enzimáticos, físicos y químicos para la conversión de materiales celulósicos y hemicelulósicos en azúcares fermentables.

La tecnología para el empleo de alcohol como combustible data de los años veinte cuando se diseñó el modelo T de Henry Ford, de tal forma que podía funcionar con alcohol, gasolina o cualquier mezcla de los dos. Sin embargo,

el alcohol no fue utilizado como combustible de motores hasta los años setenta cuando los precios del crudo se elevaron dramáticamente. El súbito incremento de los precios del petróleo, junto con la limitada disponibilidad de los recursos fósiles, estimuló la búsqueda de nuevas fuentes de energía, iniciándose proyectos para la evaluación y desarrollo de una gran variedad de tecnologías que aprovecharan otros tipos de energía, como la solar, la eólica, la geotérmica o la de las mareas. El empleo de energía solar para transformar el CO<sub>2</sub> en biomasa mediante fotosíntesis y el uso de microorganismos para convertir los azúcares de la biomasa en alcohol etílico encuentran así aplicación inmediata.

En USA se introdujo una gasolina con el 10 % de alcohol, denominada gasohol, y su producción fue estimulada por el gobierno federal reduciendo los impuestos sobre esta mezcla. El objetivo del gobierno de USA era el conseguir una capacidad de producción de fermentación de 1,8 billones de galones anuales a mitad de los ochenta. Brasil, el líder mundial en la producción de alcohol por fermentación, produjo 1,4 billones de galones en 1981-2 y se fijó una meta de 3 billones de galones anuales para 1987.

#### El Programa gasohol

En 1986, la capacidad de producción en USA alcanzó los 760 millones de galones anuales, con la esperanza de que el objetivo original de 1,8 billones de galones anuales se alcanzase en 1990. Debido al reducido efecto como contaminante medioambiental del etanol, en este país se produjo una fuerte presión a favor de que todos los automóviles empleasen gasohol, lo que exigiría una capacidad de fermentación de etanol de 8 billones de galones/año. También en Canadá ha experimentado cierta expansión la producción de alcohol como combustible.

La principal materia prima para la producción de alcohol combustible en Estados Unidos es el maíz, que se somete a procesos de fermentación continuos o discontinuos, con procedimientos de cocción continuos en los dos casos. En la Tabla 8.1 se describe un proceso de fermentación discontinuo típico. La población de levaduras es usualmente de  $2 \times 10^8$  por ml y el tiempo de fermentación es de unas 48 horas. Algunos de los principales productores de alcohol de Estados Unidos emplean procesos de fermentación continuos, en los que el maíz húmedo se muele y procesa con objeto de obtener un mosto libre de sólidos. Mediante el empleo de levaduras floculantes y una etapa de reciclado de éstas, se consigue una población de  $6-8 \times 10^8$  levaduras por ml y la fermentación se completa en 10-18 horas.

#### Programa nacional brasileño para el alcohol

El Programa Nacional Brasileño para el Alcohol fue iniciado en 1975 para reducir la importación de petróleo y para substituir total o parcialmente la ga-

**Tabla 8.1.** Procesos de fermentación discontinuos típicos para la producción de etanol a partir de maíz

- (a) Molienda del maíz hasta un tamaño comprendido entre 1/8 y 3/16 de pulgada
- (b) Adición de agua en una relación agua: maíz de 3-4:1 en peso
- (c) Prelieuefacción de la masa mediante  $\alpha$ -amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* a 60-66 °C durante 20-30 min
- (d) Gelificación completa del almidón de maíz elevando la temperatura por encima de 150 °C durante 5-10 min
- (e) Post-licuefacción del almidón mediante una segunda dosis de  $\alpha$ -amilasa termoestable, y después reducción de la temperatura de la masa a 85 °C
- (f) Enfriado de la masa hasta 32 °C y trasferencia al fermentador
- (g) Adición de amiloglicosidasa y levaduras a la masa para iniciar simultáneamente la sacarificación del almidón y la producción de alcohol en el fermentador
- (h) Recuperación del alcohol después de un tiempo de fermentación de aproximadamente unas 48 h

solina por etanol anhidro. El programa incentivaba a la empresa privada para que incrementase la producción de cultivos agrícolas energéticos y los transformase en substitutos del petróleo y materias primas para el sector químico. El etanol se produce exclusivamente a partir de la fermentación de la caña de azúcar. El Centro Técnico Aeronáutico Gubernamental diseñó un motor de ciclo Otto para que funcionase con etanol y transfirió la tecnología a la industria del automóvil, a la vez que se establecieron incentivos económicos que favorecían a los automovilistas que utilizasen exclusivamente alcohol como combustible. Estas medidas políticas dieron como resultado un drástico incremento en el uso tanto de etanol puro como de gasohol como combustibles para motores. La reducida utilización de petróleo crudo para su refinado dio lugar a la escasez en el suministro de gasoil, por lo que se necesitaría un programa de substitución de este combustible, posiblemente también por etanol.

Las partes del programa implican la mejora de la eficacia de la producción de caña de azúcar, la etapa de fermentación del alcohol y el reciclado de los desechos. Las estrategias adoptadas fueron las siguientes:

(i) *Eficacia en la producción de caña de azúcar.* Los problemas planteados por la baja productividad de la caña de azúcar hicieron que la agricultura se encaminase hacia el cultivo de mejores variedades, perfeccionando también las labores agrícolas y controlando los daños producidos por las enfermedades y los insectos. Se supone que con una buena práctica agrícola pueden obtenerse rendimientos de hasta 76 Tm de caña por Ha, recogiendo 3 cosechas cada 4 años, con lo que se obtendría una productividad media de 55 Tm/Ha/año. El empleo de nuevas variedades de plantas hizo que se esperase un incremento de la pro-

ductividad anual media de hasta 80 Tm/Ha, y si se recogieran 4 cosechas cada 5 años el rendimiento ascendería a 101 Tm/Ha. También se espera que la cantidad de azúcares fermentables contenidos en la cosecha aumente a lo largo de 15 años desde el 13,5 % hasta el 17 %. Además, se cree posible mediante la mejora del diseño de los molinos, incrementar la eficacia de la extracción del 91 al 97 %.

(ii) *Producción de alcohol.* La estrategia para mejorar las operaciones de destilación y fermentación, que diera como resultado una instalación más pequeña y una inversión menor, consistió en ampliar el período de operación de estos procesos desde los 150-180 días de la estación de cosechado y molienda hasta 200-300 días, mediante el empleo de nuevos métodos mejorados de almacenamiento de la caña de azúcar y de las melazas. Elevando el control de la temperatura y del pH y evitando las infecciones, podría esperarse que la eficacia de la fermentación se incrementase del 85 al 91 %.

(iii) *Tratamiento de los desechos.* Los desechos industriales más importantes de la producción de alcohol a partir de caña de azúcar son los residuos de alambique y el bagazo. El primero se utiliza en Brasil principalmente como un fertilizante de suelos, como suplemento alimentario para el ganado (una vez reducido el contenido de potasio para evitar trastornos intestinales) y como materia prima para la producción de metano. El bagazo se emplea como combustible generador de vapor.

En Brasil, aproximadamente la mitad de las plantas de procesado de alcohol emplean como materia prima directamente caña de azúcar. El jugo de la caña se recupera mediante un proceso de molienda que consiste en el cortado, molido y laminado para romper las células y exprimir el jugo, que contiene del 12 al 16 % de sacarosa. La solución azucarada, suplementada con los nutrientes necesarios, se inocula con levaduras, alcanzándose una productividad de etanol máxima en 14-20 horas en un proceso discontinuo. Usualmente operan varios fermentadores de forma escalonada para suministrar una alimentación continua a la planta de destilación. La mayoría de las destilerías brasileñas emplean el proceso «Melle Boinot», basado en la recuperación centrífuga de las levaduras vivas (usualmente del 10 al 15 % en volumen del líquido total) y su reinoculación en otros fermentadores.

#### PRODUCCION DE ACIDO CITRICO

El ácido cítrico, ampliamente distribuido en la naturaleza, se utiliza desde hace tiempo en la manufactura de bebidas refrescantes como acidulante, como auxiliar en la fabricación de mermeladas y como aditivo general en las industrias de repostería. Inicialmente se extrajo del zumo de limón, posteriormente

se sintetizó a partir de glicerol y de otros compuestos químicos y finalmente, desde 1923, se obtiene por fermentación industrial. En 1933, la producción mundial anual superó las 10.000 Tm, de las cuales, más del 80 % se obtuvieron por fermentación. Con la sustitución de los polifosfatos por el citrato de sodio en los detergentes en 1970, el mercado anual creció rápidamente y actualmente se estima que se producen exclusivamente por fermentación unas 300.000 Tm. Inicialmente se utilizaron métodos de cultivo en superficie con *Aspergillus niger*; después de la segunda guerra mundial se introdujeron procesos de cultivo sumergidos también con *A. niger* y aproximadamente en 1977 se comercializó un proceso de cultivo sumergido con levaduras del género *Candida*.

En la Tabla 8.2 se muestran las principales características de los procesos industriales empleados en la producción de ácido cítrico. Actualmente aún se utiliza ampliamente el cultivo en superficie con *A. niger*, puesto que, aunque es un proceso que requiere más trabajo que el de cultivo sumergido, las necesidades energéticas son menores. En los procesos sumergidos se prefieren fermentadores agitados por aire, que permiten utilizar recipientes de mayor tamaño, ya que este producto es de un volumen de producción alto entre los obtenidos por fermentación. La materia prima más utilizada para la producción de citrato son las molasas, cuyo mayor problema consiste en la gran variabilidad del material. En las fermentaciones sumergidas con *A. niger* las concentraciones elevadas de azúcar estimulan la producción de citrato obteniéndose rendimientos bajos cuando la concentración de azúcar es inferior a 140 kg m<sup>-3</sup>. En general, se suministra nitrógeno a una concentración de 0,1-0,4 g l<sup>-1</sup>. La adición de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> durante la fermentación aumenta la producción de citrato.

La producción de ácido cítrico con *A. niger* es extremadamente sensible a la concentración de iones Mn<sup>2+</sup>, de forma que su producción se ve ya drásticamente reducida a un nivel de manganeso del orden de 3 mg l<sup>-1</sup>. Por tanto, es necesario pretratar las molasas con agentes que acomplejen o precipiten este metal, por ejemplo con hexacianoferrato (HCF) o con cobre, que contrarresta el efecto del manganeso al inhibir su absorción por las células. Las condiciones deficientes en manganeso también favorecen la producción de pequeños gránulos micelianos con superficies lisas y compactas, característicos de las buenas fermentaciones fúngicas de citrato. Cuando la concentración de manganeso aumenta, la morfología fúngica se vuelve filamentosa, incrementando drásticamente la viscosidad del cultivo y disminuyendo rápidamente de forma concomitante la tensión del oxígeno disuelto. Como la producción de ácido cítrico necesita oxígeno, la velocidad de producción de ácido aumenta a medida que aumenta la cantidad de oxígeno disuelto. Además, una corta interrupción del suministro de oxígeno puede conducir al cese irreversible de la producción de citrato. Para la biosíntesis de citrato es esencial mantener el pH por debajo de 2,0, puesto que a pH superiores, el *A. niger* acumula ácido glucónico en vez de citrato.

Tabla 8.2. Fermentaciones industriales de ácido cítrico

Parámetro	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
Tipo de fermentación	Cultivo en superficie, profundidad 0,05-0,2 m	Cultivo sumergido, reactor tipo tanque con agitación de 40-200 m <sup>3</sup> , reactor agitado por aire con 200-900 m <sup>3</sup>	Cultivo sumergido, reactor tipo tanque con agitación de 40-200 m <sup>3</sup> , reactor agitado por aire de 200-900 m <sup>3</sup>
Producción, fermentador, inóculo	Conidia/esporas ca. 150 mg o 2 × 10 <sup>9</sup> esporas/m <sup>3</sup>	Inóculo vegetativo preparado en el fermentador de siembra o inoculación de esporas directamente	Inóculo preparado en el fermentador de siembra
Fermentación pH	Inicialmente 5,0-7,0 para la germinación/crecimiento de <i>A. niger</i> . Caída por debajo de 2,0 para la fase de producción de citrato		pH 4,5-6,5 para el crecimiento. Puede permitirse que descienda hasta 3,5 para la producción de citrato
Temperatura	30 °C	30 °C	25-37°C
Aireación (función)*	Transferencia de oxígeno, enfriamiento	0,5-1 vvm (transferencia de oxígeno, mezclado en el reactor agitado por aire). Tensión de O <sub>2</sub> elevada > 140 m bar. La fermentación es muy sensible al oxígeno	0,5-1 vvm (transferencia de oxígeno, mezclado en reactor agitado por aire)
Medio	Melazas o jarabes de glucosa además de nutrientes y sales 150 kg m <sup>-3</sup>	140-220 kg m <sup>-3</sup>	hasta 280 kg m <sup>-3</sup>
Pretratamientos del medio	La concentración baja en manganeso exige que el medio se pre-trate con hexacianoferrato o iones cobre		No se necesita pretratamiento con iones metálicos
Otros datos	El NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> estimula la producción de ácido cítrico	Morfología miceliana en forma de gránulos	La limit. de nitrógeno desencadena la acumulac. de ácido La tiamina es necesaria para la acumulación de ácido

\*vvm = volumen de aire por unidad de volumen de medio por minuto

La producción de citrato con *Candida guilliermondii* difiere en varios aspectos del proceso sumergido con *A. niger*. Por ejemplo, la deficiencia de manganeso no es un prerrequisito, siendo innecesaria una etapa de pretratamiento para eliminar este metal del medio; el citrato se produce a un pH superior (3,5-5,0). Además, la limitación de nitrógeno provoca la acumulación de ácido. La principal ventaja del proceso que emplea *Candida* respecto al que emplea *A. niger* consiste en que la productividad global de la fermentación es superior, ya que se pueden utilizar concentraciones de azúcar más altas debido a la naturaleza más osmotolerante de los organismos y además la fermentación es más rápida.

#### Bioquímica de la producción de citrato con *A. niger*

El proceso metabólico que conduce a la acumulación de citrato implica (a) la descomposición de las hexosas a piruvato y acetyl CoA, (b) la formación anaplerótica de oxalacetato a partir de piruvato y  $\text{CO}_2$  y (c) la acumulación de citrato dentro del ciclo del ácido tricarbóxico. En este esquema no debería eliminarse  $\text{CO}_2$  durante la producción de citrato, puesto que el  $\text{CO}_2$  liberado en la descarboxilación oxidativa del piruvato a acetyl-CoA debería utilizarse en la conversión de piruvato en oxalacetato. El enzima clave que cataliza esta reacción, la piruvato carboxilasa, lo producen intrínsecamente las especies *Aspergillus*. Las concentraciones elevadas de azúcar aumentan además la actividad de este enzima así como la de los enzimas glicolíticos y pueden inhibir algunos de los enzimas del ciclo del ácido tricarbóxico. Para que se acumule citrato es necesario que al menos uno de los enzimas de este ciclo resulte inhibido. Las evidencias recientes sugieren que la principal etapa reguladora es la de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, etapa limitante de la velocidad en el ciclo y la única reacción irreversible. Este enzima se inhibe al incrementar las concentraciones fisiológicas de oxalacetato y NADH durante la producción de citrato. La fosfofructoquinasa es inhibida por el citrato, aunque esta inhibición puede contrarrestarse con concentraciones intracelulares elevadas de  $\text{NH}_4^+$ .

La deficiencia de manganeso reduce la actividad de algunos de los enzimas de la ruta de la pentosa fosfato (que podrían desviar las hexosas de la glicolisis y la producción de citrato) y también inhibe el ciclo del ácido tricarbóxico, y además perjudica el metabolismo anabólico en general, incluyendo el recambio de las proteínas y los ácidos nucleicos. Durante estas deficiencias, se forma una proteasa ácida y la reserva intracelular de ácidos nucleicos y proteínas disminuye con la producción concomitante de péptidos, aminoácidos y niveles elevados de  $\text{NH}_4^+$ . Por tanto, en conclusión, el principal efecto de la deficiencia de manganeso es su impacto en el recambio proteico, haciendo que la concentración de iones amonio se incremente en tanto que contrarreste la inhibición de la fosfofructoquinasa por el citrato.

Para la reoxidación metabólica del NADH durante la producción de ácido cítrico se necesita oxígeno. Durante la acumulación de citrato, un sistema respiratorio alternativo sensible al ácido salicilhidroxámico (SHAM), mantiene el sistema respiratorio con la reoxidación del NADH, aunque sin producción concomitante de ATP (Fig. 8.2). El hecho de que la acumulación de ácido cítrico esté fuertemente inhibida por el SHAM indica la importancia de este sistema. La respiración sensible al SHAM depende de una tensión elevada de oxígeno y el sistema se inactiva por una corta interrupción de la aireación.

La producción de ácido glucónico con *A. niger* está catalizada por una glucosa oxidasa extracelular, parcialmente unida al micelio, que se inactiva a pH inferiores a 2,0. A pH superiores, se produce ácido glucónico a partir de glucosa mediante la acción de *A. niger*. La glucosa induce este enzima a pH superiores a 4,0, lo que hace necesario mantener en las fermentaciones para la producción de citrato un pH inferior a 2,0.

En resumen, la producción de citrato por *A. niger* se caracteriza por:

- ✓ • Una actividad elevada de los enzimas glicolíticos y de la piruvato carboxilasa inducida por los carbohidratos que conducen a la síntesis de citrato.
- La inhibición de un enzima del ciclo del ácido tricarbóxico que podría causar la descomposición del citrato.
- La producción mediada por una deficiencia de manganeso de una concentración elevada de  $\text{NH}_4^+$  intracelular que contrarresta la inhibición de la fosfofructoquinasa por el citrato.
- Una tensión de oxígeno elevada y el suministro continuo de oxígeno para mantener activa la respiración sensible al SHAM para la reoxidación del NADH.
- Un pH bajo para inactivar la glucosa oxidasa.

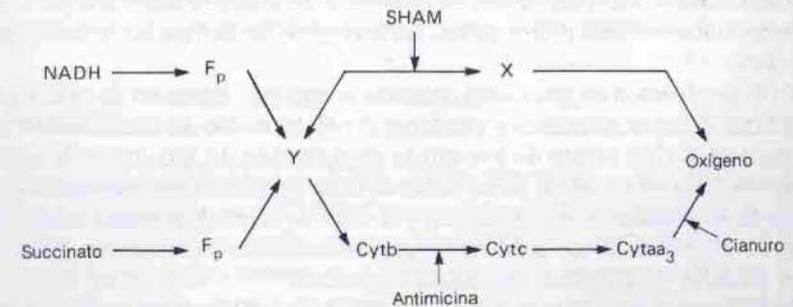


Fig. 8.2. Cadena respiratoria habitual sensible a la antimicina y al cianuro y alternativa al sistema sensible al SHAM en los *A. niger*.

## PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

El ácido D-glucónico, los gluconatos y la D-glucono- $\delta$ -lactona son compuestos químicos no tóxicos que pueden producirse a partir de glucosa mediante oxidación electroquímica o catalítica o por fermentación con *A. niger* o *Gluconobacter suboxydans*, aunque en la actualidad se prefiere la fermentación. La D-glucono- $\delta$ -lactona se utiliza como un ácido latente en las levaduras químicas. El gluconato de sodio se usa en presencia de hidróxido de sodio como agente secuestrante del calcio en los equipos de lavado de botellas, y del hierro en los agentes desoxidantes alcalinos para los metales ferrosos; también se utiliza en los adhesivos. El gluconato de calcio y el de hierro (II) se utilizan a nivel farmacéutico en el tratamiento de deficiencias de calcio y de hierro.

*Proceso de fermentación del gluconato*

El medio para la producción de gluconato de sodio con *A. niger* consiste en glucosa a una concentración inicial aproximada de  $250 \text{ g l}^{-1}$ , amoníaco, urea o extracto de maíz como fuente de nitrógeno y otros nutrientes. El nivel inicial de glucosa puede suplementarse añadiendo glucosa a la alimentación hasta un valor total de  $600 \text{ g l}^{-1}$ . Un nivel demasiado elevado de nitrógeno conduce al crecimiento excesivo y a la disminución del rendimiento de ácido. El pH se mantiene entre 6,0 y 7,0 mediante la adición de NaOH hasta que se haya conseguido un crecimiento y un nivel de glucosa oxidasa óptimos, momento en el cual se puede permitir que el pH descienda hasta 3,5. La fermentación tiene una demanda elevada de oxígeno y la temperatura se controla entre 30 y 33 °C. El rendimiento de producto suele superar el 90 % del rendimiento teórico. Las fermentaciones industriales típicas pueden producir gluconato de sodio a una velocidad media de  $10\text{-}13 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para un tiempo de operación de 20-60 horas. Sin embargo, como la cristalización del producto puede causar problemas, al obtenerse concentraciones finales de gluconato de sodio de hasta  $600 \text{ g l}^{-1}$ , en las fermentaciones más prolongadas, suele elegirse un tiempo de fermentación más corto.

En la producción de gluconato de calcio se emplea carbonato de calcio para neutralizar al ácido glucónico y mantener el pH del medio de fermentación por encima de 3,5. Con objeto de impedir la precipitación del gluconato de calcio, la cantidad de carbonato de calcio añadida es de sólo aproximadamente los dos tercios de la relación estequiométrica, y el resto de la cantidad hasta completar la neutralización se añade al filtrado después de la fermentación, recuperándose los cristales de gluconato de calcio formados.

El ácido glucónico libre se prepara predominantemente a partir de gluconato de sodio mediante intercambio iónico. El ácido glucónico en solución acuosa

está en equilibrio con la glucono- $\delta$ -lactona y la glucono- $\gamma$ -lactona, con relaciones que dependen de la concentración y de la temperatura. Los cristales de ácido glucónico, glucono- $\delta$ -lactona y glucono- $\gamma$ -lactona se separan de las soluciones sobresaturadas entre 0 y 30 °C, entre 30 y 70 °C y por encima de 70 °C respectivamente, lo que posibilita la recuperación comercial de glucono- $\delta$ -lactona. El ácido glucónico se vende en forma de solución acuosa al 50 %.

*Bioquímica de la producción de gluconato*

La  $\alpha$ -D-glucosa se convierte espontáneamente en  $\beta$ -D-glucosa, pero cuando se utiliza *A. niger* la reacción es acelerada por el enzima mutarrotasa. La  $\beta$ -D-glucosa se convierte en D-glucono- $\delta$ -lactona bajo la acción de la glucosa oxidasa del *A. niger*. La glucosa oxidasa, una flavoproteína, se reduce al quitar dos hidrógenos a la glucosa y posteriormente la flavoproteína es reoxidada por el oxígeno molecular, dando  $\text{H}_2\text{O}_2$  que es descompuesta por la catalasa. Los dos enzimas se encuentran dentro de los peroxisomas, evitando de esta forma la toxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para las células durante la producción de gluconato. Como ya se ha mencionado, la glucosa oxidasa es inducida por la glucosa a pH superiores a 4,0 y es desnaturalizada a pH inferiores a 2,0. La conversión de la  $\beta$ -D-glucosa a D-glucono- $\delta$ -lactona por *Gluconobacter suboxydans* está mediada por el enzima NADP glucosa deshidrogenasa.

Como ya se ha dicho, la D-glucono- $\delta$ -lactona y el ácido D-glucónico están en equilibrio y la conversión en ácido glucónico tiene lugar a pH neutro. Esta conversión espontánea es menos eficaz a pH bajos, y se ve facilitada en algunos procesos basados en la utilización de *A. niger* por la mediación de una D-glucono- $\delta$ -lactonasa. Como la acumulación de glucono- $\delta$ -lactona influye negativamente en la velocidad de oxidación de la glucosa, estos procesos para su eliminación eficaz son importantes. Aunque existe una ruta catabólica para el ácido glucónico formado, su descomposición parece verse retardada por las condiciones del proceso de fabricación industrial del gluconato, en particular por el exceso de la concentración de glucosa y por el pH existente.

## ACIDO ITACONICO

El ácido itacónico es un intermedio valioso para la química de los polímeros debido a la presencia de dos grupos carboxilo y un grupo metileno. El ácido itacónico se polimeriza consigo mismo dando únicamente polímeros de peso molecular bajo, y en consecuencia se comporta mejor en los copolímeros. También se utiliza en la síntesis de pirrolidonas y como aditivo emulsionante de pinturas.

El ácido itacónico se produce mediante cultivo sumergido aerobio de *Aspergillus terreus* en un medio que contiene melazas y sales amoniacales o extracto de maíz como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. El crecimiento óptimo del organismo se consigue a un pH comprendido entre 5 y 7, en tanto que a pH inferiores, de 3 a 4, se alcanza una producción óptima de ácido itacónico. La concentración inicial de azúcares oscila entre 100 y 180 g l<sup>-1</sup> y el rendimiento del producto es del 55-66 % basado en el peso de carbohidrato. El tiempo de fermentación es de unas 72 horas. Una interrupción, incluso corta, de la aireación puede detener de forma irreversible la producción de ácido itacónico. Este ácido se produce a partir del citrato por la vía del aconitato (Fig. 8.3). El metabolismo de la hexosa a citrato es similar al de la producción de citrato con *A. niger*.

#### ACIDO LACTICO

Aproximadamente la mitad de la demanda mundial de ácido láctico se obtiene mediante fermentación. Sus principales usos industriales son como acidu-

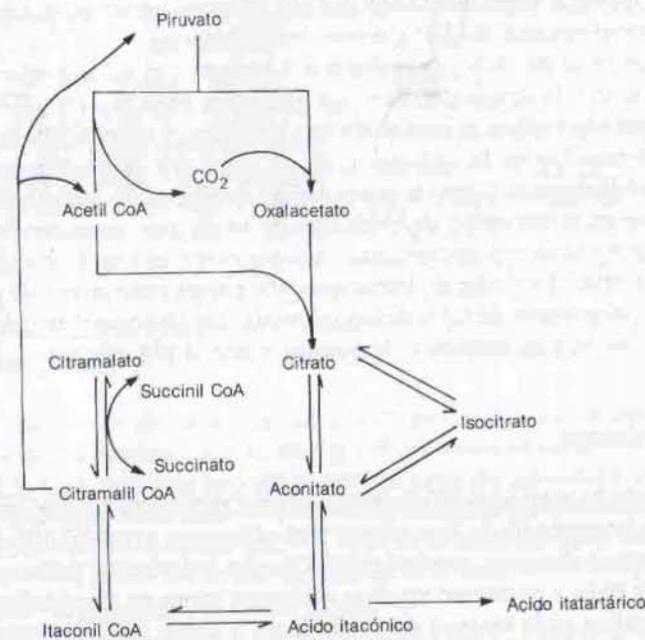


Fig. 8.3. Ruta metabólica implicada en la producción de ácido itacónico.

lante alimentario (50 % del mercado), y para la manufactura de estearoil-2-lactilato (20 %) así como en la industria farmacéutica y en otras aplicaciones.

El ácido L-(+)-láctico se obtiene por fermentación anaerobia con *Lactobacillus delbrückii* y cepas homofermentativas relacionadas. El medio contiene aproximadamente un 15 % de sacarosa o dextrosa y nitrógeno en forma compleja. El pH se controla en la región de 5,0 a 6,5 mediante neutralización con CaCO<sub>3</sub> o Ca(OH)<sub>2</sub>, la temperatura se mantiene entre 45 y 60 °C y el tiempo de fermentación es de 3 a 4 días, con lo que se obtiene un rendimiento en ácido láctico del 90 al 95 %, basado en el contenido inicial de azúcar. El proceso de fermentación se basa en la conversión de hexosa en piruvato por la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas y su conversión en L-(+)-lactato por el enzima L-lactato deshidrogenasa.

#### GLICEROL

El glicerol se produjo por fermentación como material para la fabricación de explosivos durante las dos guerras mundiales.

El glicerol se forma en cantidades minúsculas junto con el etanol en la fermentación alcohólica con levaduras. Normalmente en la producción de alcohol, el NADH + H<sup>+</sup> formado durante la glicolisis por conversión del gliceraldehído-3-fosfato en ácido 1,3-difosfoglicérico, se reoxida al convertirse el acetaldehído en etanol. Sin embargo, la adición de bisulfito de sodio da lugar a la formación de un complejo acetaldehído-sulfito y el NADH + H<sup>+</sup> queda disponible para la reducción del intermedio de la ruta glicolítica, la dihidroxiacetona fosfato, a glicerol fosfato, que es desfosforilado a glicerol. Debido a que también se forman otros subproductos, el rendimiento nunca es superior al 30 % basado en el peso de carbohidrato, en 2-3 días de fermentación. En la Figura 8.4 se resume el proceso metabólico.

#### ACETONA-BUTANOL

La acetona se emplea como solvente en la manufactura de lacas, resinas, cauchos, grasas y aceites y el butanol se utiliza en la producción de lacas, rayon, detergentes, líquido de frenos, aminas y como solvente general. Durante muchos años operó comercialmente con éxito un proceso de fermentación acetona-butanol, y la última industria dedicada a su producción, propiedad de National Chemical Products SA, cerró hace pocos años.

Este proceso consiste en la fermentación anaerobia de melazas, almidón o materiales brutos, con una concentración de carbohidrato del 5 al 6,5 %, mediante cepas de *Clostridium acetobutylicum*, produciendo aproximadamente una concentración del 2 % de mezcla de solventes. La fermentación se caracteriza por proceder en tres fases. La primera fase, entre 12 y 14 h, consiste en el crecimiento y producción rápidos de ácido acético y butírico, el descenso del pH de 6,0 hasta 4,0 y la liberación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ . La segunda fase implica la conversión de los ácidos en solventes con el incremento del  $\text{CO}_2$  producido y la reducción de la acidez valorable. En la tercera fase, la producción de gas y solventes disminuye y las células se autolisan. Un avance posterior de esta fermentación intenta regular el metabolismo para producir predominantemente un solvente, reducir el efecto tóxico de los productos en la fisiología celular e incrementar la velocidad de producción global y la eficacia en un esfuerzo por hacer este proceso comercialmente viable.

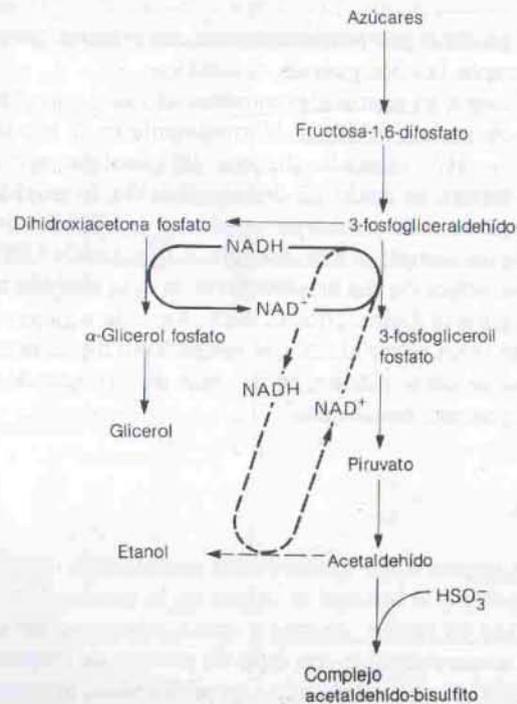


Fig. 8.4. Producción de glicerol mediante una modificación de la fermentación del etanol por las levaduras.

#### ACIDO ACETICO

El mercado mundial anual del acetato es de unos 2,5 millones de Tm. Desde 1950 los métodos sintéticos han proporcionado la mayor parte del suministro mundial de ácido acético, pero, como el etileno es la principal materia prima utilizada y su precio se ha incrementado de 6 centavos/Kg a 30 centavos/Kg desde 1970 a 1980, han ido ganando en importancia distintas rutas de producción alternativas, incluyendo los métodos biológicos. Brasil produce ácido acético por conversión química de etanol, obtenido únicamente a partir de biomasa. También tienen aplicación potencial los métodos de fermentación para la producción de acetato como materia prima química.

En el Capítulo 7 ya se ha descrito el proceso aerobio para la producción de vinagre. En las fermentaciones acidogénicas anaerobias se producen una gran variedad de ácidos grasos volátiles. El ácido acético constituye el componente mayoritario de la mezcla, aunque también se producen cantidades significativas de ácido propiónico y butírico. Los *Clostridium butyricum* producen una mezcla de ácido acético y butírico a partir de glucosa. Los *Clostridium thermoaceticum* y *C. thermoaceticum* fermentan la glucosa y la fructosa casi estequiométricamente a acetato. En la acidogénesis, es imperativo suprimir los metanógenos, asociados frecuentemente con los formadores de ácido en los cultivos mixtos, ya que convertirían el ácido en metano y  $\text{CO}_2$ .

Aunque en el proceso aerobio pueden obtenerse concentraciones de acetato más elevadas, el rendimiento teórico en el proceso de acidogénesis anaerobio es de 1,0 comparado con el 0,66 de aquel. Las dos moléculas de  $\text{CO}_2$  producidas durante la conversión de piruvato en acetil CoA se asimilan justificando la tercera molécula de acetato formada a partir de glucosa (Fig. 8.5). Además, las necesidades energéticas para el proceso anaerobio son menores y también es menor el valor de los substratos, puesto que pueden emplearse desechos de destilería y desechos de plantas de celulosa. En consecuencia, las fermentaciones acetogénicas anaerobias pueden llegar a ser el método de elección para la producción de acetato destinado a la industria química.

#### 2,3-BUTANODIOL

Aunque actualmente se dispone de rutas químicas más baratas para la manufactura de 2,3-butanodiol a partir del petróleo, las rutas alternativas por fermentación se consideran también potencialmente importantes. Los microorganismos *Klebsiella oxytoca* producen 2,3-butanodiol como metabolito mayoritario a partir de xilosa así como de glucosa y por tanto ofrecen una oportunidad

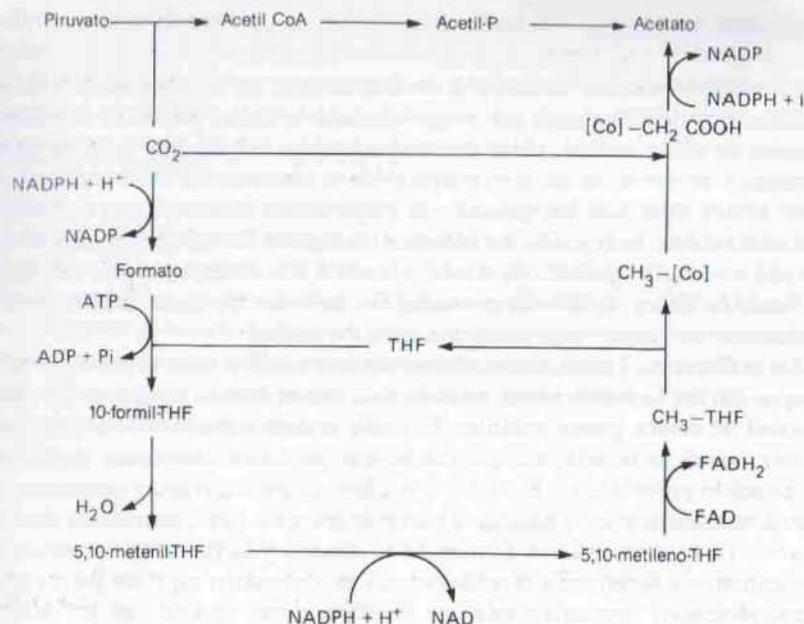


Fig. 8.5. Ruta metabólica para la producción de acetato por *Clostridium thermoaceticum*.

para la conversión microbiana de sustratos de bajo valor, derivados de hidrolizados de madera, en este producto. Los *Bacillus polymyxa* también utilizan las pentosas y las hexosas para producir 2,3-butanodiol y etanol en iguales cantidades.

Aunque el 2,3-butanodiol es un producto del metabolismo anaerobio, se necesita un suministro de oxígeno controlado y limitado para incrementar la densidad celular. Entre los productos de fermentación excretados por *K. oxytoca*, además del 2,3-butanodiol, se incluyen la acetofina, el etanol y el acetato, y la velocidad de alimentación de oxígeno puede controlar las proporciones de los diversos metabolitos producidos. En ausencia de oxígeno se producen cantidades equimoleculares de etanol y 2,3-butanodiol. El suministro limitado de oxígeno inhibe la producción de etanol y maximiza la de 2,3-butanodiol. Un incremento posterior en la cantidad de oxígeno suministrada cambia totalmente el metabolismo, pasando de la fermentación a la respiración, y convirtiendo totalmente el sustrato en masa celular y CO<sub>2</sub>. En consecuencia, la variable más importante que influye en la velocidad de producción y en el rendimiento de 2,3-butanodiol es la disponibilidad de oxígeno.

El rendimiento teórico máximo de 2,3-butanodiol producido a partir de la glucosa es de 0,5 y el rendimiento real es de alrededor del 80-90 % del teórico. Entre las desventajas del empleo de *K. oxytoca* se incluyen su baja tolerancia osmótica y los problemas de inhibición por el sustrato y por el producto. En diversas condiciones de fermentación experimentales continuas y discontinuas, se han obtenido concentraciones finales de 2,3-butanodiol de 30 a 99 g l<sup>-1</sup> con productividades que oscilan entre 0,9 y 3,0 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

La producción de 2,3-butanodiol a partir de hexosas y pentosas se basa en la formación de ácido pirúvico como intermedio metabólico clave. Después, dos moléculas de piruvato se condensan formando acetolato, que una descarboxilasa transforma en acetoína, y que a su vez puede oxidarse a 2,3-butanodiona (diacético) o reducirse enzimáticamente a 2,3-butanodiol por la acetoína reductasa.

### Acido giberélico

Las giberelinas son una de las cinco clases conocidas de fitohormonas. Entre la gran familia de las giberelinas, el ácido giberélico (Fig. 8.6), utilizado para acelerar la producción de malta, es el compuesto comercialmente más importante, y se obtiene por cultivo de *Fusarium moniliforme*, estado imperfecto de los hongos *Gibberella fujikuroi*. Inicialmente se utilizaron procesos de cultivo en superficie, que producían rendimientos de 40 a 60 mg/l de ácido giberélico en una fermentación que se prolongaba de 2 a 3 semanas. Actualmente las fermentaciones comerciales se llevan a cabo en cultivos sumergidos, y se obtienen unos rendimientos de 1,2 g/l de ácido giberélico en unos 6 días. En el medio de fermentación deben darse dos condiciones importantes, un bajo contenido de nitrógeno y una mezcla de fuentes de carbono. El proceso de fermentación se caracteriza por seis etapas fisiológicamente distintas (Fig. 8.7): (1) fase de latencia, (2) fase de crecimiento sin limitación de nitrógeno con baja producción de giberelina, (3) limitación de la glicina, velocidad de crecimiento celular baja y baja producción de giberelina, (4) agotamiento de la glicina, catabolismo de

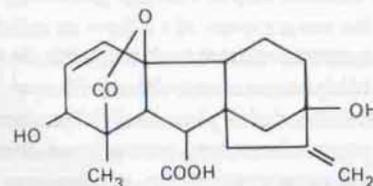


Fig. 8.6. Acido giberélico.

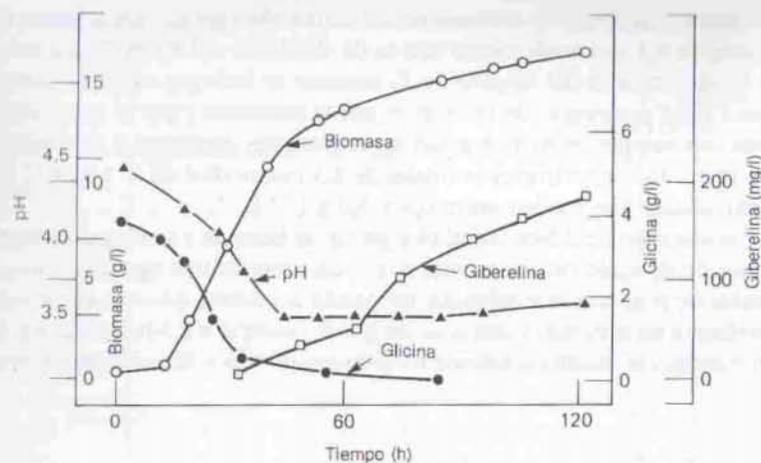


Fig. 8.7. Proceso de fermentación discontinua limitado por la glicina para la producción de giberelina por *Gibberella fujikuroi* (reproducida con permiso de Bu'Lock *et al.*, 1974).

la glucosa residual, velocidad de formación de giberelina alta, (5) agotamiento de la glucosa, menor acumulación de giberelina, (6) lisis celular e incremento del pH.

## Biopolímeros

En esta sección se va a considerar la producción de dos tipos de biopolímeros, los polisacáridos microbianos y el poli- $\beta$ -hidroxibutirato.

### POLISACÁRIDOS MICROBIANOS

Tradicionalmente, los polisacáridos industriales se obtenían a partir de plantas y algas marinas. Los polisacáridos microbianos son una alternativa viable para sustituir algunos de los productos derivados de las plantas o de las algas pero también para utilizarlas en un amplio rango de nuevas aplicaciones industriales. La ingeniería genética de algunos de estos organismos productores y/o la

regulación de las condiciones medioambientales en las que se lleva a cabo la fermentación brindan la posibilidad de manipulación de las propiedades y características del producto, ampliando por tanto la diversidad de biopolímeros disponibles.

La goma xantano es el único polisacárido microbiano obtenido por la fermentación que representa una parte significativa del mercado mundial. Su unidad repetitiva básica consiste en un pentasacárido que contiene glucosa, manosa, ácido glucurónico, acetato y piruvato. Esta goma tiene una viscosidad elevada a concentraciones bajas, que es estable en un amplio rango de pH y es independiente de la temperatura y de la presencia de cationes. En solución acuosa y combinada con polisacáridos de las plantas forma geles estables, por lo que se utiliza como estabilizante de suspensiones y para controlar la viscosidad. Debido a sus propiedades pseudoplásticas, combinadas con su estabilidad frente a la temperatura y a los cationes, se emplea como lubricante. También se utiliza junto con surfactantes e hidrocarburos para mejorar la recuperación de aceites.

Los alginatos se obtienen a partir de algas marinas, aunque como esta fuente está sujeta a una gran variabilidad, se ha considerado interesante a nivel industrial el sustituirlos por polisacáridos similares obtenidos por fermentación, por ejemplo el polisacárido de *Azotobacter vinelandii*. Entre otros polisacáridos microbianos de interés comercial se incluyen el pululano, producido por *Aureobasidium pullulans*, el seleroglucano, producido por especies de *Sclerotium* y el gelano, producido por *Pseudomonas elodea*.

Los procesos destinados a la producción de exopolisacáridos microbianos se caracterizan por la elevada viscosidad del medio de fermentación, las bajas concentraciones de producto obtenidas y los cambios conformacionales del polímero ocurridos durante la fermentación. El control de los constituyentes del medio así como de otros parámetros de la fermentación es crítico para conseguir las velocidades de síntesis deseadas. Los estudios limitados realizados indican que la modificación del exopolisacárido mediante manipulación del medio de cultivo parece influir en el grado de polimerización más que en la estructura real y en la composición de la unidad repetitiva.

En el caso de la producción de goma xantano, el contenido de piruvato como sustituyente se puede hacer variar del 0 al 75 % mediante una selección adecuada de la cepa y el medio, lo que puede influir en las propiedades reológicas del polímero, cuando la concentración del polímero cambia o cuando se alteran la fuerza iónica o la temperatura del medio. Algunos medios de crecimiento para la producción de xantano dan lugar a la formación de mutantes que no producen polisacáridos, aunque esto puede evitarse mediante una elección adecuada del medio limitando la cantidad de nutriente para el crecimiento. En general, en la producción de polisacáridos microbianos cargados debe controlarse el pH; por ejemplo, el pH óptimo para la producción de xantano es de 7,0 ce-

sando el crecimiento y la formación de producto a un pH de 5,5. A lo largo de la fermentación, las propiedades del caldo cambian, pasando de ser un fluido newtoniano con viscosidad baja a ser un fluido no newtoniano con viscosidad alta, a medida que la concentración de exopolisacárido aumenta. Estos cambios influyen profundamente en el mezclado y en la transferencia de masa y calor en la fermentación, por lo que el diseño y las condiciones de operación del fermentador deben optimizarse ajustándose a estas condiciones reológicas. La concentración final de xantano en los caldos de los fermentadores es de unos 50 g. l<sup>-1</sup> y los rendimientos, basados en la glucosa consumida, son del 50 al 60 %.

La mayoría de las síntesis de exopolisacáridos bacterianos se producen intracelularmente, mediante la vía de los azúcares, activados con un nucleótido. Los azúcares se transfieren desde el nucleótido a un lípido transportador, activado por transferencia inicial de un azúcar fosfato, dando lugar a la formación de la unidad repetitiva de azúcar. El método exacto de elongación de la cadena y de extensión del polisacárido es desconocido.

#### POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO (PHB)

La principal aplicación potencial del poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) es como sustituto de los plásticos en casos en los que sus propiedades de biodegradabilidad representen una ventaja. La capacidad de las bacterias para reoxidar el NADH llega a ser limitante a concentraciones bajas de oxígeno, y entonces la reoxidación da lugar a productos como el PHB, el etanol o el butanol. De esta forma el PHB es acumulado como material de reserva por una amplia variedad de bacterias entre ellas *Alcaligenes eutrophus*, que puede llegar a almacenar el 70-80 % de su biomasa como PHB.

En el PHB la unidad repetitiva o monómero, el  $\beta$ -hidroxibutirato, se sintetiza a partir de dos unidades de acetyl CoA; el peso molecular ideal del polímero oscila entre 200.000 y 300.000. La síntesis de PHB, además de estar influida por la concentración de oxígeno, se ve favorecida por la limitación del nitrógeno o el fósforo. El proceso de fermentación para la producción comercial de PHB debería consistir probablemente en dos etapas, una de crecimiento, sin limitación de oxígeno o sustrato, que acumule concentraciones altas de biomasa, y otra de formación de producto en condiciones óptimas de limitación de nutrientes. Aunque la glucosa es utilizada comúnmente como sustrato por los *A. eutrophus*, comercialmente sería deseable la posibilidad de utilizar sustratos más baratos que redujesen de forma significativa los costos de producción.

#### Bioinsecticidas

Las principales reservas relacionadas con el empleo de insecticidas químicos se deben a: (a) su falta de especificidad y la posibilidad de que también puedan matar a insectos distintos a los deseados, (b) el potencial desarrollo de organismos blanco resistentes al insecticida y (c) en algunos casos su persistencia indeseable en el medio ambiente. El control microbiano de los insectos se basa en el empleo de esporas de células vegetativas de microorganismos patógenos para estos animales, ya que se conocen unas 400 especies de hongos y más de 90 tipos de bacterias que atacan a los insectos y ácaros.

Los productos de fermentación producidos por algunas variedades de *Bacillus thuringiensis*, utilizados para controlar orugas, mosquitos y moscas negras, están en la actualidad ampliamente establecidos y representan aproximadamente el 90 % del mercado total de los bioinsecticidas. Las células esporuladas de *B. thuringiensis* contienen una proteína cristalina de peso molecular elevado denominada delta-endotoxina, tóxica para las larvas de los lepidópteros. Este material es digerido por las proteasas en el medio intestinal alcalino de las orugas, produciéndose subunidades tóxicas que parecen causar la desintegración de las células epiteliales de la superficie del intestino, dando lugar a la parálisis y muerte del insecto. *B. thuringiensis* también producen una segunda toxina, la  $\beta$ -exotoxina o turingiensina, tóxica para las moscas caseras. Existen muchas subespecies, aunque las *Kurstaki* no contienen  $\beta$ -exotoxina. Las toxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* son relativamente específicas frente a las larvas de los dípteros acuáticos, por ejemplo los mosquitos. Los *Bacillus sphaericus*, que también producen un insecticida potencialmente útil para el control de los mosquitos, y los *Bacillus popilliae*, patógenos del escarabajo japonés, tienen un potencial comercial significativo, dado que las dificultades de producción *in vitro* mediante fermentación parecen haber sido superadas.

Los *Bacillus thuringiensis* se producen por cultivo sumergido aerobio en un medio complejo barato, que contiene ingredientes como la harina de soja, almidón de maíz, extracto de maíz, melazas, extracto de levaduras y caseína hidrolizada. Las condiciones de fermentación se han optimizado para conseguir velocidades de crecimiento bacteriano y rendimientos celulares elevados, así como una eficaz esporulación con la consiguiente producción de la toxina cristalizada.

Los hongos infectan generalmente a los insectos a través de la cutícula, y su invasión depende de la producción de quitinasas, proteasas y lipasas. Los principales hongos entomopatógenos son los Deuteromycotina entre los que se incluyen *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae* (patógenos generales), *Verticillium lecanii* (un patógeno de la mosca blanca y de los áfidos), e *Hirsutiella*

*thompsonii* (un patógeno de los ácaros eriófidios). Ante todo, estas especies tienen interés porque crecen *in vitro*. En algunos hongos, los conidios son los agentes responsables de la infección y con frecuencia se necesitan técnicas de cultivo sólido o semisólido. Sin embargo, en el caso de *B. bassiana* y *H. thompsonii*, la formación de conidios y la producción de esporas infectivas se consigue en cultivos sumergidos. Diversas especies, como *V. lecanii*, adoptan una morfología similar a la de las levaduras en los cultivos sumergidos y forman elementos embrionarios o blastoesporas. La producción de blastoesporas no se ha utilizado mucho a nivel comercial, puesto que éstas tienden a ser inestables y su capacidad infectiva es baja. Si estos problemas pudieran resolverse en los procesos de fermentación sumergidos, podrían ser los métodos más eficaces de producción de entomopatógenos fúngicos. En muchos casos las exigencias nutritivas de los hongos patógenos para los insectos son complejas y poco conocidas, por lo que existe aquí un amplio campo de investigación que puede conducir a la optimización de las condiciones del cultivo para la producción de insecticidas fúngicos.

Los virus de los insectos pueden producirse mediante técnicas de fermentación por infección viral de células de insectos susceptibles de mantenerse en cultivos celulares. Actualmente han sido establecidas muchas líneas celulares de insectos, especialmente de los lepidópteros y de los dípteros, empleándose una gran variedad de técnicas para optimizar el crecimiento celular y la replicación viral en estos cultivos celulares. Los problemas técnicos asociados con los cultivos celulares a gran escala y los altos costos del medio de cultivo son comúnmente los principales problemas para el desarrollo de los procesos de fermentación comercialmente viables para la producción de insecticidas virales.

## Capítulo 9

### *Aditivos alimentarios*

En este capítulo se van a tratar los procesos de fermentación empleados en la producción de algunos aditivos alimentarios, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, grasas y aceites. La distinción entre aditivos alimentarios y compuestos químicos industriales no es tan clara, y los procesos de producción de algunos compuestos químicos, como el ácido cítrico y los polisacáridos microbianos, que tienen también otros usos además de como aditivos alimentarios, ya han sido descritos en el Capítulo 8. Las proteínas de organismos unicelulares y el vinagre (Capítulo 7) y muchos enzimas (Capítulo 11) también pueden ser considerados como aditivos alimentarios. Asimismo, algunos de los aditivos alimentarios discutidos en este capítulo tienen otras aplicaciones; por ejemplo, el ácido glutámico se emplea como material de partida para la síntesis de productos químicos como el N-acetilglutamato, un surfactante biodegradable, y el ácido oxopirrolidincarboxílico, un agente humectante natural. De la misma forma, el ácido  $\gamma$ -linolénico se emplea como precursor de las prostaglandinas.

#### **Aminoácidos**

Los aminoácidos se producen mediante un amplio rango de tecnologías que incluyen la fermentación directa, la biotransformación de precursores mediante

células o enzimas, la extracción de hidrolizados de proteínas y la síntesis química, y se utilizan como nutrientes y saborizantes tanto en los alimentos como en los piensos. La Tabla 9.1 muestra la demanda anual, los métodos de producción y las aplicaciones de los aminoácidos en la industria alimentaria. Los aminoácidos importantes con aplicaciones distintas a la alimentación incluyen la L-arginina, L-glutamina, L-histidina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tiroxina y L-valina.

Aunque se hayan desarrollado procesos de fermentación o biotransformación para la producción de todos los aminoácidos excepto la glicina, la L-cisteína y la L-cistina, no todos ellos son viables comercialmente. La L-asparagina, la L-leucina, la L-tiroxina, la L-cisteína y la L-cistina se obtienen por purificación de hidrolizados proteicos. La síntesis química es más económica para la producción de mezclas racémicas de D- y L-isómeros ópticamente inactivos, produciéndose de esta forma D,L-alanina, D,L-metionina, D,L-triptófano y glicina. Para resolver estas mezclas racémicas pueden emplearse procesos basados en enzimas como los amino acilasa (véase Capítulo 11).

Las cepas microbianas de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* han adquirido gran importancia en la producción de aminoácidos por fermentación. Algunas cepas naturales aisladas pueden excretar grandes cantidades de ácido glutámico. A causa de mecanismos metabólicos reguladores de la célula, particularmente la represión e inhibición por los productos finales, las células «salvajes» rara vez excretan niveles substanciales de aminoácidos, por lo que la producción de aminoácidos en cantidades comerciales ha dependido del éxito obtenido en el desarrollo de mutantes desreguladores. Los dos métodos más importantes se basan en el uso de mutantes auxotróficos y reguladores o en una combinación de los dos. Los mutantes auxotróficos, que carecen del enzima necesario para formar el metabolito efector regulador (frecuentemente el producto final), pueden acumularse y excretar el intermedio metabólico que es el sustrato para el enzima eliminado. Por ejemplo, un organismo lisinaauxótrofo carece de un enzima de la ruta necesaria para la síntesis de lisina y para crecer necesita lisina o un precursor metabólico que pueda convertirse en lisina. La inhibición por el producto final por el aminoácido proveniente de una ruta biosintética no ramificada puede impedirse con el desarrollo de mutantes reguladores, que tengan un enzima clave alterado insensible, permitiendo así la acumulación de dicho aminoácido en particular. En los métodos de análisis para la selección de mutantes reguladores o análogo-resistentes pueden utilizarse análogos del producto final, que también son capaces de inhibir al enzima clave sensible. Los revertantes pueden seleccionarse a partir de mutantes auxotróficos (aparentemente carentes del enzima regulador clave) que producen un enzima desregulado modificado. La Tabla 9.2 muestra los datos genéticos de mutantes de *Brevibacterium spp* y *Corynebacterium spp* y algunos de los rendimientos publicados de aminoácidos producidos en exceso a partir de glucosa.

#### PRODUCCION DE ACIDO GLUTAMICO

Las propiedades como potenciador del sabor del glutamato de sodio fueron descubiertas en Japón a comienzos del siglo veinte. En la actualidad existe un proceso de fermentación con *Corynebacterium glutamicum* que suministra una producción mundial anual de unas 400.000 Tm aproximadamente de este producto.

En general, para la producción comercial de ácido glutámico se utilizan mezclas o almidón hidrolizado y *C. glutamicum* o cepas relacionadas, siendo esencial en el proceso el suministro abundante de una fuente adecuada de nitrógeno, tal como las sales amónicas, puesto que el  $\text{NH}_3$  se incorpora a la molécula del aminoácido. Las bacterias acidoglutámicas también pueden utilizar urea como fuente de nitrógeno. La concentración de los iones amonio debe mantenerse a un nivel bajo en el medio puesto que las concentraciones altas son perjudiciales para el crecimiento celular y la formación de producto. El pH tiende a disminuir debido a la excreción de glutamato por las células y a la asimilación del ión amonio, por lo que se añade amoníaco gaseoso con objeto de controlar simultáneamente el nivel de nitrógeno del medio y mantener un pH de fermentación óptimo entre 7,0 y 8,0. La biosíntesis del glutamato es un proceso aerobio que necesita el aporte de oxígeno durante toda la fermentación.

Las bacterias acidoglutámicas necesitan biotina para crecer y la acumulación del aminoácido es máxima a una concentración de biotina crítica de 0,5  $\mu\text{g/g}$  de células (secas), que es subóptima para un crecimiento máximo. El exceso de biotina, aunque hace que el crecimiento sea mayor, perjudica en cambio la acumulación de glutamato. Durante el crecimiento la adición de ácidos grasos saturados de 16 y 18 átomos de carbono permite también la acumulación de glutamato incluso en presencia de concentraciones elevadas de biotina, debido a que la acumulación del aminoácido está controlada principalmente por su velocidad de excreción más que por su velocidad de biosíntesis. La biotina es un cofactor de la acetil CoA carboxilasa, primer enzima en la ruta biosintética del ácido oleico ( $\text{C}_{18:1}$ , insaturado) y su posterior incorporación a los fosfolípidos. Los ácidos grasos saturados de 16 y 18 átomos de carbono inhiben la acetil CoA carboxilasa. Los fosfolípidos regulan la permeabilidad de la célula al glutamato y las concentraciones subóptimas de biotina o los ácidos grasos saturados de 16 ó 18 átomos de carbono actúan disminuyendo la concentración de fosfolípidos en la célula, y por tanto aumentan la permeabilidad de la célula al glutamato.

Incluso con un exceso de biotina, las bacterias acidoglutámicas, que crecen en presencia de penicilina, pueden acumular grandes cantidades de glutamato. La penicilina inhibe la síntesis de las paredes bacterianas y la acumulación intensificada de glutamato se cree que se debe a que las células se hinchan y las

Tabla 9.1. Producción anual de aminoácidos con aplicaciones alimentarias

Aminoácidos	Producción anual (Tm)	Fermentación directa	Métodos de producción			Principales aplicaciones en alimentos
			Biotransformación enzimas/células	Extracción de hidrolizados proteicos	Síntesis química	
L-Alanina	50		+			Potenciador del sabor
D,L-Alanina	200				+	Potenciador del sabor
L-Aspartato	1 000		+			Potenciador del sabor
L-Cisteína	200			+		Antioxidante en panadería
L-Glutamato	400 000	+			+	Potenciador del sabor
Glicina	6 000				+	Edulcorante
L-Lisina	40 000	+				Aditivo alimentario
D,L-Metionina	70 000				+	Aditivo alimentario
L-Treonina	100	+			+	Aditivo alimentario

Tabla 9.2. Características genéticas de algunas cepas productoras de aminoácidos de *Brevibacterium flavum* y *Corynebacterium glutamicum*

Cepa microbiana	Aminoácido	Características genéticas	Rendimiento (gl <sup>-1</sup> )
<i>Brevibacterium flavum</i>	L-Arginina	Gua <sup>-</sup> TA <sup>r</sup>	35
	L-Histidina	TA <sup>r</sup> SM <sup>r</sup> Eth <sup>r</sup> ABT <sup>r</sup>	10
	L-Isoleucina	AHV <sup>r</sup> OMT <sup>r</sup>	15
	L-Lisina	AEC <sup>r</sup>	57
	L-Prolina	Ile <sup>-</sup> SG <sup>r</sup> DHP <sup>r</sup>	29
	L-Treonina	Met <sup>-</sup> AHV <sup>r</sup>	18
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Glutamato	Tipo silvestre	> 100
	L-Glutamina	Tipo silvestre	40
	L-Lisina	Hom <sup>-</sup> Leu <sup>-</sup> AEC <sup>r</sup>	39
	L-Fenilalanina	Tyr <sup>-</sup> PPF <sup>r</sup> PAP <sup>r</sup>	9
	L-Triptófano	Phe <sup>-</sup> Tyr <sup>-</sup> 5MT <sup>r</sup> TrpHx <sup>r</sup> 6FT <sup>r</sup>	
		4MT <sup>r</sup> PPF <sup>r</sup> PAP <sup>r</sup> TyrHx <sup>r</sup> PheHx <sup>r</sup>	12
	Phe <sup>-</sup> PPF <sup>r</sup> PAP <sup>r</sup> PAT <sup>r</sup> TyrHx <sup>r</sup>	18	

Abreviaturas: r, resistente; ABT, 2-aminobenzotiazol; AEC, S-(β-aminoetil)-L-cisteína; AHV, ácido α-amino-β-hidroxi-aléico; DHP, 3,4-deshidroprolina; Eth, etionina; 6FT, 6-fluorotriptófano; 4MT, 4-metilriptófano; 5MT, 5-metilriptófano; OMT, O-metiltreonina; PAP, p-aminofenilalanina; PheHx, fenilalanina hidroxamato; SG, sulfaguanidina; TA, 2-tiazolalanina; TyrHx, tirosina hidroxamato; TrpHx, triptófano hidroxamato.

Abreviaturas auxótrofas: —, auxótrofas; Ile, isoleucina; Met, metionina; Hom, homoserina; Leu, leucina; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina; Gua, guanina.

paredes se debilitan, dañando la barrera de permeabilidad de la membrana celular.

En condiciones óptimas para la producción de glutamato a partir de hexosa, predomina la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, que dirige los precursores del carbono hacia el ciclo del ácido tricarboxílico. El NADPH + H<sup>+</sup> formado en la descarboxilación oxidativa del isocitrato a  $\alpha$ -cetogluturato suministra el cofactor reducido, que, junto con el NH<sub>3</sub>, se necesita para la conversión de  $\alpha$ -cetogluturato a glutamato por la acción de la glutamato deshidrogenasa. Las cepas productoras de ácido glutámico comercial carecen del enzima  $\alpha$ -cetogluturato deshidrogenasa del ciclo del ácido tricarboxílico y por consiguiente, en ausencia de iones NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aunque con suficiente oxígeno, el ácido  $\alpha$ -cetoglutámico se acumula. Los compuestos intermedios del ciclo de Krebs, necesarios para el aprovisionamiento del oxalacetato que interviene en la reacción de condensación de la citrato sintetasa y otras reacciones celulares, provienen de reacciones anapleróticas eficaces. La fosfoenolpiruvato carboxilasa juega un papel importante en la carboxilación del fosfoenolpiruvato para formar oxalacetato. Por otra parte, los compuestos intermedios del ciclo de Krebs pueden provenir del ciclo del glicoxilato (véase Capítulo 2). Estequiométricamente a partir de 1,4 moles de glucosa se obtiene 1 mol de glutamato mediante el ciclo del glicoxilato, mientras que la ruta que implica la fijación del dióxido de carbono bajo la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa es más eficaz y produce 2 moles de glutamato por mol de glucosa. Con objeto de incrementar la eficacia de la conversión se han introducido algunos mutantes que tienen niveles bajos del enzima isocitrato liasa del ciclo del glicoxilato. En la Figura 9.1 se muestra la vía metabólica seguida para la producción de glutamato a partir de glucosa.

#### PRODUCCION DE LISINA

La lisina, un aminoácido esencial en la nutrición del hombre y los animales, y su deficiencia en los cereales, ha hecho que el mercado mundial anual de ésta supere las 40.000 Tm. El aminoácido se produce fundamentalmente por fermentación directa con un mutante auxotrófico de *Corynebacterium glutamicum*. Recientemente se ha comercializado un segundo proceso de fermentación, basado en un mutante regulador de *Brevibacterium flavum*, así como un proceso de biotransformación basado en la conversión de la  $\alpha$ -aminocapro lactama sintetizada químicamente en L-lisina.

En la Figura 9.2 se muestra la ruta seguida para la biosíntesis de lisina por *C. glutamicum* y *B. flavum*. El primer enzima, la aspartoquinasa, está regulado por un proceso de retroinhibición concertada por la L-treonina y la L-lisina. La L-treonina causa la retroinhibición de la homoserina deshidrogenasa en tanto

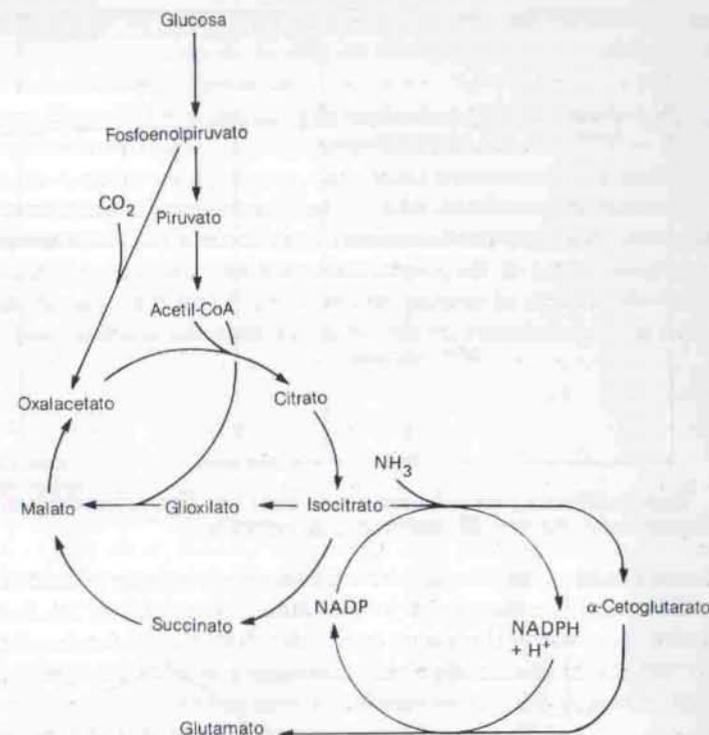


Fig. 9.1. Ruta metabólica para la producción de ácido glutámico a partir de glucosa.

que la L-metionina inhibe la síntesis de este enzima. Por tanto, un homoserinauxótrofo o un treoninmetioninauxótrofo de *C. glutamicum* disminuyen la concentración intracelular de la treonina y reducen su marcado efecto retroinhibitorio sobre la aspartoquinasa y favorecen la producción de lisina. La S-(2-aminoetil)-L-cisteína (SAEC), un análogo de la lisina, que se comporta como un falso retroinhibidor de la aspartoquinasa, inhibe el crecimiento de *B. flavum*. Algunos mutantes, capaces de crecer en presencia de SAEC y L-treonina y que se considera que contienen aspartoquinasa, desensibilizados frente a la retroinhibición concertada, son potentes productores de L-lisina. Combinando mutantes auxotróficos y reguladores, resistentes al SAEC y que necesitan homoserina o treonina y metionina para crecer, se obtiene una sobreproducción de lisina.

La biosíntesis del aspartato para la producción de lisina parte del oxalacetato proveniente del ciclo de Krebs. La reacción anaplerótica predominante se cree



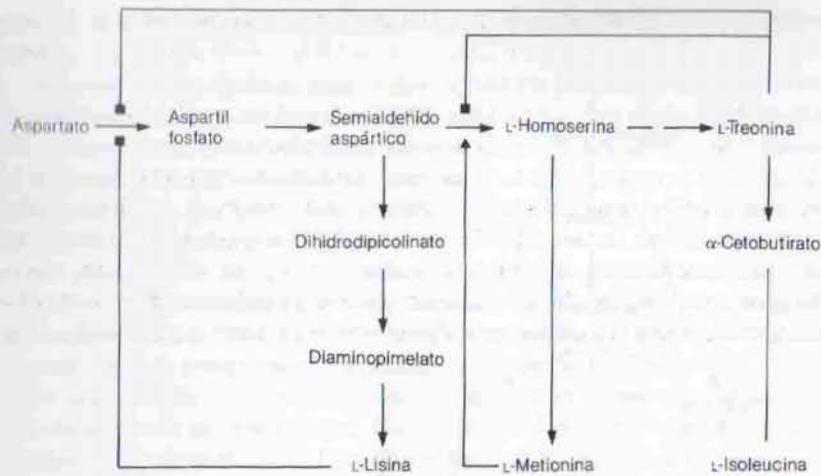


Fig. 9.2. Ruta metabólica para la biosíntesis de lisina con *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium flavum*. ■, inhibición; ▲, represión.

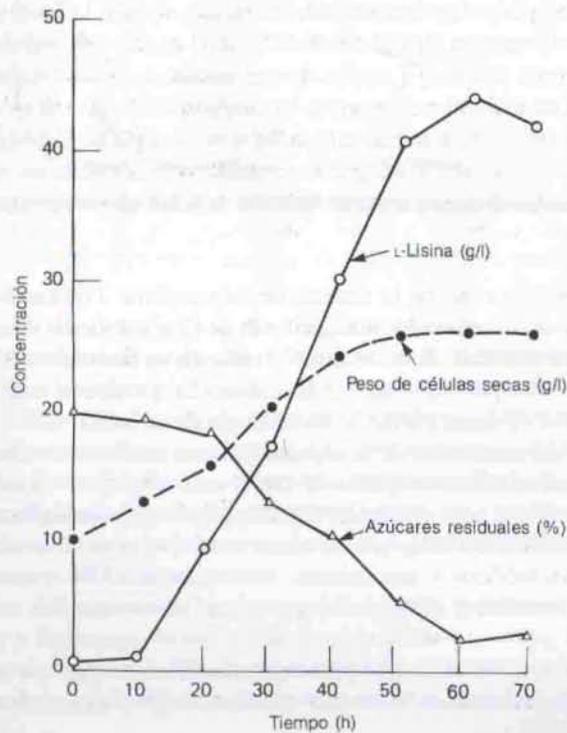


Fig. 9.3. Evolución con el tiempo de la fermentación de la lisina (reproducido con permiso de Nakayama, 1985).

que es el sistema de carboxilación del fosfoenolpiruvato en vez del ciclo del glioxilato. La incorporación de biotina en exceso en el medio inhibe la sobreproducción indeseable de glutamato.

En la Figura 9.3 se muestra un ejemplo de un proceso de fermentación para la producción de lisina por un homoserinauxótrofo.

La D,L- $\alpha$ -aminocapro lactama, sintetizada químicamente a partir de ciclohexano, es la materia prima para la producción de L-lisina por biotransformación. Las células secas con acetona de *Cryptococcus laurentii*, que contienen el enzima L- $\alpha$ -aminocapro lactama hidrolasa, convierten la L-aminocapro lactama en L-lisina, en tanto que las células secas con acetona de *Achromobacter obae* contienen una racemasa que convierte la D- $\alpha$ -aminocapro lactama a la forma L (Fig. 9.4).

### Nucleósidos

Los efectos potenciadores del sabor del katsubushi, utilizado en Japón, se deben a la sal de la histidina del 5'-inosinmonofosfato (IMP). El 5'-guanosinmonofosfato (GMP) también es un potente potenciador del sabor, existiendo sinergismo entre las propiedades como potenciadores del IMP y del GMP. Estos productos se obtienen comercialmente en Japón mediante hidrólisis enzimática del RNA de levaduras y por fermentación directa.

La producción de IMP por fermentación se basa en la obtención microbiana de inosina, que es fosforilada químicamente a IMP, o en la fermentación directa. La membrana de una célula normal es permeable a la inosina pero no al IMP.

En la Figura 9.5 se muestra la ruta seguida para la producción de nucleótidos purina por *Bacillus subtilis*. En esta secuencia de reacciones metabólicas,

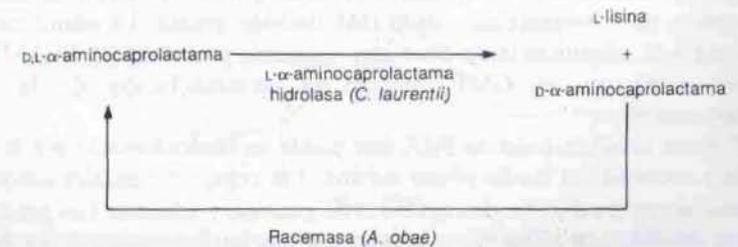


Fig. 9.4. Conversión de la D,L- $\alpha$ -aminocapro lactama a L-lisina por biotransformación.

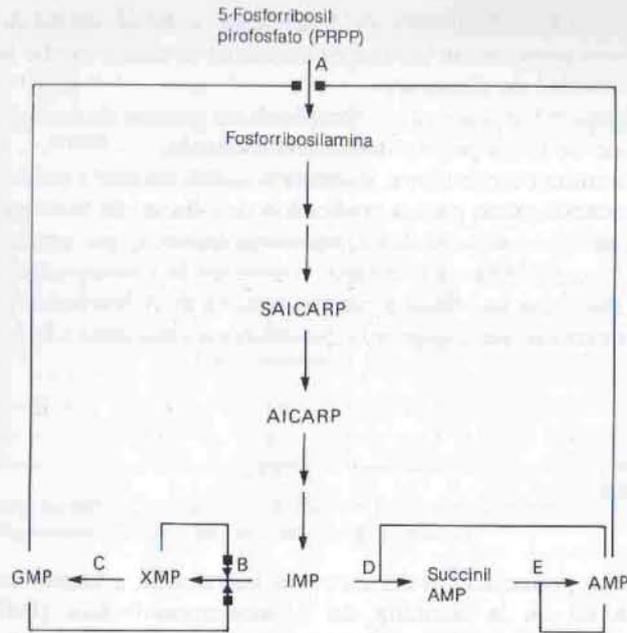


Fig. 9.5. Biosíntesis de IMP, GMP y AMP en *B. subtilis*. ■, inhibición; ▲, represión; A, PRPP aminotransferasa; B, IMP deshidrogenasa; C, XMP reductasa; D, Adenilsuccinato sintetasa; E, Adenilsuccinato liasa; SAICARP, 5'-fosforribosil-5-amino-4-imidazol-N-succinocarboxamida; AICARP, 5'-fosforribosil-5-amino-4-imidazol carboxamida.

el 5'-fosforribosilpirofosfato (PRPP) se convierte en IMP, que es un precursor del GMP y el AMP. La actividad específica de la IMP deshidrogenasa es mucho mayor que la de la adenilsuccinato sintetasa, lo que da lugar a la conversión predominante de IMP en GMP. El XMP y el GMP causan la inhibición y represión por retroinhibición de la IMP deshidrogenasa. La adenilsuccinato sintetasa y la adenilsuccinato liasa son reguladas por el AMP. El AMP y, en menor extensión, el GMP, causan la retroinhibición de la PRPP aminotransferasa.

Cuando la célula sintetiza IMP, éste puede ser desfosforilado por la propia célula y excretado al medio como inosina. Las cepas comerciales productoras de inosina son auxótrofas desreguladas de guanina y adenina. Los productores típicos del IMP son auxótrofos de adenina, con baja actividad de los enzimas que degradan al IMP. Existen mutantes permeables capaces de excretar IMP.

Los mutantes de *Brevibacterium ammoniagenes*, utilizados en la producción industrial, también son insensibles a los iones  $Mn^{2+}$  que causan normalmente la disminución de la producción de IMP. En la Figura 9.6 se muestra el patrón de producción de IMP por *B. ammoniagenes*.

El principal problema con la sobreproducción de GMP mediante fermentación directa está relacionado con la regulación por retroinhibición de la PRPP aminotransferasa por la GMP, la cual puede producirse por distintos procesos de fermentación:

- (1) Producción de guanosina por fermentación directa, usando adeninauxótrofos para incrementar la producción de GMP a partir de glucosa. El GMP no atraviesa la membrana de la célula y es excretado como guanosina, que necesita ser fosforilada químicamente a GMP.
- (2) Uso de un cultivo formado por dos mutantes de *Brevibacterium ammoniagenes*, uno capaz de producir XMP a partir de glucosa y el otro capaz de convertir la XMP en GMP.

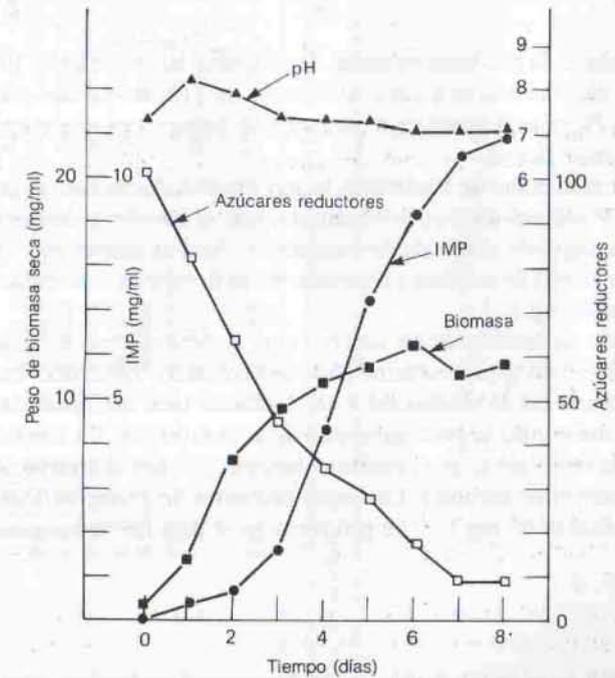


Fig. 9.6. Evolución con el tiempo de la producción de IMP con *Brevibacterium ammoniagenes* Ky 13102 (reproducido con permiso de Furuya *et al.*, 1968).

- (3) Producción de 5-amino-4-imidazol-carboxamida ribósido (ALICAR) por fermentación seguido por su conversión química a GMP.

En la Tabla 9.3 se ilustran los rendimientos de nucleósidos o productos relacionados obtenidos por fermentación con cepas de mutantes.

## Vitaminas

Aunque los microorganismos son capaces de sintetizar un amplio rango de vitaminas, normalmente no las producen en exceso. La vitamina B<sub>12</sub> y la riboflavina se obtienen comercialmente por fermentación, aunque en la actualidad la segunda se produce principalmente mediante síntesis química.

### VITAMINA B<sub>12</sub>

Actualmente, la producción anual de vitamina B<sub>12</sub> es de unos 10.000 Kg. La producción puede llevarse a cabo utilizando un proceso en dos etapas basado en cepas de *Propionibacterium* o mediante un proceso en una etapa con *Pseudomonas denitrificans*.

En la primera etapa de fermentación con *Propionibacterium*, se produce principalmente 5'-desoxi-adenosilcobinamida, que se convierte después en vitamina B<sub>12</sub> en la segunda etapa de fermentación. Ambas etapas son aerobias y el rendimiento global de producto obtenido en un tiempo de fermentación de unos 6 días es de 40 mg l<sup>-1</sup>.

El proceso de fermentación aerobio con *P. denitrificans* en una sola etapa se lleva a cabo en un medio suplementado con cobalto y 5,6-dimetil-benzimidazol. La betaína aumenta el rendimiento del producto bien activando la biosíntesis o bien incrementando la permeabilidad de la membrana. En consecuencia, las melazas de la remolacha, que contienen betaína, pueden utilizarse de forma eficaz como fuentes de carbono. Las cepas mutantes de *P. denitrificans* producen aproximadamente 60 mg l<sup>-1</sup> de producto en 4 días de fermentación.

### RIBOFLAVINA

En 1947 se introdujo un proceso de fermentación aerobio para la producción de riboflavina utilizando *Ashbya gossypii*. Después de siete días de fer-

Tabla 9.3. Producción de nucleótidos y productos relacionados mediante fermentación

Cepa microbiana	Producto	Características genéticas	Rendimiento (g l <sup>-1</sup> )
<i>B. ammoniagenes</i>	IMP	Ade <sup>-</sup> Mn <sup>2+</sup> insensible	12.8
	IMP	Ade <sup>-</sup> Gua <sup>-</sup> 6MG <sup>r</sup>	19.0
	Inosina	Ade <sup>-</sup> Gua <sup>-</sup> 6MG <sup>r</sup> 6MTP <sup>r</sup>	13.6
	Inosina	Ade <sup>-</sup> 6MTP <sup>r</sup> 8AG <sup>r</sup> M5O <sup>r</sup> 6TG <sup>r</sup>	30.0
<i>Microbacterium</i> sp.	Inosina	Ade <sup>-</sup> His <sup>-</sup> Tyr <sup>-</sup>	35.0
	Inosina	Ade <sup>-</sup> His <sup>-</sup> Red <sup>-</sup> Dea <sup>-</sup> 8AG <sup>-</sup>	10.5
<i>B. subtilis</i>	Inosina	Ade <sup>-</sup> His <sup>-</sup> Red <sup>-</sup> M5O <sup>r</sup> Psi <sup>r</sup> Dec <sup>r</sup>	18.0
	Guanosina	Dos mutantes, uno convierte la glucosa en XMP, el otro la XMP en GMP	16.0
<i>B. ammoniagenes</i>	GMP	Mutante	2.5
<i>B. megaterium</i>	AICAR		16.0

Abreviaturas: r, resistente; 8AG, 8-azaguanina; 6MG, 6-mercaptopguanina; 6MTP, 6-metiltiopurina; MSO, metionina sulfoxido; Psi, psicofuramina; 6TG, 6-tioguanina; Dec, decoymina.

Abreviaturas auxotrofas: Ade, adenina; Dea, adenina; Gua, guanina; His, histidina; Red, GMP reductasa; Tyr, tirosina.

**Tabla 9.4.** Precios de los aceites vegetales refinados (1987). Reproducido con permiso de *Enzyme and Microbial Technology*, 1987

<i>Aceite vegetal</i>	(£/Tm)
<b>Aceites comunes</b>	
Cacahuete	540
Soja	270
Colza	880
Girasol	300
Algodón	400
Coco	270
Nuez de palma	220
Linaza	500
Maíz	350
Palma	230
Oliva	1 170
<b>Aceites especiales</b>	
Ricino	1 170
Manteca de cacao	3 000
Jojoba	10 000
Primavera	35 000

mentación, se recupera la riboflavina, presente tanto en solución como ligada al micelio, con rendimientos de 7-8 g l<sup>-1</sup>. Existe una fuerte competencia entre los procesos químicos y microbiológicos y la investigación se dirige hacia el desarrollo de cepas de *Bacillus subtilis* que superproduzcan y excreten riboflavina. Se espera que la aplicación de las técnicas de DNA recombinante de lugar a la construcción de cepas de *B. subtilis* capaces de producir riboflavina con un rendimiento suficiente para hacer el proceso comercialmente viable.

### Grasas y aceites

Con frecuencia se ha argumentado que la fermentación puede ofrecer una ruta práctica para la producción de grasas y aceites, particularmente en Europa, que importa la gran mayoría de estos productos. Basándose en la suposición de que con 5-6 Tm de trigo se puede producir 1 Tm de lípido, se calcula que utilizando una ruta de fermentación eficaz para la producción lipídica se

podría conseguir un costo de manufactura de 2.500-3.000 £ por Tm de lípido. Como estos precios no son competitivos con los de los aceites vegetales refinados (Tabla 9.4), las rutas de fermentación industrial para la producción de lípidos a partir de carbohidratos no representan una opción viable y la tecnología microbiana únicamente tiene oportunidad en la producción de aceites especiales.

### PRODUCCION DE ACIDO $\gamma$ -LINOLENICO

El ácido  $\gamma$ -linolénico se utiliza como suplemento dietético y como precursor en la síntesis de las prostaglandinas. El aceite de primavera, que contiene hasta un 7 % de ácido  $\gamma$ -linolénico, es una fuente de este lípido. Algunos mohos del orden de los Mucorales, como *Cunninghamella elegans* y *Mortierella isabellia* producen del 3 al 5 % de su biomasa como ácido linolénico. Recientemente John E. Sturge (Inglaterra) anunció el inicio de la producción comercial de ácido linolénico mediante fermentación. La fermentación, con especies *Mucor*, se lleva a cabo en fermentadores agitados de 220 m<sup>3</sup> de capacidad y utiliza glucosa pura como substrato mayoritario. El aceite refinado se recupera mediante extracción de las células con solventes.

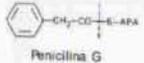
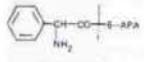
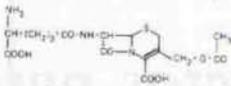
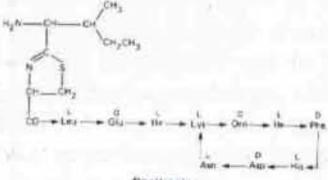
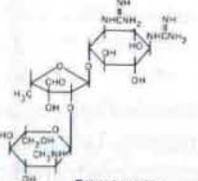
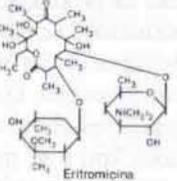
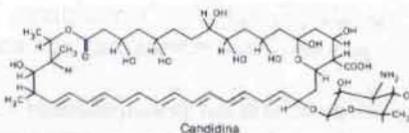
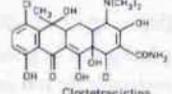
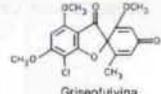
## Capítulo 10

### *Productos para uso médico*

#### Antibióticos

Los antibióticos son metabolitos secundarios que inhiben los procesos de crecimiento de otros organismos. La observación de Alexander Fleming en 1929 de que los *Penicillium notatum* inhibían el crecimiento de los estafilococos condujo al desarrollo del proceso de producción de la penicilina, iniciándose la era de los antibióticos. En la actualidad se conocen más de 6.000 sustancias con actividad antibiótica, produciéndose por fermentación industrial aproximadamente unos 100 tipos de antibióticos, en tanto que casi 50 compuestos semisintéticos tienen también aplicaciones clínicas. La producción mundial anual de antibióticos supera las 100.000 Tm, y su mercado se estima en unos 5 billones de dólares. Los antibióticos más ampliamente comercializados son las  $\beta$ -lactamas (penicilinas y cefalosporinas) y las tetraciclinas. Los antibióticos microbianos cloranfenicol y pirronitrina se fabrican actualmente mediante síntesis químicas, más baratas.

Los antibióticos se utilizan principalmente como agentes antimicrobianos en la terapia de enfermedades infecciosas humanas, aunque también tienen otras aplicaciones, por ejemplo, como agentes citotóxicos frente a ciertos tumores, en medicina veterinaria y en patología vegetal, como conservantes alimentarios y como estimulantes del crecimiento de los animales. En la Figura 10.1 se muestran una serie de ejemplos seleccionados de algunos antibióticos importantes

Grupos de antibióticos	Ejemplo	Organismo productor	Espectro de actividad <sup>1</sup>	Estructura <sup>2</sup>	Otros comentarios
β-Lactama	Penicilina G	<i>Penicillium chrysogenum</i>	G <sup>+</sup>		Baja toxicidad, lábil frente a los ácidos, sensible a la β-lactamasa
	Ampicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	G <sup>+</sup> G <sup>-</sup>		Sensible a la β-lactamasa, estable a los ácidos
	Cefalosporina C	<i>Cephalosporium acremonium</i>	G <sup>+</sup> G <sup>-</sup>		Baja toxicidad, resistente a la penicilinas aunque inactivada por las β-lactamasas producidas por algunas bacterias G <sup>-</sup> .
Péptido	Bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i>	G <sup>+</sup> G <sup>-</sup>		Uso limitado a aplicaciones tópicas debido a su toxicidad
Aminoglicósido	Estreptomina	<i>Streptomyces griseus</i>	G <sup>-</sup>		Utilizado principalmente para tratar la tuberculosis
Macrólido	Eritromicina	<i>Streptomyces griseus</i>	G <sup>+</sup>		Particularmente eficaz frente a los <i>Staphylococcus</i> y difteroides. Baja toxicidad
Polieno macrólido	Candidina	<i>Streptomyces viridiflavus</i>	F		Ampliamente utilizada para aplicaciones tópicas y antifúngicas
Tetraciclina	Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	G <sup>+</sup> G <sup>-</sup>		
Aromático	Griseofulvina	<i>Penicillium patulum</i>	F		

1. G<sup>+</sup>: Gram-positivas; G<sup>-</sup>: Gram-negativas; F, hongos.  
2. 6-APA: ácido 6-aminopenicilánico.

producidos por fermentación para uso farmacéutico. Muchos de los ejemplos se refieren a un miembro de una familia de antibióticos relacionados.

PENICILINAS

La estructura básica de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) formado por la fusión de un anillo de tiazolidina con otro de β-lactama (Fig. 10.2). La posición 6-amino puede tener una gran variedad de sustituyentes acilo. En ausencia de precursores de cadenas laterales en el medio de fermentación, se produce una mezcla de penicilinas naturales, aunque solamente la benzilpenicilina (Pen G) y la fenoximetilpenicilina (Pen V) son importantes terapéuticamente; ambas tienen un espectro similar (las bacterias Gram positivas) pero la Pen G es lábil frente a los ácidos, por lo que debe ser administrada por vía parenteral, en tanto que la Pen V es estable frente a los ácidos y puede administrarse por vía oral. Aunque la Pen G se produce de forma natural, se consigue mejor control con el proceso de fermentación, obteniéndose rendimientos mayores y con un procesado posterior más simple adicionando al medio el precursor ácido fenoxiacético. Cuando se incorporan al medio precursores de los ácidos fenoxiacético y alilmercaptoacético se obtiene fenoximetil penicilina (Pen V) y alilmercaptometilpenicilina (Pen O), menos alérgica. También pueden obtenerse derivados de penicilina, con mayor estabilidad y actividad antimicro-

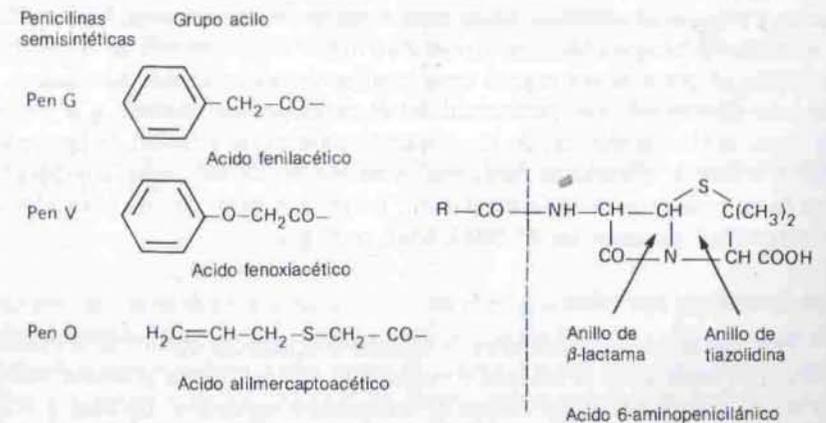


Fig. 10.2. Estructura del ácido 6-aminopenicilánico y grupos acilo de algunas penicilinas semisintéticas.

biana, mediante procesos semisintéticos a partir de la hidrólisis química o enzimática de la Pen G a 6-APA.

#### Ruta biosintética de la penicilina

La  $\beta$ -lactama tiazolidina se sintetiza a partir de L- $\alpha$ -aminoadipato, L-cistina y L-valina mediante la formación y ciclación de un péptido para producir el ácido isopenicilámico, que por transacetilación da lugar a bencilpenicilina. La lisina y la penicilina comparten una ruta anabólica común a ácido L- $\alpha$ -aminoadípico, y la primera inhibe la síntesis de la segunda. En la Figura 10.3 se muestra la ruta metabólica seguida, así como algunos de los posibles mecanismos reguladores que intervienen en la producción de la bencilpenicilina. Además, la glucosa produce la represión por el catabolito de la biosíntesis de la penicilina y ésta parece regular su propia síntesis. La producción de penicilina también se ve influenciada por la concentración de fosfato.

#### Desarrollo de las cepas

Los rendimientos iniciales obtenidos por Fleming con las cepas de *P. notatum* fueron de 2 Unidades Internacionales/ml, esto es, 1,2 mg/l. El aislamiento en 1943 de *D. chrysogenum* NRRL-1951, una cepa más adecuada para el cultivo sumergido que la cepa original de *P. notatum*, permitió un rendimiento de 120 UI/ml. La mutación de esta cepa dio lugar a la famosa cepa Wisconsin Wis A176, cuyo rendimiento era de 900 UI/ml. Las técnicas de mutación/selección basadas en el empleo de Rayos-X, radiación UV de onda corta y mutágenos químicos, como metil-bis-( $\beta$ -cloroetil)amina, nitrosoguanidina, agentes alquilantes y nitritos, se utilizaron hasta comienzos de los años setenta. Los estudios con mutantes bloqueados condujeron a un mayor conocimiento de la ruta biosintética, lo que a su vez sugirió unas técnicas de selección más adecuadas. El descubrimiento del ciclo parasexual del *P. chrysogenum* condujo a la mejora de cepas mediante técnicas de reproducción parasexual y fusión de protoplastas. A través de programas continuados de mejora de las cepas, combinados con la optimización de la fermentación, los rendimientos típicos obtenidos en la actualidad alcanzan las 85.000 UI/ml, o 50 g/l.

#### Producción de penicilina

Para lograr rendimientos altos de penicilina es esencial optimizar la concentración de esporas en el inóculo y también el que se formen gránulos sueltos en vez de compactos en las etapas de crecimiento vegetativo. En unas 6 horas aproximadamente se duplica la biomasa. La estabilidad de la cepa crea problemas por lo que debe mantenerse muy cuidadosamente. Las condiciones de pro-

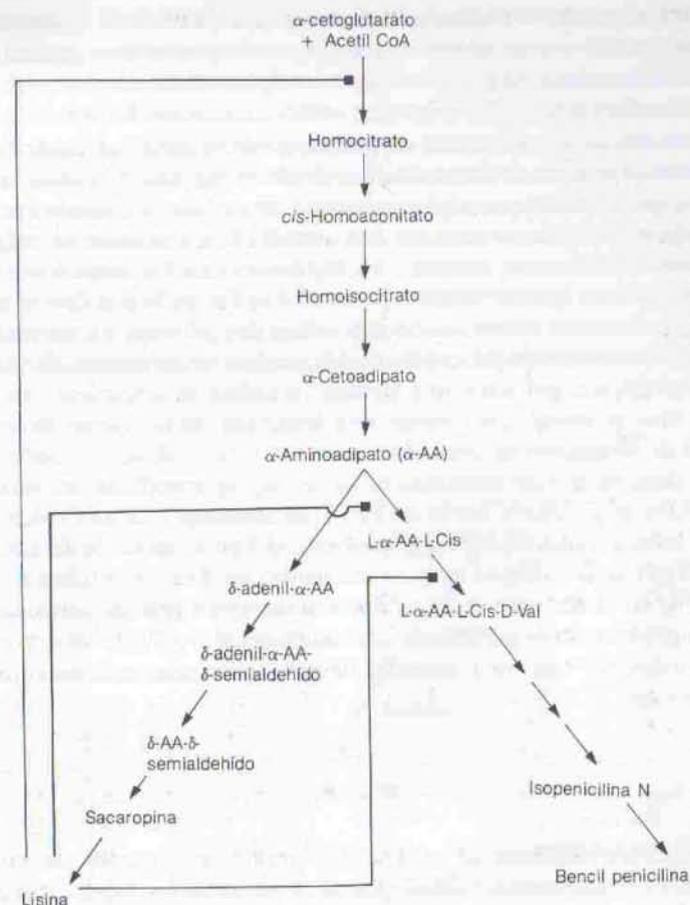


Fig. 10.3. Ruta biosintética de la penicilina que indica los posibles puntos de regulación por la lisina.

ducción típicas de la penicilina consisten en el empleo de procesos de fermentación alimentados de forma discontinua con un medio que contiene extractos de maíz, amoníaco, sales y una fuente de carbono como glucosa, lactosa o melazas. La mayoría de los procesos de fermentación incluyen extracto de maíz como fuente de nitrógeno orgánico porque al contener precursores de cadenas laterales mejora el rendimiento de la penicilina, si bien la introducción en el medio de precursores específicos de cadenas laterales permite sustituirlo por otras

fuentes de nitrógeno. El mantenimiento continuo de amoníaco en el medio mejora la respiración y evita la lisis miceliana y es importante en general para la síntesis de la penicilina. El pH se mantiene a 6,5, introduciéndose continuamente ácido fenilacético o ácido fenoxiacético como precursores. La velocidad de utilización del azúcar y la velocidad de suministro de oxígeno son parámetros importantes en el proceso de fermentación, siendo la segunda especialmente crítica, puesto que el incremento de la viscosidad del cultivo dificulta la transferencia de oxígeno. El proceso requiere una velocidad de absorción de oxígeno de 0,4-1,0 mmol por litro por minuto y un RQ (moles de  $\text{CO}_2$  formados/moles de  $\text{O}_2$  consumidos) de aproximadamente 0,95. En la Figura 10.4 se ilustra un ejemplo de un proceso de fermentación que refleja los patrones de utilización del sustrato y de formación del producto. Un proceso de fermentación industrial típico se caracteriza por tener una elevada velocidad de crecimiento en los dos primeros días, mientras que después esta velocidad disminuye en tanto que la velocidad de formación de penicilina aumenta y la producción continúa de 6 a 8 días, siempre que se mantenga la alimentación apropiada del sustrato.

El 6-APA se obtiene a partir de Pen G al atravesar ésta una columna con penicilin acilasa inmovilizada, que convierte la Pen G en ácido fenilacético y 6-APA. El pH de la columna se mantiene neutro mediante la adición de NaOH y el 6-APA, en el eluyente de la columna se recupera por precipitación a pH 4,0. En la producción de penicilinas semisintéticas, el 6-APA resultante es acilado químicamente con una cadena lateral apropiada mediante métodos convencionales.

#### TETRACICLINAS

La estructura básica de las tetraciclinas consiste en un anillo de naftaceno (véase Fig. 10.1). Las tetraciclinas clínicamente importantes, producidas por fermentación o semisíntesis, difieren en los sustituyentes específicos del anillo. La clorotetraciclina y la oxitetraciclina son las principales tetraciclinas producidas por *Streptomyces* mientras que la tetraciclina se forma normalmente en cantidades más pequeñas. Los *Streptomyces aureofaciens*, mutados para bloquear la reacción de cloración, excretan tetraciclina como producto mayoritario.

#### Ruta de biosíntesis de la tetraciclina

La síntesis de la clorotetraciclina sigue una compleja ruta metabólica, con 72 intermediarios y que implica más de 300 genes. Las etapas iniciales consisten en la formación de malonamoyl CoA ligado al complejo enzimático antraceno sintetasa. El malonamoyl CoA se condensa con 8 moléculas de malonil CoA

y se cicla con la eventual formación de clorotetraciclina. Las cepas que producen rendimientos elevados de tetraciclina se caracterizan por una menor velocidad de glicolisis, y la producción de clorotetraciclina puede estimularse mediante el empleo de benciltiocinato inhibidor de la glicolisis. En estas condiciones la actividad del ciclo de las pentosas fosfato aumenta. El enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de la clorotetraciclina parece ser la anhidrotetraciclina oxidasa, penúltimo enzima de la ruta biosintética, cuya actividad es proporcional a la velocidad de síntesis del antibiótico. Los iones fosfato inhiben la síntesis de este enzima, en tanto que el bencil tiocianato la estimula; también existe una relación inversa entre la concentración de adenilatos y su actividad, de forma que los niveles de ATP o de adenilato parecen actuar como efectores metabólicos en la regulación por el catabolito de la biosíntesis de tetraciclina.

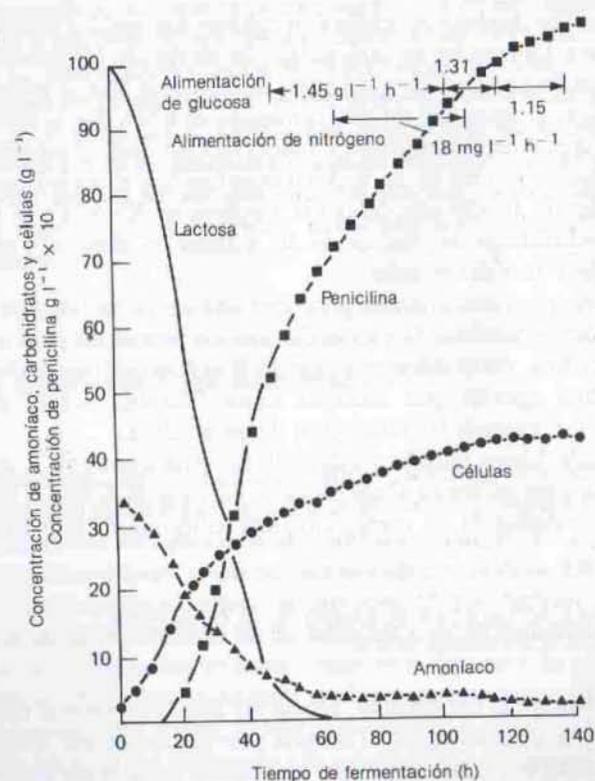


Fig. 10.4. Evolución con el tiempo de la fermentación de la penicilina (reproducido con permiso de Queener y Swartz, 1979).

*Producción de clorotetraciclina*

Actualmente los rendimientos industriales de tetraciclinas son de unos 20.000  $\mu\text{g/ml}^{-1}$ . Debido a la complejidad de la ruta biosintética, la mejora del rendimiento de las cepas ha dependido única y exclusivamente de técnicas de mutación/selección. La selección de cepas resistentes al antibiótico producido es otro método que ha sido aplicado para mejorar la capacidad de producción. El medio de fermentación típico contiene sacarosa, extracto de maíz, fosfato amónico y sales minerales con un pH comprendido entre 5,8 y 6,0 y una temperatura de 28 °C. Se necesitan velocidades de aireación elevadas, particularmente en las etapas de crecimiento de la biomasa. Cuando se utilice glucosa, se debe emplear un sistema de alimentación continua. Debido a la represión por el fosfato, las fermentaciones de tetraciclina deben llevarse a cabo en un medio con un contenido de fosfato limitado.

La producción de clorotetraciclina en cultivos sumergidos puede subdividirse en tres fases. La primera se caracteriza por un rápido incremento de la biomasa y un rápido consumo de nutrientes; durante esta fase, el micelio contiene hifas basofílicas gruesas con un alto contenido en RNA. En la segunda fase la velocidad de crecimiento disminuye y a veces incluso cesa, observándose velocidades máximas de síntesis de antibiótico mientras que el organismo se diferencia; los filamentos hifales son delgados y pobres en RNA. En la tercera fase, se observan velocidades de producción del antibiótico menores y se produce la fragmentación y lisis del micelio.

Los *Streptomyces aureofaciens* producen una cierta cantidad de tetraciclina además de clorotetraciclina. Los iones cloruro son necesarios para la formación de clorotetraciclina, particularmente cuando se utilizan mutantes altamente productores. Otros agentes que incluyen iones fluoruro, cobre, metionina y 5-fluorouracilo suprimen la producción de tetraciclina.

La condición básica para la producción de tetraciclina con *S. aureofaciens* es que el medio sea pobre en iones cloruro. La oxitetraciclina la producen los *Streptomyces rimosus* en un medio cuyo contenido de fosfato esté limitado.

#### INVESTIGACIONES ACTUALES EN EL CAMPO DE LA OBTENCION DE ANTIBIOTICOS POR FERMENTACION

La nueva  $\beta$ -lactama tienamicina, producida por *Streptomyces cattleya* y descubierta en 1976, tiene un espectro inusual y ampliamente útil frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, y no resulta atacada por las  $\beta$ -lactamasas producidas por cepas resistentes a muchas penicilinas y cefalosporinas.

Debido al gran número de genes implicados en la biosíntesis de un antibiótico, el intentar aplicar la tecnología del DNA recombinante al desarrollo de

cepas productoras de antibióticos es extremadamente complejo. El objetivo principal a la hora de aplicar estas modernas técnicas a estos fines es el de incrementar la velocidad de la etapa(s) biosintética limitante de la velocidad, posiblemente incrementando el número de copias del gen. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la posible regulación transcripcional o translacional o por el nivel del sustrato, así como el proceso de secreción de producto. Actualmente se están aplicando técnicas de DNA recombinante a especies de *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Penicillin* y *Cephalosporium* y se espera que conduzcan rápidamente a la manipulación de rutas de metabolitos secundarios, vía aislamiento, secuenciación, amplificación y mutagénesis *in vitro* de los genes. El conocimiento de los loci genéticos para controlar la ruta biosintética es de máxima importancia para la explotación de las técnicas de DNA de fusión de protoplastas y para clonado de genes con ayuda de plásmidos.

Se ha desarrollado un sistema de transformación de las *Cephalosporium* y se ha clonado el gen de la ciclasa de los *C. acremonium*. El clonado de los genes restantes de *C. acremonium* y de los de la ruta biosintética de la  $\beta$ -lactama de los *P. chrysogenum* puede permitir la desregulación substancial de las etapas terminales. Estos organismos también han demostrado ser buenos huéspedes para la introducción de los genes de especies de *Streptomyces* que producen antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Se cree que estos antibióticos, al tener una mayor absorción oral y un espectro más amplio, dominarán la industria de los antibióticos en el futuro.

#### Obtención de esteroides por fermentación

Existen una gran variedad de compuestos esteroides producidos mediante rutas que necesitan una o más etapas biosintéticas. En la Figura 10.5 se muestra la estructura química de algunos de los compuestos empleados en el tratamiento de muchas enfermedades así como las reacciones catalíticas. En los años cuarenta los corticosteroides naturales, la cortisona (2) y el cortisol (hidrocortisona) (10) se emplearon con éxito en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y alérgicas, examinándose diversos compuestos derivados de animales y plantas como potencial materia prima para la síntesis de esta nueva clase de productos. El colesterol (1) era químicamente inapropiado y pronto fue evidente que la diosgenina (3) (raíz del barbasco) y el estigmasterol (4) (aceite de soja) eran materias primas potenciales para la síntesis de progesterona y pregnenolona, respectivamente.

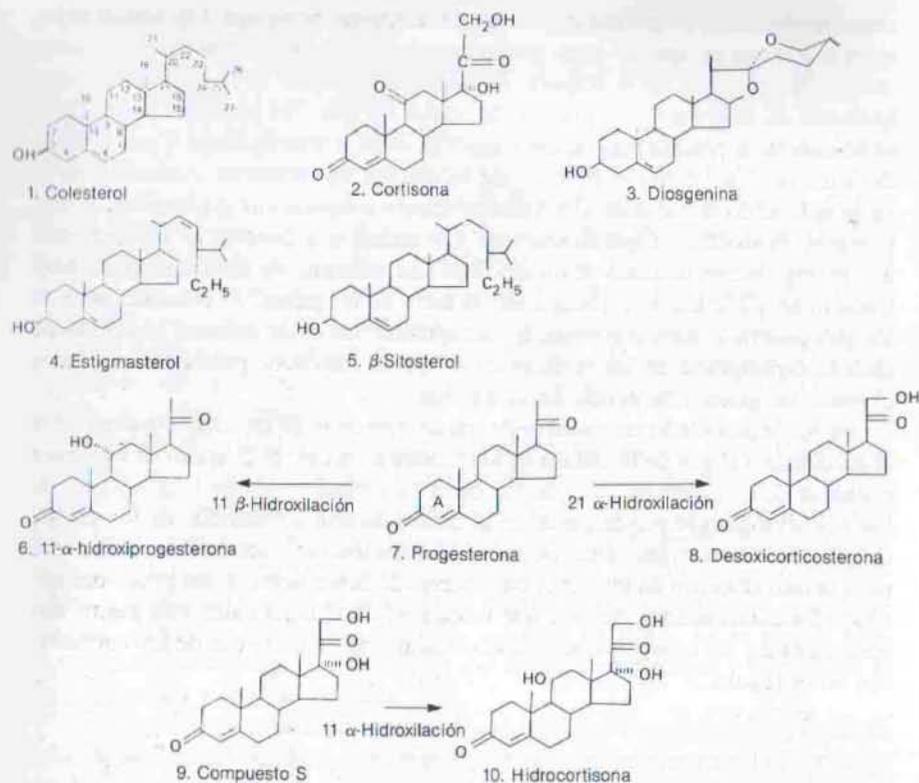


Fig. 10.5. Estructuras químicas de algunos esteroides y ejemplos de algunas reacciones de biotransformación claves.

La pregnenolona se transforma químicamente de una forma fácil en progesterona (7), que tiene la configuración característica, el anillo A, de los corticosteroides. La introducción de un hidroxilo en la posición 21 del anillo de progesterona da lugar a la desoxicorticosterona (8), un corticosteroide natural. La producción de cortisona y de hidrocortisona necesita todavía la introducción de un grupo 17  $\alpha$ -hidroxi y un grupo 11-hidroxi o un grupo 11-ceto. El grupo 17  $\alpha$ -hidroxi puede ser introducido químicamente y microbiológicamente aunque en la actualidad se emplean rutas químicas. Murray y Peterson llevaron a cabo un mayor avance cuando en 1952 descubrieron un proceso para la bioconversión de progesterona en 11  $\alpha$ -hidroxiprogesterona (6), utilizando *Rhizopus arrhizus*. Posteriormente, se caracterizaron un amplio rango de reacciones de bioconversión específicas para las diversas posiciones de las moléculas de esteroides. Las

biotransformaciones de los esteroides de mayor importancia práctica son las 11-hidroxiaciones, las 16  $\alpha$ -hidroxiaciones y la 1-deshidrogenación.

#### PROCESOS DE BIOTRANSFORMACION

En los procesos de biotransformación de esteroides, los organismos que contienen el enzima(s) necesario se producen mediante procesos de fermentación sumergidos convencionales bajo condiciones que inducen la síntesis del enzima. Cuando se ha producido el crecimiento y se ha obtenido el enzima, se añade un sustrato esteroide insoluble en agua, en forma de pasta o disuelto en un solvente orgánico, y se produce la bioconversión. Una vez completada ésta, particularmente en las fermentaciones más desarrolladas, que utilizan niveles de esteroide elevados, la mayor parte del producto se recupera mediante filtración con la fracción de biomasa y se separa por extracción con solventes orgánicos.

Los *Rhizopus nigricans* y los *Aspergillus ochraceus* se utilizan comercialmente para la 11  $\alpha$ -hidroxiación de los esteroides. La  $\alpha$ -hidroxilasa se induce en la fermentación por la presencia de progesterona, aunque aparece también una 6  $\beta$ -hidroxilasa indeseable, por lo que las condiciones de la fermentación se diseñan de tal forma que se minimice la producción de este último enzima.

Los microorganismos empleados más comúnmente para la 11- $\beta$ -hidroxiación de los esteroides son *Curvularia lunata* y *Cunninghamella blakesleana*. La 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-pregn-4-eno-3,20-diona (compuesto S) (9) es el sustrato utilizado para producir hidrocortisona (10), formándose también otros subproductos. El compuesto S y otros sustratos inducen al enzima.

Muchos microorganismos pueden catalizar la reacción de 1-deshidrogenación de los esteroides. La hidrocortisona es un sustrato típico para la producción de prednisolona. La 1-deshidrogenasa es inducible en los organismos investigados, pero en un organismo bien estudiado, *Septomyxa sp.*, la cortisona y la hidrocortisona no son inductores mientras que la progesterona y la BNA (3-cetobisnor-4-colen-22-al) son buenos inductores. La inducción se produce únicamente cuando la glucosa se ha agotado.

#### TENDENCIAS EN LA INVESTIGACION SOBRE LA TRANSFORMACION DE ESTEROIDES

Recientemente, las investigaciones sobre la degradación microbiana de cadenas laterales en esteroides muy fácilmente disponibles tales como el colesterol (de la lana) y el  $\beta$ -sitosterol (5) (del aceite de soja) para producir esteroides útiles está siendo objeto de mucha atención. La degradación de los anillos del es-

teroiide parece producirse, en muchos ejemplos, mucho más rápidamente que la ruptura de las cadenas laterales, habiéndose desarrollado métodos que inhiben esta degradación del anillo.

La adición química de un átomo de flúor en la posición  $9\alpha$  a algunos corticosteroides mejora mucho su actividad antiinflamatoria aunque también incrementa de forma no deseada la retención de sal por el organismo. Este efecto lateral puede reducirse por  $16\alpha$ -hidroxilación microbiana. Con *S. argenteolus* pueden conseguirse unas conversiones de aproximadamente el 50 %, acompañadas de la formación de subproductos  $2\beta$ -hidroxi, que puede minimizarse mediante una selección particular de mutantes.

Tradicionalmente la bioconversión de los esteroides se lleva a cabo mediante tecnología de fermentación convencional seguida por una reacción de biotransformación. El empleo de células secas con acetona de *Arthrobacter simplex* para la 1-deshidrogenación de la  $9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -hidroxycortisona disminuye mucho el nivel de 20-cetorreductasa y la formación de subproductos indeseables. Es necesario añadir un aceptor de electrones artificial, la menadiona, a la mezcla de reacción. La hidrocortisona se transforma en prednisolona cuando el substrato, disuelto en etanol y fenacina metasulfato, atraviesa una columna que contiene el enzima 1-deshidrogenasa inmovilizado. El empleo de células o enzimas en solventes orgánicos, en los que son solubles el esteroide y los productos, ofrece la posibilidad de utilizar concentraciones de substrato mucho más elevadas en las bioconversiones. El empleo de células enteras de *Corynebacterium simplex* en lugar de enzimas inmovilizados aislados puede eliminar la necesidad de añadir un aceptor de electrones y reduce la cantidad de enzima perdido durante la inmovilización.

Las esporas resuspendidas recuperadas de *Septomyxa affinis*, obtenidas por crecimiento en un medio sólido o líquido, pueden deshidrogenar en posición 1 diversos tipos de esteroides. Las esporas de *Aspergillus ochraceus* se han utilizado para convertir la progesterona en  $11\alpha$ -hidroxiprogesterona. Los *Rhizopus nigricans*, inmovilizados en geles de alginato o agar, pero no en geles de poliácridamida, pueden  $\alpha$ -hidroxilar la progesterona. También se ha demostrado la  $11\beta$ -hidroxilación del compuesto S con *C. lunata* inmovilizada en geles de poliácridamida entrecruzados.

### Alcaloides del cornezuelo

Los alcaloides del cornezuelo tienen una amplia variedad de usos terapéuticos, por ejemplo, el tratamiento de la migraña y otros dolores de cabeza de ori-

gen vascular, la atonía uterina, trastornos circulatorios, hipertensión y Parkinson. Actualmente se conocen más de 40 alcaloides del cornezuelo producidos por diversas cepas del ascomiceto parásito *Claviceps*. La estructura consiste en ácido *d*-lisérgico (o su estereoisómero ácido *d*-isolisérgico) unido a un péptido tricíclico o un aminoalcohol por un enlace amida. En la Figura 10.6 se muestran las estructuras de algunos de los alcaloides naturales del cornezuelo.

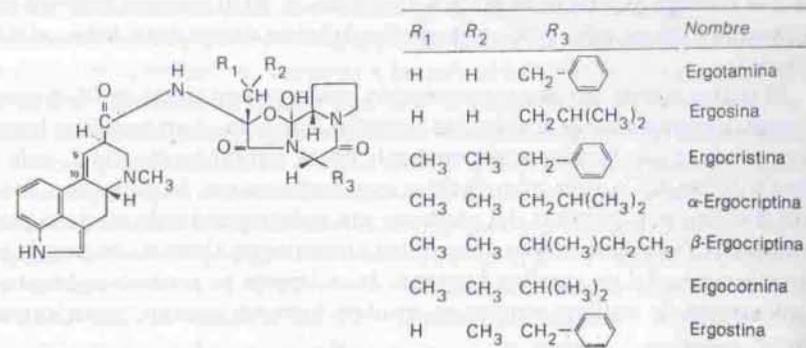


Fig. 10.6. Estructuras de los alcaloides naturales del cornezuelo.

Es posible llevar a cabo la síntesis química total de los alcaloides del cornezuelo del centeno, aunque actualmente no es rentable económicamente. Tradicionalmente los alcaloides del cornezuelo se obtenían por infección mecánica de las inflorescencias del centeno con *Claviceps* y la posterior recolección y extracción del esclerocio. El proceso era por tanto estacional y dependiente de la situación meteorológica.

Para la producción de alcaloides por fermentación se emplean principalmente 3 especies de *Claviceps*, *C. paspali*, *C. fusiformis* y *C. purpurea*. Mientras que la cepa original de *C. paspali* producía únicamente  $20 \mu\text{g l}^{-1}$  de alcaloides, el desarrollo de nuevas cepas y la optimización del medio dieron lugar a rendimientos superiores a  $5 \text{ g l}^{-1}$ . La composición del alcaloide viene determinada por la combinación de las cepas y las condiciones del cultivo. Las velocidades altas de formación de alcaloide parecen estar unidas a la capacidad del organismo para metabolizar simultáneamente concentraciones elevadas de sacarosa y citrato en un medio deficiente en fosfato. La síntesis procede de forma paralela con el anabolismo de los lípidos y los esteroides. Las cepas productivas son sensibles a las fuerzas de cizalla, necesitan mucho oxígeno y son inestables.

### Productos microbianos obtenidos con tecnología de DNA recombinante

El *Escherichia coli* ha sido el organismo de elección como huésped para la formación de productos con la tecnología de DNA recombinante debido a que el sistema genético de este organismo está bien caracterizado. Esto ha dado lugar a la consecución de altos niveles de expresión. El organismo también crece fácilmente a velocidades altas en un medio definido dando densidades celulares elevadas.

El primer agente terapéutico producido mediante tecnología de DNA recombinante que consiguió la aprobación legal fue la insulina humana. Esta hormona se produce por fermentación mediante cepas recombinantes de *E. coli*. Según Eli Lilly & Co., que manufactura esta hormona por fermentación, las estructuras físicas y químicas del producto son indistinguibles de las de la insulina humana. Novo Industri ha desarrollado tecnologías alternativas para la producción comercial de insulina humana. Inicialmente su proceso se basaba en la conversión de insulina porcina en insulina humana, aunque posteriormente

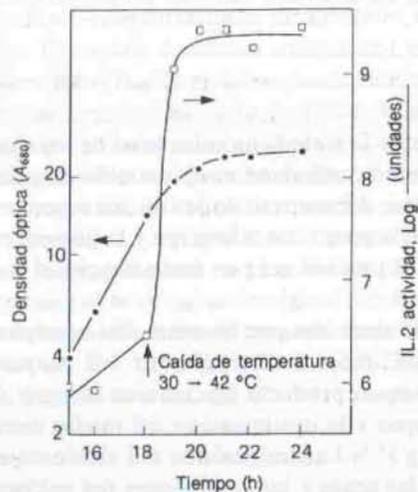


Fig. 10.7. Producción de interleukina-2 (IL-2) por *Escherichia coli* K-12 que contiene un plásmido que codifica para la IL-2 bajo control de un promotor sensible a la temperatura. A 30 °C la propagación bacteriana se ve favorecida pero la síntesis de IL-2 se ve frenada. La síntesis rápida de IL-2 se induce a una temperatura de 42 °C (reproducido con permiso de Bauer. Véase Khosrovi y Gray, 1985).

la insulina humana se produjo por fermentación mediante cepas de levaduras recombinantes. La hormona del crecimiento humana producida por *E. coli* recombinante se comercializa para el tratamiento del enanismo hipofisario. La interleukina-2 (IL-2) o factor de crecimiento de los linfocitos es otro producto de la tecnología de DNA recombinante producido por *E. coli*. Se ha indicado que la IL-2 estimula a las células T del cuerpo a atacar y disminuir el tamaño de los tumores localizados. En la Figura 10.7 se muestra el esquema de un proceso de fermentación para la producción de IL-2 recombinante.

Los interferones son proteínas sintetizadas por la mayoría de las células de los animales superiores en respuesta a las infecciones virales. Su producción por las células infectadas sirve para interferir la propagación de la infección a las células sanas. Los interferones también actúan como agentes antitumorales para ciertos tipos de cáncer. La enorme escasez de interferones humanos purificados ha impedido los ensayos clínicos acerca de su valor terapéutico. El  $\alpha$ -interferón, clonado con éxito en el *E. coli* se produjo comercialmente y ha sido empleado en una amplia gama de ensayos clínicos. Los interferones producidos por las bacterias en esta forma carecen del componente glicoproteico de los interferones nativos. También han sido clonados muchos otros compuestos en *E. coli*, incluyendo los  $\beta$ - y  $\gamma$ - interferones, así como diversos interferones animales, varias hormonas del crecimiento humanas y animales, el factor de crecimiento epidérmico y otros, linfocinas, la albúmina humana, el activador del plasminógeno y otros muchos enzimas.

*E. coli* no es un huésped ventajoso, puesto que generalmente no excreta las proteínas recombinantes y además las células pueden contener endotoxinas y lipopolisacáridos pirogénicos que deben ser eliminados durante la purificación. *Bacillus subtilis* es otro huésped que ha sido utilizado para la obtención de productos recombinantes; no es patógeno, crece en condiciones aerobias, no produce lipopolisacáridos y secreta las proteínas extracelulares directamente al medio. Cuando los genes han sido clonados de unas especies de *Bacillus* en otras se han observado niveles de expresión elevados. Sin embargo, a diferencia de *E. coli*, los niveles de expresión disminuyen varios órdenes de magnitud cuando se clonan los genes heterólogos dentro de *B. subtilis*. Las levaduras, debido a su empleo desde hace tiempo en las fermentaciones alimentarias, son aceptadas como organismos sanos, carentes de lipopolisacáridos pirogénicos y pueden secretar y glicosilar las proteínas recombinantes. Los niveles de expresión para las proteínas clonadas en las levaduras son menores que los descritos para *E. coli*. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido modificada mediante ingeniería genética para obtener productos comerciales como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, utilizable como vacuna y aprobado por la US Food and Drug Administration, la superóxido dismutasa, el factor de crecimiento epidérmico y una gran variedad de otros productos. Los sistemas de secreción han sido desarrollados con éxito para la producción de algunas proteínas recombinantes.

Los hongos filamentosos, como por ejemplo *Aspergillus niger* pueden producir hasta 20 g/l de enzima a partir de una única copia del gen de la glucoamilasa. Estos organismos pueden modificarse para que expresen y secreten proteínas de origen bacteriano o de mamíferos, y los procesos de secreción de los hongos y los mamíferos son muy semejantes. Los sistemas fúngicos pueden modificarse en principio para que se aproximen más al sistema de procesamiento de las proteínas de secreción que llevan a cabo las células de los mamíferos, aunque es necesario también conocer más a fondo las vías de glicosilación de los hongos. Estos organismos son muy prometedores como huéspedes para la síntesis de grandes cantidades de proteínas heterólogas de mamíferos.

## Vacunas

Existen diversos tipos de vacunas: células microbianas o virus muertos o vivos y productos extracelulares naturales o modificados, tales como toxinas, y fracciones subcelulares de células y virus. En el caso de las vacunas vivas, los organismos son capaces de replicarse en el receptor. La eficacia de la vacuna contra *Mycobacterium tuberculosis*, por ejemplo, depende de un cierto nivel de multiplicación en el cuerpo humano. La vacuna contra el virus de la polio viva es un segundo ejemplo. En estas vacunas vivas los microorganismos se han convertido en inoos por atenuación, tratamiento que esencialmente elimina la capacidad del organismo para provocar la enfermedad. Por otra parte, las vacunas vivas pueden producirse con bacterias o virus estrechamente relacionados con los organismos que producen la enfermedad y que no la causan, pero que pueden inducir inmunidad, como por ejemplo, la vacuna de la viruela. Las vacunas muertas son células enteras o componentes celulares, derivados generalmente de los agentes patógenos virulentos, inactivados mediante tratamiento químico. Los productos microbianos extracelulares, como las toxinas, pueden utilizarse como vacunas, una vez detoxificadas mediante tratamiento con reactivos químicos que destruyan sus propiedades tóxicas en tanto que dejan la actividad inmunogénica intacta.

### PRODUCCION DE VACUNAS

#### Células bacterianas

La mayoría de las vacunas bacterianas se obtienen mediante cultivos sumergidos en procesos discontinuos. Las bacterias *Bordetella pertussis* (tosferina) cre-

cen en un medio que contiene caseína hidrolizada por ácidos, minerales y factores de crecimiento. En la Figura 10.8 se muestra el perfil del proceso de fermentación. El riesgo de exposición de los operadores puede reducirse cosechando las células mediante precipitación ácida, puesto que cuando las células se encuentran en un medio ácido de pH 4,0 sedimentan rápidamente y pueden recogerse en un 3-5 % del volumen del cultivo. Las células se matan y detoxifican bien por calentamiento, por adición de etilmercuritosalicilato de sodio o con una combinación de ambos tratamientos, para obtener la vacuna de la tosferina. La *Salmonella typhi* y *Vibrio cholera*, utilizados para fabricar vacunas contra el tifus y el cólera respectivamente, se producen en medios que contienen nitrógeno complejo y glucosa, que se añade mientras dure el cultivo. El control del pH y la  $pO_2$  en el proceso de fermentación hacen que las células crezcan rápidamente con rendimientos elevados. En las Figuras 10.9 y 10.10 se ilustran los procesos de fermentación de *V. cholerae* y *S. typhi*, respectivamente. Para recuperar/inactivar los *S. typhi* se suspenden las células en acetona durante 24 horas a 37 °C y después de liofilizan. Otros ejemplos de bacterias inactivas son las vacunas del cólera y la peste, que contienen cepas inactivas de *Vibrio cholera* y *Yersinia pestis*, respectivamente. Las *Mycobacterium tuberculosis* (Vacuna BCG) crecen como una lámina coherente en la superficie del medio líquido, y se producen convencionalmente en recipientes de vidrio que contienen una capa de medio poco profunda. La biomasa se comprime en forma de torta densa y se prepara una suspensión celular agitando violentamente la película con bolas de acero. Los procesos de cultivo sumergido han sido el método elegido para

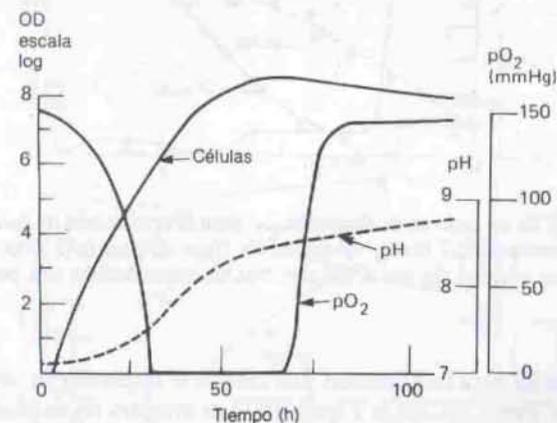


Fig. 10.8. Perfil de fermentación de la producción de biomasa por *Bordetella pertussis*. Volumen de cultivo, 7 l; aireación 0,2 /vvm; velocidad de agitación 450 rpm (reproducido con permiso de Van Hemert, 1974).

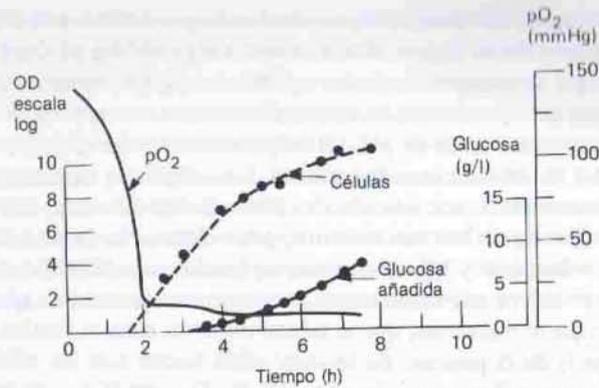


Fig. 10.9. Perfil de un proceso de fermentación con *Vibrio cholerae* con control de la  $pO_2$  a 15 mm de Hg y pH de 7,3 (reproducido con permiso de Van Hemert, 1974).

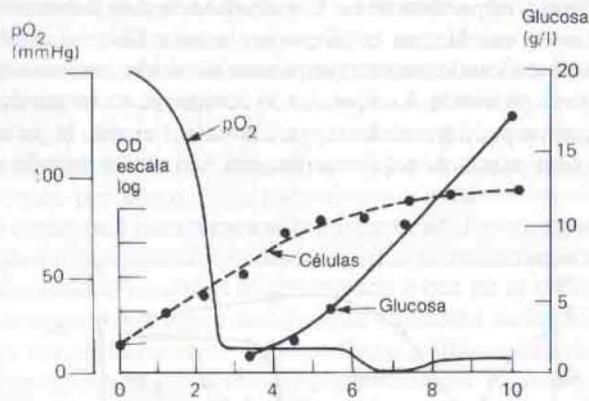


Fig. 10.10. Perfil de un proceso de fermentación para la producción de *Salmonella typhi*. Volumen de fermentación, 7 litros; velocidad de flujo de gas, 0,43 vvm; velocidad de agitación 450 rpm; control del pH a 7,6 con NaOH (reproducido con permiso de Van Hemert, 1974).

preparar el material para liofilización. Las células se dispersan en un medio complejo utilizando Tween 80. En la Figura 10.11 se muestra un esquema típico del proceso de fermentación. Como para la vacuna se necesitan células viables, el proceso de fermentación se ha diseñado de tal forma que las células puedan recuperarse y almacenarse manteniendo una viabilidad máxima.

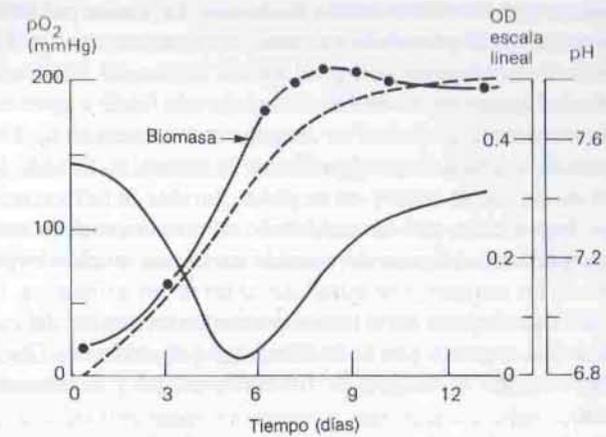


Fig. 10.11. Perfil de fermentación para la producción de células BCG (reproducido con permiso de Van Hemert, 1974).

#### Toxinas bacterianas

La vacuna formada por el toxoide de la difteria es producida y secretada por *Corynebacterium diphtheriae* en un medio complejo en cultivos sumergidos (Fig. 10.12). La concentración de hierro es importante para la producción

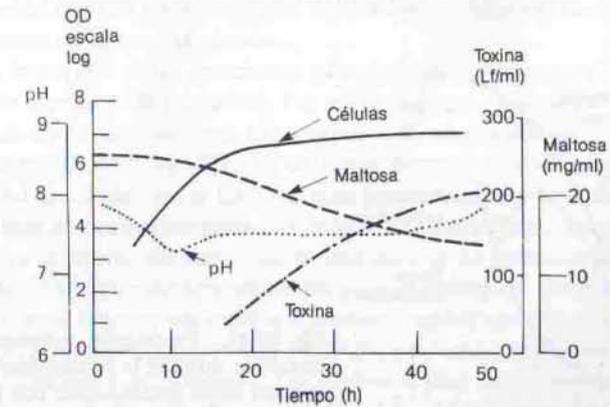


Fig. 10.12. Perfil de fermentación para la producción de la toxina de *Corynebacterium diphtheriae* (reproducido con permiso de Van Hemert, 1974).

de la toxina puesto que su exceso inhibe la síntesis. La toxina puede representar hasta el 75 % de todas las proteínas extracelulares secretadas. Los *Clostridium tetani* son anaerobios obligados que producen la toxina del tétanos. Su capacidad para producir esporas termoestables condujo a la OMS a apuntar una serie de precauciones específicas a tener en cuenta en su producción. En la Figura 10.13 se muestra el esquema de producción de la toxina, indicando las concentraciones relativas de toxina intra y extracelular durante la fermentación. La detoxificación se lleva a cabo con formaldehído en condiciones de reacción controladas. Las preparaciones brutas del toxoide contienen muchas impurezas, por lo que usualmente los antígenos se purifican antes de ser utilizados. Un método ampliamente utilizado se basa en el fraccionamiento secuencial del material con metanol a pH ácido, seguido por la liofilización del producto. Otros métodos de purificación incluyen la diálisis, la filtración en gel y la cromatografía en DEAE-celulosa.

#### Vacunas víricas

La producción de vacunas víricas para aplicación humana, bien vivas o muertas, se lleva a cabo usualmente en cultivos *in vitro* de células animales. Inicialmente se emplearon células (por ejemplo células obtenidas directamente del tejido normal y subcultivadas) o líneas celulares diploides en vez de líneas celulares aneuploides debido a sus supuestos riesgos de oncogenicidad. Sin embargo, para algunas vacunas utilizadas en veterinaria se emplean líneas celulares establecidas. La duración de la etapa de propagación viral depende de si las células huéspedes mueren o continúan replicándose después de la infección. La tecnología que emplea la proliferación viral en huevos fecundados de gallina todavía se utiliza, no obstante, para la producción de algunas vacunas.

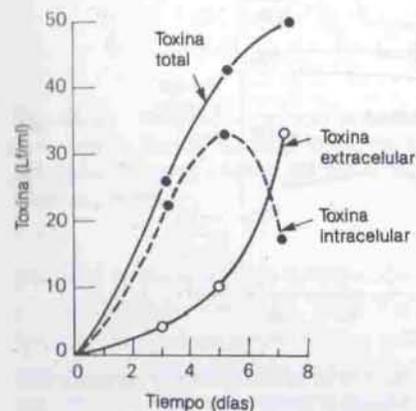


Fig. 10.13. Producción de toxina intra y extracelular durante la fermentación de *Clostridium tetani* (reproducido con permiso de Van Hemert, 1974).

La vacuna de poliovirus viva consiste en una mezcla de tres tipos de poliovirus atenuados propagados en cultivos de células de riñón de mono o en líneas celulares diploides humanas. En las vacunas inactivas los virus se tratan con formaldehído. Los virus inactivos de la rabia se producen por crecimiento en células diploides humanas. Las vacunas víricas vivas atenuadas se utilizan para conseguir la inmunización frente a la rubeola, sarampión, paperas y fiebre amarilla. Los virus de la rubeola se propagan en células diploides humanas en tanto que se utilizan cultivos de células embrionarias de pollo como soporte para la proliferación de los virus del sarampión, las paperas, la fiebre amarilla y la viruela.

A partir de virus propagados en huevos fecundados de gallina se han producido dos tipos de virus de la gripe inactivos. Los virus enteros muertos se inactivan por tratamiento con formaldehído o  $\beta$ -propiolactona. La ruptura de los virus se lleva a cabo mediante tratamiento con agentes tales como bromuro de cetiltrimetilamonio (CETAB), dodecilsulfato sódico y Triton X-100, acetato de butilo y etilo, y Tween 80 y tri-*n*-butil-fosfato.

#### Vacunas formadas por antígenos aislados

Las vacunas constituidas por células enteras contienen frecuentemente, además de los antígenos inmunogénicos deseados, compuestos tóxicos, que no pueden inactivarse fácilmente. Como las células enteras contienen el material genético completo del patógeno, si éste no se ha muerto o no se ha atenuado completamente, la vacuna por sí misma puede ser capaz de causar la enfermedad. También puede existir la posibilidad de que las cepas atenuadas puedan volver a ser virulentas. Otro problema con algunas vacunas es que a veces no inmunizan al receptor frente a todas las cepas del patógeno. Algunas también son inestables durante su almacenamiento.

Se han intentado aislar fracciones subcelulares que retengan la inmunogenicidad y que carezcan de toxicidad. Por ejemplo, una vacuna antitoxina acelular, utilizada en Japón, contiene los componentes claves del antígeno como una hemaglutinina filamentososa (FHA) y un factor promotor de la linfocitosis (LPF). La toxicidad asociada con el LPF ha sido inactivada con formalina. Esta preparación tiene un contenido reducido de la endotoxina lipopolisacárido. Las vacunas contra la neumonía consisten en una mezcla de polisacáridos capsulares purificados de 14 tipos de *Streptococcus pneumoniae*; cuya purificación se lleva a cabo mediante fraccionamiento con alcohol, centrifugación, tratamiento con detergentes catiónicos (por ejemplo CETAB), proteasas, nucleasas o carbón activo, ultrafiltración y liofilización. Los polisacáridos capsulares purificados de *Neisseria meningitidis*, serogrupos A y C, se emplean en las vacunas contra la meningitis.

### Desarrollo de vacunas mediante técnicas de DNA recombinante

La tecnología de DNA recombinante se emplea para desarrollar vacunas formadas por subunidades, habiéndose clonado los genes que codifican las porciones del antígeno de superficie de la hepatitis B; los antígenos de superficie aislados son eficaces como vacuna, y entre 1986 y 1987 se aprobó su empleo. También se ha desarrollado una vacuna recombinante que inmuniza frente a la viruela, y que es segura y barata. Además con esta técnica se han obtenido vacunas víricas frente a la gripe, la polio y el herpes. También han sido aislados antígenos proteicos de la superficie de los virus del SIDA (HIV, virus de la inmunodeficiencia humana), que inducen anticuerpos en los roedores. La demostración de que estos anticuerpos matan los virus fundamentó el camino para el desarrollo de vacunas mediante técnicas de DNA recombinante. La primera vacuna experimental frente al SIDA, basada en versiones recombinantes del antígeno del virus HIV producido mediante cultivo de células de insectos, fue aprobada para ensayo clínico en 1987 por la US Food and Drug Administration.

La primera vacuna obtenida mediante ingeniería genética fue la de la pseudorrabia, un virus del tipo herpes que infecta a los cerdos, y que fue introducida en 1986. También se han desarrollado otras vacunas veterinarias mediante técnicas de DNA recombinante. A medida que nuestro conocimiento acerca de las estructuras moleculares, que son las responsables de la inmunogenicidad, aumenta, se incrementa el desarrollo potencial de vacunas sintéticas seguras (por ejemplo utilizando cadenas cortas de aminoácidos que imitan los centros relevantes de una proteína que recubre al virus).

### Anticuerpos monoclonales

Cuando el cuerpo es invadido por una sustancia extraña, tal como un virus o una célula microbiana, algunas células blancas de la sangre, las denominadas linfocitos B, responden produciendo cientos de tipos de anticuerpos que se unen selectivamente al material invasor. Por tanto, las técnicas de inmunización se han utilizado como un medio de desarrollar resistencia natural a los organismos patógenos. Asimismo, los anticuerpos contenidos en antiseros, se han utilizado ampliamente en medicina para diagnosis y también en la terapia de algunas enfermedades humanas seleccionadas. En 1975, Kohler y Milstein desarrollaron la tecnología básica para la producción de anticuerpos monoclonales, preparaciones de anticuerpos específicos individuales producidos por células derivadas de un único antepasado o clon. Los anticuerpos monoclonales, al tener

una especificidad ligadora alta a un único centro (epitopo) en una molécula o en un antígeno de la superficie celular, son capaces de diferenciar entre antígenos relacionados que pueden diferir únicamente en ese único epitopo.

Los anticuerpos monoclonales se utilizan ampliamente en forma de kits en análisis clínicos para la detección de situaciones y enfermedades que van desde la gestación hasta el cáncer y han sido probados como marcadores de la enfermedad o de los daños producidos dentro del cuerpo (diagnóstico mediante imágenes). Quizás tengan aún mayor significado las potenciales aplicaciones de los anticuerpos monoclonales a nivel terapéutico. Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales comercializados se incluye un producto que bloquea el rechazo del riñón después de su trasplante y otro que elimina cualquier exceso potencialmente peligroso de la droga digitalina, administrada a pacientes con trastornos cardiovasculares. También tienen muchas aplicaciones fuera de la medicina. En 1987 el mercado de los anticuerpos monoclonales representó unos 300 millones de dólares, con más de 100 productos a la venta, y esperándose que alcance los mil millones de dólares en 1990, y cuando estos anticuerpos se empleen a nivel terapéutico, quizás a mitades de los noventa, los 7 mil millones de dólares anuales.

### DESARROLLO DE LOS HIBRIDOMAS

Los hibridomas son células capaces de producir anticuerpos monoclonales y de dividirse, y se obtienen por fusión de linfocitos B (capaces de producir anticuerpos) con células cancerosas (capaces de reproducirse). El mieloma compañero de la fusión confiere una capacidad de reproducción *in vitro* ilimitada.

Se incuba una línea celular madre mieloma, que carece del enzima hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) con células de bazo obteniéndose del animal una vez inmunizado con el antígeno deseado. La incorporación de polietilenglicol al medio de incubación promueve la fusión de las células, produciendo células híbridas. Las células se separan después de unos pocos minutos, se suspenden en un medio de cultivo que contiene suero fetal de ternera y se distribuyen en placas con pocillos. Se añaden al medio aminopterina e hipoxantina; el medio de post-fusión (HAT) también contiene timidina, que proporciona pirimidinas mediante la ruta de recuperación.

Las células de bazo normales no pueden proliferar en el medio de cultivo. De la misma forma, debido a la deficiencia de HPRT, las células de mieloma mueren en presencia de aminopterina, agente antifolato que bloquea la ruta alternativa de las células para la síntesis de nucleótidos. En consecuencia, únicamente las células fusionadas sobreviven y se desarrollan en colonias visibles. Los sobrenadantes de estas células de hibridoma se analizan para detectar la

presencia de anticuerpos monoclonales, que reaccionan con el antígeno inmunizante deseado, ensayándose cultivos seleccionados para la especificidad frente al anticuerpo. Los hibridomas productores de los anticuerpos se clonan y se almacenan en nitrógeno líquido.

#### PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Un clon particular de hibridoma puede inyectarse en ratones, en los que crece en el líquido ascítico de la cavidad peritoneal, a partir de la cual pueden recogerse fácilmente los anticuerpos. De esta forma puede producirse una concentración de anticuerpos superior a  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , y un ratón puede suministrar suficiente anticuerpo monoclonal como para preparar más de 20.000 kits para diagnóstico, puesto que para cada análisis se requieren únicamente cantidades minúsculas. En aplicaciones terapéuticas se necesitan cantidades mucho más elevadas y en consecuencia ha sido necesario evolucionar hacia la producción *in vitro* de anticuerpos monoclonales por métodos de fermentación. Por ejemplo una compañía, Charles River Biotechnical Services en USA, produjo en 1985 unos 3 kg de anticuerpos monoclonales en líquido ascítico de ratón. Considerando que la producción de 1 g de anticuerpo monoclonal necesita de 200 a 500 ratones, con lo que representan de costos en cuanto a tiempo y cuidados, se puede apreciar la escala de producción necesaria para obtener 3 kg/año *in vivo*.

La empresa Celltech (Inglaterra) fue en 1986 la productora de anticuerpos monoclonales con mayores sistemas de cultivo celular, al disponer de dos fermentadores de 1.000 litros, además de un reactor de 200 litros y varios de 100 litros. Sin embargo, la principal desventaja de los sistemas convencionales de fermentación de cultivos celulares consiste en que las células de mamífero no pueden mantenerse a densidades superiores a  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . En estas condiciones las concentraciones típicas de anticuerpos monoclonales obtenidas son inferiores a  $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Por consiguiente, un objetivo substancial ha sido el de desarrollar nuevos métodos de cultivo de células de mamíferos que incrementasen tanto la densidad celular como la concentración del producto. Monsanto Corporation desarrolló un sistema de cultivo continuo para la producción de anticuerpos monoclonales, con un volumen de reactor de 16,5 litros equivalente en capacidad al fermentador discontinuo convencional de 1.000 litros. En primer lugar, las células crecen en un sistema de perfusión quimostático, se concentran, se mezclan con una matriz en una proporción 1:10 y se colocan en un reactor cilíndrico, equipado con una serie de tubos porosos por los que circula el medio a través del cultivo y con una membrana semipermeable capaz de permitir el suministro de  $\text{O}_2$  y la eliminación de  $\text{CO}_2$  (Fig. 10.14). Charles River extendió esto a la producción *in vitro* a gran escala mediante el sistema Opticel,

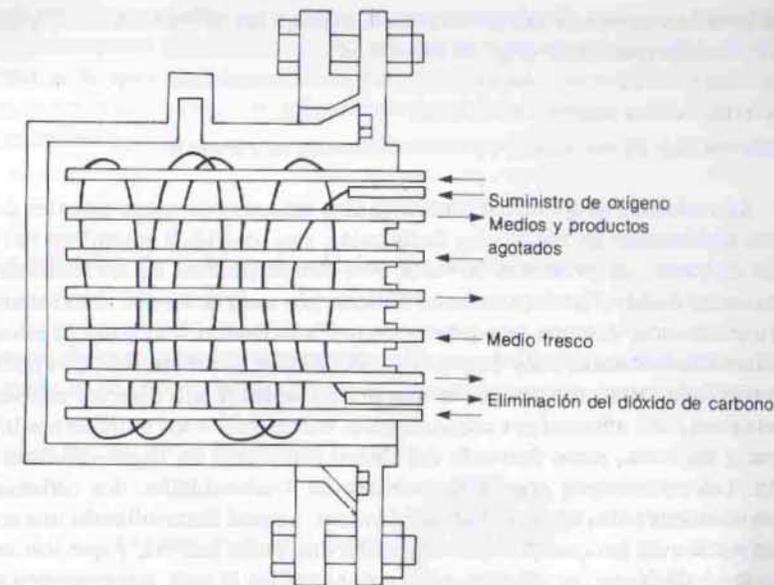


Fig. 10.14. Reactor de mantenimiento estático desarrollado en Monsanto (reproducido con permiso de Van Brunt, 1986b).

en el cual las células de hibridomas se inmovilizaban en una matriz cerámica. Bio-Response (USA) es capaz de producir hasta 150 g de anticuerpo monoclonal por día a partir de un cultivo medio de hibridomas de ratón que crecen en un reactor de fibra hueca de 400 litros. Las densidades celulares se mantienen por debajo de  $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ . Las ventajas de este sistema son que las células parecen necesitar menores concentraciones de suero que las necesarias en un cultivo discontinuo normal, permitiendo utilizar medios de cultivo definidos químicamente con bajo contenido de suero. Damon Biotech (USA) ha desarrollado una tecnología de microencapsulado de células especial basado en la inmovilización de las células hibridoma en esferas huecas de alginato de sodio gelificado. Las células pueden crecer, y migran dentro de la microcápsula, y el tamaño de poro está regulado para facilitar la difusión del nutriente y los metabolitos en tanto que retienen el anticuerpo. Las microcápsulas se cultivan en reactores de 40 litros equipados con agitadores de velocidad variable, líneas de suministro de  $\text{O}_2$  y aire/ $\text{CO}_2$  y de salida de productos agotados, y alimentados continuamente con el medio durante las 2-3 semanas que dura el proceso. Durante este periodo, la concentración de células y de anticuerpos monoclonales dentro

de la microcápsula se incrementa hasta superar las  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  y los 3  $\text{mg ml}^{-1}$  respectivamente (Fig. 10.15).

#### DESARROLLO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES MEJORADOS

Los ensayos terapéuticos limitados con anticuerpos monoclonales de ratón han demostrado ser efectivos a dosis bajas, y su toxicidad es también muy baja. Sin embargo, las proteínas de ratón son inmunogénicas en los humanos y los pacientes desarrollan rápidamente anticuerpos antirratón que reaccionan entrecruzadamente. Aunque se pueden obtener hibridomas humanos, la eficacia de la transformación es muy baja y la estabilidad de la producción de anticuerpos monoclonales es variable, por lo que se han desarrollado diversos métodos que permiten a los anticuerpos monoclonales humanos y a los anticuerpos híbridos (parte humana, parte derivada del ratón) expresarse en líneas celulares de ratón. Los anticuerpos normales consisten en 4 subunidades, dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Se está desarrollando una segunda generación de anticuerpos que contienen una única cadena, y que son moléculas recombinantes, producidas en la actualidad en *E. coli*, que consisten en por-

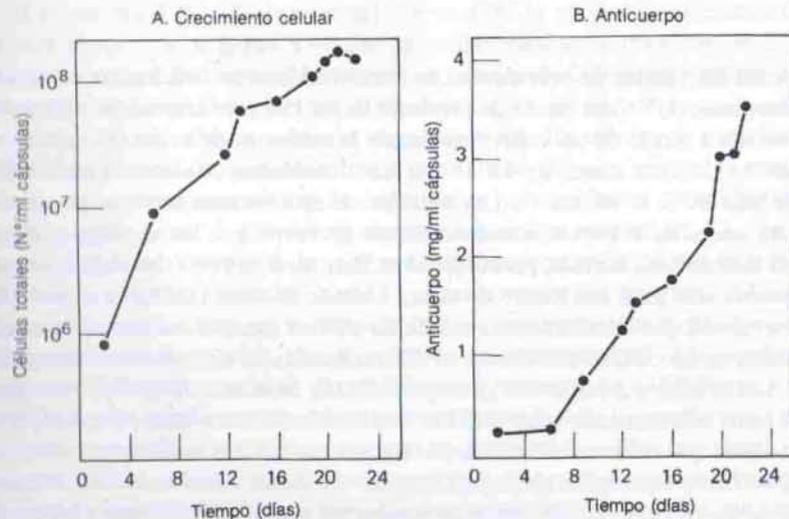


Fig. 10.15. Crecimiento de células de hibridoma y producción de anticuerpos monoclonales en microcápsulas (reproducido con permiso de Posillo, 1986).

ciones de regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo unidas covalentemente a una molécula mediante un péptido espaciador (Fig. 10.16). Las ventajas de estos anticuerpos son su menor tamaño, su mayor estabilidad y el menor costo de producción del cultivo microbiano frente al cultivo de células de mamíferos.

#### Otros productos de cultivo de células de mamíferos

Además de la producción de vacunas víricas y anticuerpos monoclonales, los sistemas de cultivo de células de mamíferos están siendo desarrollados o se

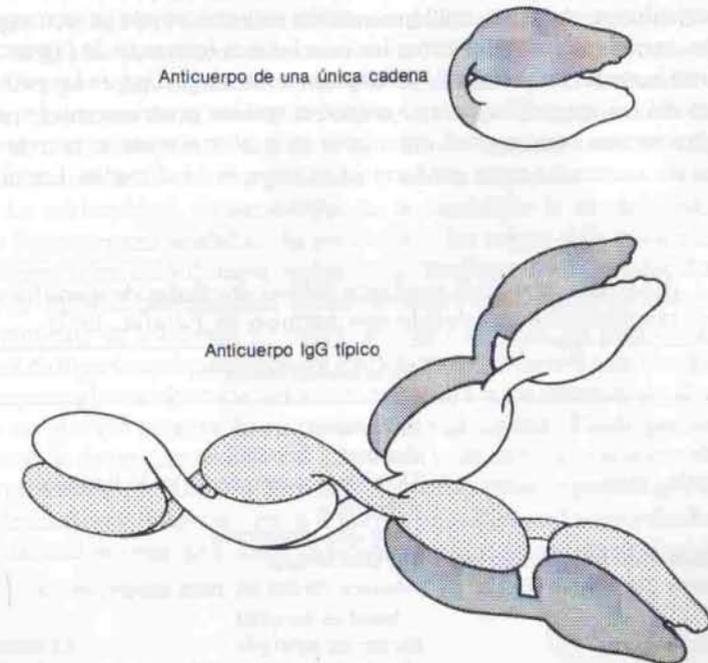


Fig. 10.16. Una nueva cadena sencilla de anticuerpo consistente en la porción variable de una cadena ligera y una porción variable de una cadena pesada conectadas por un péptido. Los centros de unión al antígeno están en el lado derecho de cada estructura (reproducido con permiso de Klausner, 1986).

utilizan actualmente para manufacturar una gran variedad de productos, especialmente para diagnóstico y cuidado de la salud del hombre y los animales. En la Tabla 10.1 se muestran una serie de productos farmacéuticos así como sus aplicaciones. Se espera que el mercado mundial de hormonas humanas, insulina, hormona del crecimiento, hormona de la fertilidad, factor de crecimiento epitelial y estrógenos pueda alcanzar los 1,9 billones de \$ en 1991. Es de suponer también que el mercado del activador del plasminógeno, de la interleukina-2, del interferón y de otras linfocinas se desarrolle rápidamente y, con procesos basados en el cultivo de células animales y la fermentación de cepas bacterianas recombinantes, tecnologías que puedan competir unas con otras. Las técnicas de cultivo celular a gran escala utilizan biorreactores similares a los usados en la producción de anticuerpos monoclonales. En la sección siguiente se mostrarán más ejemplos acerca de los procesos de producción de interferones mediante cultivo celular.

El desarrollo de sistemas genéticos de alto nivel ha permitido insertar los genes de interés dentro de líneas celulares establecidas con objeto de conseguir la producción de compuestos tales como los interferones humanos, la hormona del crecimiento humana y el factor-VIII del plasma humano. Una de las principales ventajas del cultivo celular como huésped es que las proteínas pueden ser procesadas exactamente como en el organismo (con glicosilación si es necesario) y pueden ser secretadas en la conformación correcta en el medio. Las difi-

**Tabla 10.1.** Productos obtenidos mediante cultivo de células de mamíferos y aplicaciones/tratamientos (reproducido con permiso de Ratafia, 1987)

Producto	Enfermedad/condición
Linfocinas	Infecciones virales
Eritropoietina	Anemia, hemodiálisis
Insulina recombinante	Diabéticos dependiente de la insulina
Células beta	Diabéticos
Uroquinasa	Coágulos sanguíneos
Factor estimulante de los granulocitos	Heridas severas
Activador tisular del plasminógeno	Ataques cardíacos, para supervivencia hasta el hospital
Factor de transferencia	Esclerosis múltiple
Proteína C	Cirugía de la cadera, deficiencia de proteína C
Factor de crecimiento epidérmico	Quemaduras
Factor VIII	Hemofilia
Hormona del crecimiento humano	Deficiencia pituitaria
Ortoelón	Rechazo del trasplante de riñón
Interferón alfa	Leucemia de las células pilosas

cultades presentadas en el cultivo de células sensibles a las fuerzas de cizalla han sido resueltas mediante el desarrollo de biorreactores con fuerzas de cizalla baja y con un buen control medioambiental. La desventaja que representa el costo de emplear medios que contienen suero ha sido superada con el desarrollo de los medios definidos.

### Agentes anticancerosos

La quimioterapia contra el cáncer se ha dirigido hacia el descubrimiento de agentes citotóxicos capaces de inhibir la división de las células de los mamíferos. El mercado mundial total de anticancerígenos excedió los mil millones de dólares en 1987, y se supone que para finales del siglo alcanzará los 27 mil millones. Los agentes derivados de fermentaciones representan del 30 al 45 % de las drogas antitumorales más corrientes. Muchos de los anticancerígenos producidos por microorganismos y células de mamífero transformadas están en las primeras etapas de su evaluación como fármacos. En esta sección se van a revisar diversos ejemplos acerca de la producción mediante biotecnología de citotóxicos utilizando microorganismos y células animales.

La adriamicina, un antibiótico de la familia de la antraciclina, producido por *Streptomyces peucetius*, ha encabezado las ventas de todos los agentes anticancerosos en USA durante varios años. También se han producido comercialmente enzimas que eliminan los aminoácidos esenciales y no esenciales para el tratamiento de leucemias y tumores sólidos humanos. La L-asparaginasa ha sido el enzima terapéutico antineoplástico que más éxito ha tenido, prefiriéndose la asparaginasa obtenida del suero de cobaya a los enzimas de *E. coli* o *Erwinia carotovora* a causa de su reducida antigenicidad. Puede predecirse que la demanda de productos como el interferón y los anticuerpos monoclonales para el tratamiento de tumores de pulmón, mama, colon y próstata, y ciertos tipos de leucemias y linfomas crezca a mayor velocidad en los próximos años. En la actualidad se están probando clínicamente algunos anticuerpos monoclonales.

### ANTRACICLINAS

La daunorrubicina, el primer antibiótico de la familia de las antraciclina efectivo clínicamente, fue aislado en 1963 a partir de *Streptomyces coeruleorubidus*, y se utilizó primeramente para el tratamiento de la leucemia aguda. La doxorubicina (conocida comercialmente como Adriamicina) se obtuvo como

un intento de mejorar la anterior, por mutación del *S. peucetius*. Estas antracilinas manifiestan una toxicidad cardíaca acumulativa, dependiente de la dosis e irreversible, por lo que, en consecuencia, se aíslan o producen semisintéticamente muchas otras antracilinas con el fin de obtener un agente eficaz con cardiotoxicidad reducida; en la Figura 10.17 se muestran sus estructuras.

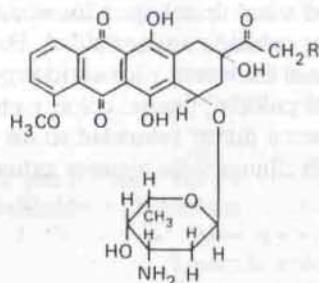
En la Figura 10.18 se muestra un proceso de fermentación para la producción de daunorrubicina. El medio de cultivo contiene almidón o glucosa como fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno complejo como harina de soja, solubles de destilería, extracto de levadura y harina de pescado y sales inorgánicas. La aireación se mantiene a 0,5 vvm y la velocidad punta del agitador debe ser de 750 pies  $\text{min}^{-1}$  en fermentadores de producción. El producto se obtiene en forma de glicósido. La acidificación del caldo entero después de la fermentación, lisa las células e hidroliza los glicósidos a daunorrubicina.

Debido a su potencial toxicidad, debe evitarse la exposición a líquidos que contengan material citotóxico mediante el empleo de una tecnología de aislamiento apropiada en los procesos de producción y purificación.

#### INTERFERON

Los sistemas de producción de interferón a partir de leucocitos y fibroblastos diploides son ejemplos de los recientes procesos en el cultivo de células de mamíferos para la producción de agentes anticancerígenos.

Los fibroblastos diploides se incuban en frascos y botellas de cultivo giratorias para conseguir un crecimiento a confluencia. Estas células pueden ser in-



Daunorubicina R = H  
Adriamicina R = OH

Fig. 10.17. Estructuras de la daunorrubicina (R = H) y doxorubicina (Adriamicina) (R = OH).

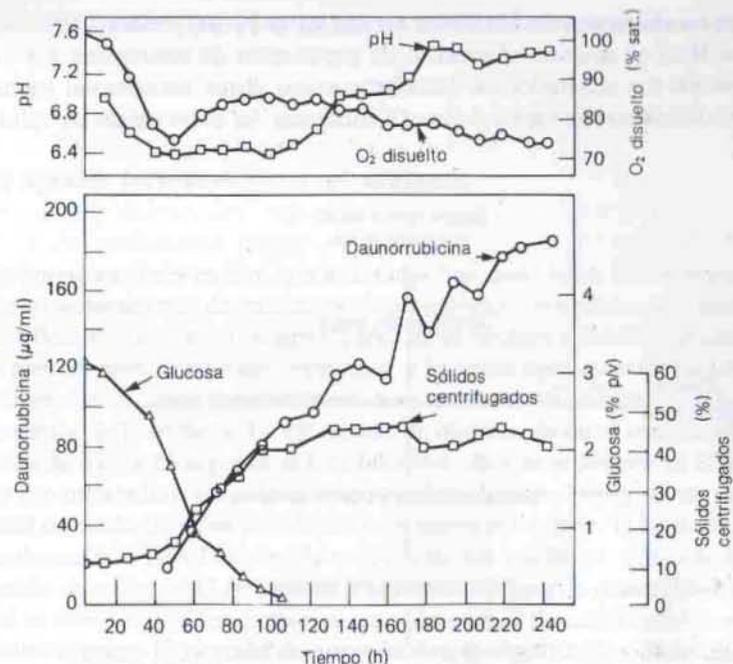


Fig. 10.18. Producción de daunorrubicina mediante cultivo sumergido de *Streptomyces peucetius* (reproducido con permiso de Flickinger, 1985).

ducidas a producir interferón de fibroblastos humanos (HuIFN- $\beta$ ) mediante exposición a poli I:C (ácido poliinosínico-policitidílico); los rendimientos se elevan por tratamiento con 100 U  $\text{ml}^{-1}$  de HuIFN- $\beta$  previamente a la inducción con poli I:C. Las células dependen del anclaje, por lo que el principal problema para el aumento de escala del proceso consiste en la provisión de una superficie adecuada para el crecimiento. Los métodos utilizados incluyen el empleo de frascos, botellas giratorias, placas, fibras y microsoportes estacionarios en reactores tipo tanque con agitación. Los inóculos para las sucesivas etapas son generalmente del 20 al 25 %, obteniéndose concentraciones finales de células de 2 a 5  $\times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Los rendimientos típicos de HuIFN- $\beta$  son de 3,2  $\times 10^4$  U  $\text{ml}^{-1}$ .

El interferón de leucocitos (HuIFN- $\alpha$ ) se produce a partir de suspensiones de leucocitos empleando HuIFN- $\alpha$  como activador y el virus de la enfermedad de Sendai o Newcastle como inductor. Los leucocitos sensibilizados se recuperan a partir de sangre entera y se purifican mediante el empleo de cloruro amóni-

co. Los rendimientos de HuIFN- $\alpha$  oscilan entre 20.000 y 60.000 U/ml<sup>-1</sup>. En la Figura 10.19 se muestra el proceso de producción de interferón.

Aunque los resultados del interferon como droga antitumoral frente a tumores sólidos no son especialmente alentadores, ha demostrado ser válido para

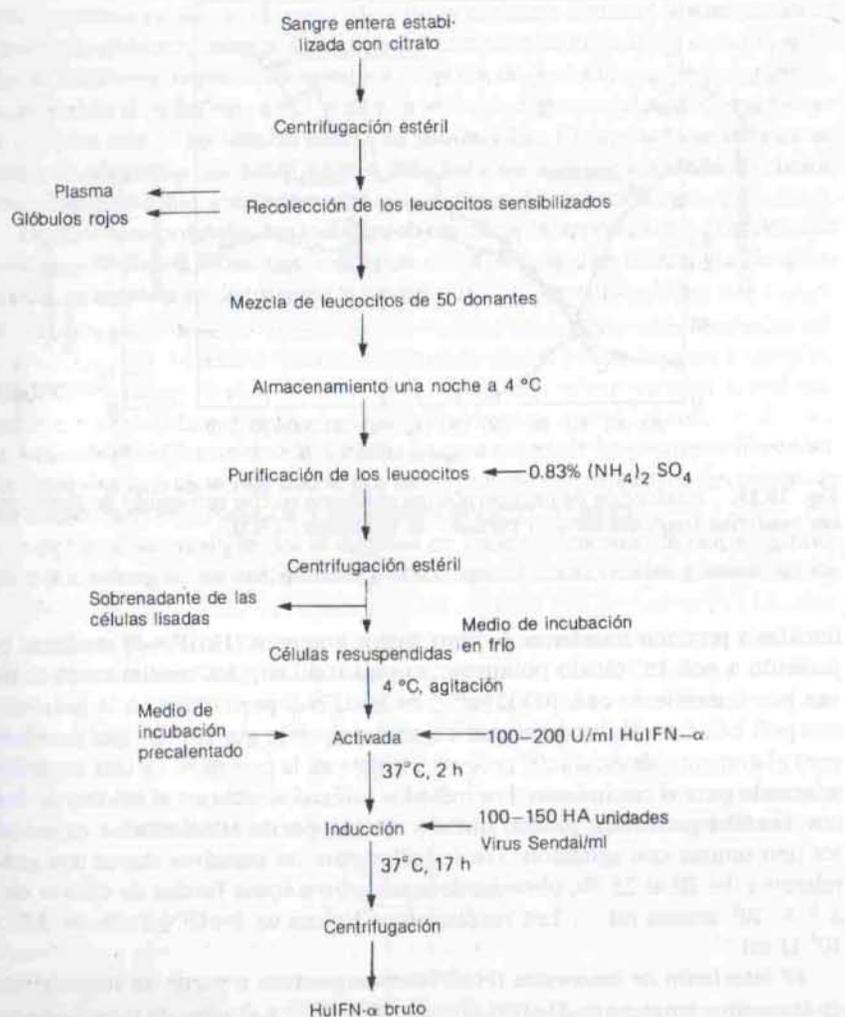


Fig. 10.19. Proceso para la producción de  $\alpha$ -interferón humano (adaptado con permiso de Flickinger, 1985).

la terapia de algunos tipos raros de cáncer, especialmente de la leucemia de las células pilosas.

### Otros agentes farmacológicos microbianos

Las investigaciones en biología molecular han dado lugar al descubrimiento de nuevas generaciones de productos farmacológicos microbianos y también a la identificación de nuevas bioactividades de productos microbianos caracterizados previamente. Entre estos productos se incluyen agentes antiinflamatorios, inhibidores de enzimas, inmunodepresores, inmunoestimulantes y agonistas y antagonistas de hormonas. La estructura de algunos de estos compuestos está relacionada con la de algunos antibióticos. Muchos se producen de forma natural o son metabolitos secundarios modificados químicamente y tienen una gran variedad de modos de acción incluyendo la unión al receptor, la interacción con la membrana o la pared celular, la unión a ácidos nucleicos, o la activación o inhibición de enzimas. El empleo de programas eficaces de detección de bioactividad *in vitro* se considera como un requisito para el descubrimiento con éxito de nuevos agentes. El clonado de genes facilita la construcción de sistemas basados en células diseñados para detectar moléculas con nuevas actividades bioquímicas. Los receptores y ligandos son fácilmente accesibles a través del clonado y la expresión de genes eucariotas, y los sistemas de detección diseñados incluyen metodologías como el ELISA. Se está intensificando la búsqueda de metabolitos secundarios, no antibióticos, activos a nivel farmacológico. Muchas compañías farmacéuticas consideran este momento como el comienzo de una segunda gran era semejante a la «era de oro de los antibióticos» de los años cuarenta-cincuenta de este siglo.

### Producción de shikonina por cultivo de células vegetales

La shikonina y sus derivados (Fig. 10.20) se encuentra en la raíz de la planta *Lithospermum erythrorhizon*, utilizada tradicionalmente en Japón como medicina, debido a los efectos antiinflamatorios y antibacterianos de la shikonina. Este compuesto, que es un pigmento del tipo de la naftoquinona, de color rojo brillante, se utiliza también en cosmética. La planta fue importada al Japón desde China y Corea para la preparación de shikonina pura que tiene un valor de 4.500 \$/kg.

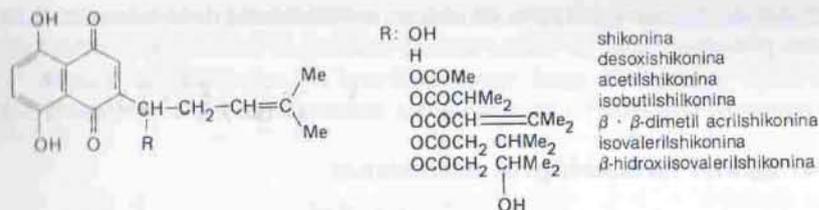


Fig. 10.20. Estructura de la shikonina y sus derivados.

Tabla 10.2. Medio y otros parámetros para la producción de derivados de shikonina mediante suspensiones de cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* (Fujita y Hara, 1985)

Medio (mg/l)			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1388	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.6
KNO <sub>3</sub>	160	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.004
KCl	130	NaFe-EDTA·3H <sub>2</sub> O	3.6
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	38	KI	1.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1500	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2960
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6	Sacarosa	40000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	9	Acido 3-indolacético	3.5
Parámetros del cultivo			
Temperatura de incubación (°C)	25	Rendimiento celular (g/l)	17.5
Concentración del inóculo (g. peso seco/l)	5.6	Contenido de shikonina en la célula (%)	
K <sub>1</sub> a(h <sup>-1</sup> )	12	Rendimiento de shikonina (mg/l)	

Se ha establecido una línea celular que puede acumular hasta el 15 % de la biomasa en forma de producto, optimizando la productividad a través de un programa de desarrollo del cultivo celular. El proceso de producción consiste en una fermentación en dos etapas; en la primera etapa para el desarrollo de la biomasa, se dejan crecer las células en un fermentador de 200 litros durante 9 días; después las células se recolectan y se transfieren a un recipiente de producción de shikonina de 750 litros de capacidad y se incuban 14 días. El rendimiento de shikonina y derivados es muy sensible a las interrelaciones existentes entre el suministro de oxígeno, la cantidad de inóculo y la concentración de los constituyentes en el medio. Los metabolitos secundarios de las células vegetales no son secretados al medio, sino que son retenidos en vacuolas y orgánulos. Los derivados de la shikonina se separan de las células mediante extracción con etanol. En la Tabla 10.2 se muestran las condiciones de producción que conducen a un rendimiento de 2,31 g de derivados de shikonina por litro de cultivo.

## Capítulo 11

### Enzimas industriales

#### Aplicaciones de los enzimas

La mayoría de los enzimas utilizados en la industria son enzimas extracelulares de origen microbiano. Las proteasas constituyen aproximadamente el 50 % del mercado de los enzimas microbianos. El empleo de una serín proteasa alcalina obtenida a partir de *Bacillus licheniformis* en los detergentes es la aplicación comercial dominante de las proteasas, seguida por el uso de cuajo de *Mucor miehei* en la manufactura del queso, siendo también significativa la utilización de la proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* para la modificación de la masa del pan y de las galletas.

Las principales aplicaciones de los enzimas extracelulares que degradan el almidón consisten en la conversión de almidón en jarabes que contienen glucosa, maltosa y oligosacáridos, en la producción de azúcares fermentables en cervecera y en la obtención de bebidas alcohólicas y en la modificación de la harina de panadería. Entre los enzimas comercialmente importantes utilizados en una o más de estas aplicaciones destacan las  $\alpha$ -amilasas del *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae* y la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*.

Las cepas de *A. niger* producen principalmente pectinasas y hemicelulasas. Los componentes mayoritarios de las pectinasas son la pectín esterasa, la endopolimetilgalacturonato liasa y la poligalacturonasa. En los procesos de extrac-

ción de zumo de frutas y de elaboración del vino, la pectinasa eleva el rendimiento de zumo, reduce la viscosidad, y mejora la extracción del color de las pieles y de las frutas y vegetales macerados.

Las celulasas comerciales producidas por cepas de *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus niger*, tienen en la actualidad unas aplicaciones limitadas en el procesado de alimentos, en cervecería, en la producción de alcohol y en el tratamiento de desechos. Su mayor potencial comercial consiste en la conversión de la lignocelulosa y la celulosa de la madera en glucosa. Los componentes más importantes de la celulasa son la celobiohidrolasa, que tiene mayor afinidad por la celulosa cristalina, la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y la celobiasa. Los *Penicillium emersonii* producen una  $\beta$ -1,3; 1,4-glucanasa con aplicaciones importantes en la hidrólisis de los  $\beta$ -glucanos de la cebada.

Otros enzimas extracelulares microbianos importantes son las lipasas fúngicas y de levaduras y las lactasas y dextranasas fúngicas.

La glucosa isomerasa es el enzima intracelular comercial más utilizado en la industria alimentaria, para convertir la glucosa en fructosa durante la producción de jarabes de maíz ricos en fructosa. Las lactasas comerciales bacterianas y de levaduras producidas con *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis* y *Bacillus spp* también son enzimas intracelulares. Los enzimas intracelulares se emplean también como reactivos de diagnóstico clínico, en ingeniería genética, en investigación y en la biotransformación de productos químicos y farmacéuticos. La hexoquinasa, la glucosa oxidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la colesterol oxidasa son ejemplos importantes de enzimas microbianos utilizados en diagnóstico clínico.

Las biotransformaciones han sido definidas como modificaciones enzimáticas selectivas de compuestos puros en productos finales específicos o en compuestos intermedios, y pueden implicar el empleo de enzimas aislados o de células enteras en forma libre o inmovilizada. Existen muchos ejemplos de enzimas utilizados en las reacciones de biotransformación. Por ejemplo, la penicilina acilasa se utiliza para hidrolizar las cadenas laterales de la penicilina produciendo ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y las L-aminoácido acilasas se usan en la preparación de L-aminoácidos resueltos a partir de mezclas racémicas de D,L-aminoácidos acilados. Únicamente la forma L se desacetila, permitiendo separar la forma D, rerracemizarla y reutilizarla como sustrato. Los grupos más importantes de biotransformaciones enzimáticas son probablemente los utilizados en la industria farmacéutica, principalmente en las transformaciones de esteroides (véase Capítulo 10).

Los enzimas no microbianos más notables son la papaína, presente en la planta *Carica papaya*, utilizada en cervecería y en el procesado de alimentos, y la quimosina, extraída del cuarto estómago de las terneras sin destetar utilizada en la manufactura del queso. Además de estos, los cereales malteados, utili-

zados en cervecería, son una fuente de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas, proteasas y  $\beta$ -glucanasas para la licuefacción, sacarificación y extracción de azúcares fermentables y nutrientes.

La gran mayoría de los enzimas microbianos extracelulares se utilizan en forma de enzimas solubles libres y no se recuperan para su reutilización. El costo del tratamiento enzimático por lote de sustrato es relativamente bajo y la recuperación del enzima o el empleo de enzimas inmovilizados no es en general eficaz en términos de costo. Por el contrario, un número considerable de reacciones, llevadas a cabo en la industria mediante enzimas intracelulares implica el uso de enzimas inmovilizados o células enteras inmovilizadas o libres, que pueden reciclarse. Las glucosas isomerasas comerciales se preparan mediante inmovilización de células que contienen el enzima o por la inmovilización del enzima aislado en soportes sintéticos, dependiendo del fabricante.

Los costos globales de producción de los enzimas intracelulares son substancialmente mayores que los de los enzimas extracelulares, debido a los mayores costos de aislamiento y purificación y en consecuencia, con frecuencia es económicamente rentable la reutilización del enzima en forma inmovilizada. La principal ventaja del empleo de células libres o inmovilizadas en las biotransformaciones es que se evitan los costos de aislamiento del enzima. Sin embargo, el sistema celular debe permitir velocidades adecuadas de penetración y difusión del sustrato hacia adentro y del producto hacia afuera, y además que las células y las reacciones implicadas en la formación de subproductos indeseables puedan ser inhibidas o minimizadas. Los sistemas de biotransformación celular pueden ser particularmente aplicables a situaciones en las que el enzima implicado está asociado a la membrana o necesite cofactores específicos o en los casos en los que esté implicado más de un enzima.

Los sistemas basados en el empleo de enzimas inmovilizados aislados o de células inmovilizadas son ventajosos para la producción de productos muy puros libres de enzimas residuales. La inmovilización del enzima o su retención en células inmovilizadas incrementa generalmente su estabilidad.

## Nuevos avances

### PROCESOS RELACIONADOS CON LOS DERIVADOS LACTEOS

Los cuajos microbianos, más baratos que el de ternera (quimosina) se utilizan en la producción de más de la tercera parte de los quesos comercializados en el mundo. Los primeros cuajos microbianos eran relativamente estables al

calor comparados con los de ternera, por lo que permanecían activos en el queso dando lugar a la aparición de olores desagradables y a un menor rendimiento. El tratamiento químico del cuajo de *M. miehei* con agentes oxidantes, como por ejemplo  $H_2O_2$ , da lugar a un enzima con unas propiedades frente a la temperatura semejantes, y que produce quesos de una calidad y rendimiento similares a los obtenidos con la quimosina. Muchas compañías e institutos de investigación en biotecnología han realizado investigaciones encaminadas a producir quimosina mediante ingeniería genética de bacterias y hongos.

La lactosa presente en la leche y el suero es menos soluble y menos dulce que sus monosacáridos componentes, glucosa y galactosa. Aunque existen aplicaciones significativas para la lactasa inmovilizada o soluble (Tabla 11.1) el desarrollo comercial de estos procesos se ha visto frenado por el alto costo del enzima. Para superar este problema, Tetra Pak Internacional desarrolló el sistema Tetra Lacta® System, consistente en añadir a la leche esterilizada una pequeña cantidad de enzimas que da lugar a la hidrólisis del 80 % de la lactosa de la leche empaquetada en un período de una a dos semanas.

Pueden añadirse a los quesos enzimas industriales con objeto de aumentar el efecto de los enzimas secretados por los cultivos starter en el desarrollo del aroma y sabor del queso. Por ejemplo, la proteasa de *B. amyloliquefaciens* estimula la maduración del queso cheddar y las lipasas desarrollan aromas y sabores fuertes en los quesos italianos; recientemente el enzima sulfhidril oxidasa se ha utilizado para eliminar el aroma indeseable debido a los tioles que se forman en la leche UHT.

Tabla 11.1. Principales aplicaciones de las lactasas

Materia prima	Producto	Comentarios
Suero	Alimentos animales	Permite la incorporación de más suero Impide la cristalización de la lactosa en el suero concentrado
	Suero con lactosa hidrolizada	Utilizado como ingrediente en panadería, repostería y heladería
Suero desproteínizado	Filtrados con lactosa hidrolizada	Propiedades similares a las de los jarabes de glucosa del equivalente dextrosa del medio
Leche	Leche con lactosa hidrolizada	Incrementa el poder edulcorante Impide la cristalización en las leches concentradas

#### CERVECERIA E HIDROLISIS DEL ALMIDON

En la cerveza normal, de un tercio a un cuarto de los carbohidratos del mosto se encuentran en forma de dextrinas límite, que no fermentan y permanecen como tales en el producto final. Sin embargo, la glucoamilasa de *A. niger* hidroliza estas dextrinas a azúcares fermentables, lo que permite obtener un mosto más diluido, que con menor contenido calórico produce el mismo nivel de alcohol que la cerveza normal. El enzima puede añadirse al mosto a dosis altas a una temperatura de trabajo de 65 °C antes de la ebullición, o bien al fermentador a dosis bajas dejándolo actuar durante todo el proceso de fermentación. La desventaja de éste último sistema es que las temperaturas normales de pasteurización no inactivan el enzima, lo que puede crear problemas de estabilidad durante el almacenamiento de la cerveza. Una posible solución de este inconveniente podría ser la inmovilización de la glucoamilasa.

Un intento reciente de emplear los enzimas en la industria de la cervecería consiste en hacer que las levaduras excreten estos enzimas durante el proceso de fermentación. Los *Saccharomyces diastaticus*, distintos de los *S. cerevisiae* en tanto que producen glucoamilasa, no son aptos para cervecería puesto que producen malos olores y su glucoamilasa es demasiado estable frente a la temperatura. Otras levaduras, las *Schwanniomyces castelli*, poseen glucoamilasa con la importante característica de que puede ser inactivada a las temperaturas normales de pasteurización. Por tanto, el objetivo consistirá en introducir mediante ingeniería genética este enzima dentro de las *S. cerevisiae*. Otras investigaciones en curso se basan en el clonado de la  $\beta$ -glucanasa, en proteasas que estabilicen la cerveza frente al frío y de otros enzimas de *S. cerevisiae*.

Durante la maduración de la cerveza, la transformación oxidativa del  $\alpha$ -acetolactato en diacétilo y la reducción del diacétilo a acetoina son etapas limitantes de la velocidad del proceso global (Fig. 11.1). Sin embargo, la adición del

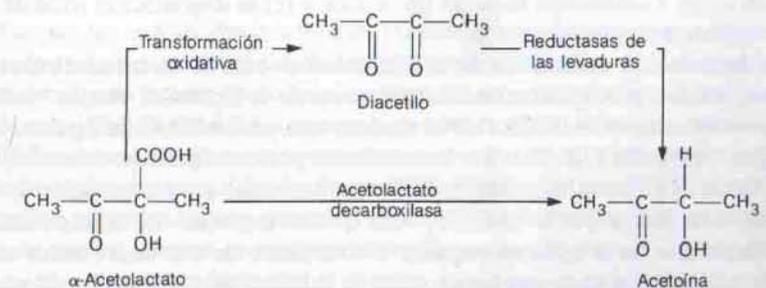


Fig. 11.1. Conversión del  $\alpha$ -acetolactato en acetoina.

enzima acetolactato decarboxilasa a la cerveza recién fermentada evita la formación de diacetilo y hace posible acelerar substancialmente el proceso de maduración, por lo que se intentan encontrar fuentes adecuadas de este enzima.

La glucoamilasa se emplea junto con la  $\alpha$ -amilasa estable a alta temperatura en la licuefacción/sacarificación del almidón a glucosa. Aunque la glucoamilasa hidroliza los enlaces glicolíticos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6- la velocidad de ruptura de este segundo tipo de enlaces es lenta. El empleo de enzimas desramificantes, como pululanasa, que hidroliza preferencialmente los enlaces  $\alpha$ -1,6, incrementa de forma significativa la velocidad de sacarificación. La primera pululanasa introducida comercialmente, derivada del *Aerobacter aerogenes*, tiene un pH óptimo de aproximadamente 6,0 y no es muy eficaz a los pH de 4-4,4 necesarios para la sacarificación por la glucoamilasa. Recientemente se ha comercializado una pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* con unas propiedades de actividad/estabilidad frente al pH y la temperatura adecuadas para el proceso de sacarificación.

#### DEGRADACION DE LOS POLISACARIDOS DE LAS PAREDES CELULARES VEGETALES

En los procesos enzimáticos basados en la degradación de tejidos vegetales no lignificados, como frutas y verduras, se han obtenido avances significativos. Las paredes celulares están compuestas por fibras de celulosa y hemicelulosa asociadas embebidas en una matriz péctica. Las hemicelulasas y celulasas comerciales convencionales no son capaces de licuar completamente estos materiales complejos, ya que, para la degradación total se necesitan varios enzimas, entre ellos celulasas, glucanasas, galactanasas, arabinasas y pectinasas. El mejor conocimiento de las propiedades de estos enzimas y de los organismos que los producen ofrecerá el potencial para la producción de una gran variedad de enzimas que pueden facilitar (a) el encauzamiento de los enzimas hacia la degradación de tejidos específicos mientras que deja inalterados a los otros, (b) la maceración y disolución total de los tejidos y (c) la degradación total de los polisacáridos en monosacáridos.

La degradación enzimática de la lignocelulosa aún no es económicamente rentable, debido principalmente a la resistencia de la lignina al ataque biológico. Como la celulosa cristalina de la madera está embebida en la lignina, está protegida frente a la hidrólisis por las celulasas; por consiguiente, deberán diseñarse métodos económicamente rentables para romper estos complejos de lignocelulosa de forma que la celulosa pueda quedar expuesta al ataque enzimático. La hidrólisis de la celulosa requiere el sinergismo de tres importantes enzimas: la celobiohidrolasa, que actúa sobre la celulosa microcristalina, la endoglucanasa, que ataca las regiones amorfas de las fibras de celulosa y los 1,4- $\beta$ -

glucanos, más solubles, y la  $\beta$ -glucosidasa que hidroliza la celobiosa, producto de los dos primeros enzimas, a glucosa. En las preparaciones enzimáticas comerciales más eficaces, producidas por *Trichoderma reesei*, la actividad de los dos primeros enzimas está inhibida por la celobiosa. Además, este organismo produce únicamente niveles bajos de  $\beta$ -glucosidasa que, al eliminar la celobiosa, reduce su capacidad inhibitoria. La  $\beta$ -glucosidasa resulta a su vez inhibida por el producto, la glucosa. Esta inhibición por el producto impide el desarrollo de procesos enzimáticos para la producción de glucosa a partir de celulosa, por lo que es necesario identificar o diseñar mediante ingeniería genética celulasas insensibles a la inhibición por el producto.

#### REACCIONES ENZIMATICAS CON FASES ORGANICAS

En los últimos años se han investigado aplicaciones muy interesantes de las reacciones enzimáticas, llevadas a cabo en sistemas en dos fases agua-solvente orgánico, y en medios orgánicos no acuosos. Los enzimas se emplean usualmente en soluciones acuosas y en los casos en los que el agua sea un reactivo para la reacción enzimática la posición del equilibrio de reacción favorece generalmente la hidrólisis. Mediante el empleo de fases orgánicas, el agua puede ser un factor limitante y en estas condiciones la dirección de la reacción puede cambiar hacia la síntesis.

Los sistemas en dos fases, consistentes en agua y un solvente orgánico poco miscible con ella, pueden mejorar los resultados de las reacciones catalizadas por enzimas basados en substratos relativamente insolubles en agua. La fase acuosa contiene el enzima y los cofactores o cosubstratos solubles en agua y la fase orgánica contiene el substrato. La reacción enzimática tiene lugar en la interfase, y el área interfacial puede incrementarse por agitación hasta formar una emulsión. En la Tabla 11.2 se indican algunos ejemplos de reacciones enzimáticas en dos fases, y en la Tabla 11.3 se exponen las ventajas de estos sistemas bifásicos.

Aunque las teorías convencionales mantienen que los enzimas actúan únicamente en soluciones acuosas, los estudios recientes acerca de la capacidad de los enzimas para actuar como catalizadores en solventes orgánicos demuestran que la mayoría, si no todos los enzimas, pueden también actuar en estos solventes. Todas las interacciones no covalentes que mantienen la estructura catalíticamente activa de un enzima, incluyendo fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y puentes salinos, necesitan agua directa o indirectamente y si no existe nada de ésta, el enzima se desnaturaliza. Sin embargo, como el agua está por naturaleza unida estrechamente al enzima, éste siempre está rodeado por una capa de agua esencial como si fuera una concha. Es decir, que siempre que el

Tabla 11.2. Bioconversión de compuestos orgánicos en solventes orgánicos inmiscibles con agua

Sústrato	Biotransformación	Catalizador	Solventes orgánicos
Colesterol	Oxidación del grupo hidróxilo, isomerización	Células de <i>Nocardia</i>	Tetracloruro de carbono
3 $\beta$ - o 17 $\beta$ -Hidroxiesteroideos	Oxidación de los grupos 3 $\beta$ - o 17 $\beta$ - hidróxilo	$\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa	Acetato de etilo o butilo
20-Cetosteroides	Reducción de los grupos 20-ceto	20 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa	Acetato de etilo o butilo
Estrógenos	Formac. del oligómero estrógeno	Lacassa fúngica	Acetato de etilo
4-Androstendiona	$\Delta^1$ -Deshidrogenación	Células de <i>Nocardia rhodocrous</i>	Benceno-heptano
1,7-Octadieno	7,8-Epoxidación	Cél. de <i>Pseudomonas oleovorans</i>	Ciclohexano
N-Acetil-AA + Etanol (AA = triptófano, tirosina, fenilalanina)	Esterificación	Quimotripsina	Cloroformo
Glicerol + fosfato	Esterificación	Fosfato alcalino	Cloroformo

Tabla 11.3. Ventajas de los sistemas en dos fases agua-solvente orgánico en las bioconversiones enzimáticas

- Pueden conseguirse unas conversiones eficientes de sustratos poco solubles en agua
- Las reacciones catalizadas por enzimas hidrolíticas pueden ajustarse para favorecer la síntesis
- Los productos pueden prepararse fácilmente mediante la acción de enzimas, siempre y cuando sean poco solubles en agua
- Los enzimas son relativamente estables en estas condiciones y pueden estabilizarse posteriormente por inmovilización
- La contaminación microbiana se suprime debido a la acción de la fase orgánica

enzima esté rodeado por esta monocapa de agua, podrá actuar en medios orgánicos. A diferencia de los sistemas en dos fases descritos hasta ahora, estos sistemas son monofásicos, puesto que operan en un medio orgánico esencialmente anhidro (esto es, con un contenido de agua inferior al 1 %). La naturaleza del solvente es crucial para mantener la capa de agua intrínseca que rodea al enzima, por lo que los mejores solventes serán los más hidrofóbicos, por ejemplo los hidrocarburos, ya que los solventes menos hidrofóbicos tendrán mayor afinidad por el agua y podrán arrancar este agua esencial al enzima. Como los enzimas son insolubles en casi todos los solventes orgánicos, forman suspensiones y operan como suspensiones agitadas en estos sistemas orgánicos monofásicos. Algunos enzimas tienen mayor estabilidad térmica en los solventes orgánicos. Por ejemplo, la lipasa pancreática se inactiva casi instantáneamente a 100 °C en agua, mientras que su tiempo de reducción a la mitad a esta temperatura en solventes orgánicos con un 1 % y un 0,02 % de agua es de 10 minutos y 10 horas respectivamente.

En medios orgánicos, los enzimas son capaces de catalizar muchas reacciones que, debido al equilibrio de la reacción, serían virtualmente imposibles en agua. Por ejemplo, las lipasas catalizan la transesterificación, la esterificación, la amilólisis, el intercambio de acilo, la tiotransesterificación y las reacciones de oximolisis en medios orgánicos mientras que en condiciones acuosas predomina la hidrólisis.

Estos nuevos avances en tecnología enzimática tienen un gran alcance en la expansión de las aplicaciones industriales de los enzimas, especialmente en el área de la síntesis en química orgánica.

## Producción de enzimas

## PROCESOS GENERALES DE PRODUCCIÓN

Los enzimas microbianos se obtienen por fermentación en condiciones controladas de cepas de alto rendimiento en cultivos en superficie o sumergidos. En la Figura 11.2 se muestran las diversas etapas del proceso. Las células excretan los enzimas extracelulares al medio y la primera etapa de la recuperación del enzima a partir de los cultivos sumergidos consiste en la separación del líquido libre de células, que contiene el enzima, mediante filtración o centrifuga-

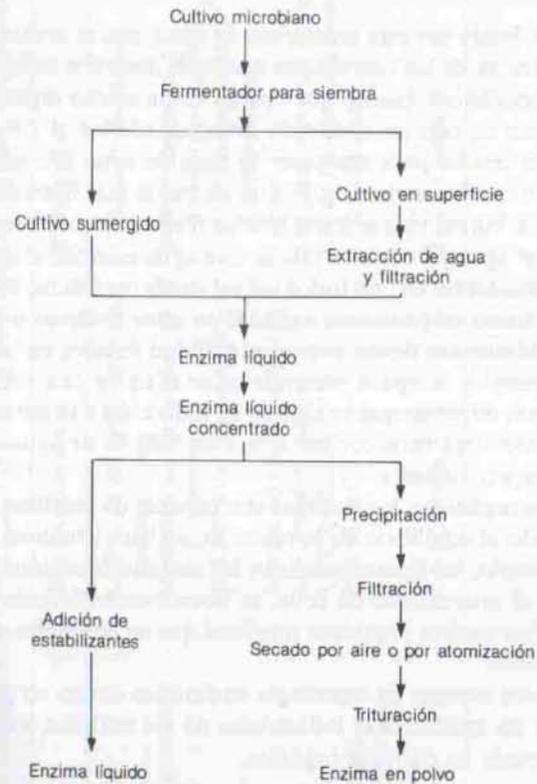


Fig. 11.2. Diagrama de flujo para la producción de enzimas industriales mediante fermentación.

ción. Los procesos de fermentación con cultivos en superficie se utilizan ampliamente además de los cultivos sumergidos para la producción de enzimas extracelulares fúngicos, y en este caso la masa semisólida de la post-fermentación se extrae usualmente con agua antes de ser filtrada. El sobrenadante o filtrado que contiene el enzima(s) se concentra y se vende como una preparación enzimática líquida normalizada que contiene conservantes y/o estabilizantes, o se precipita, se seca y se muele con objeto de obtener el enzima en forma de polvo o de gránulos.

En general, la recuperación de los enzimas extracelulares industriales no exige una etapa de fraccionamiento del enzima. Muchos caldos de cultivo con enzimas extracelulares contienen diversos enzimas contaminantes, además del de mayor actividad, mejorando las prestaciones del producto. Por ejemplo, las proteasas, hemicelulasas, celulasas y otros enzimas, presentes en las preparaciones de amiloglucosidasa fúngica, pueden incrementar los rendimientos de alcohol obtenidos en la fermentación de la pasta de cereales tratada con  $\alpha$ -amilasa/amiloglucosidasa. En un pequeño número de casos los enzimas contaminantes reducen la eficacia de los enzimas extracelulares en las aplicaciones industriales específicas, por lo que deben ser desnaturalizados o separados, del filtrado. Por ejemplo, la transglucosidasa contaminante, presente en las preparaciones de amiloglucosidasa bruta, cataliza la conversión de glucosa en isomaltosa y panosa durante el proceso de sacarificación del almidón, reduciendo obviamente el rendimiento de glucosa producido, y en las fermentaciones alcohólicas también reduce el rendimiento final de etanol, puesto que la isomaltosa y la panosa no fermentan. Sin embargo, este enzima puede separarse de la preparación de amiloglucosidasa mediante adsorción con bentonita. La amiloglucosidasa destinada a la obtención de cerveza baja en carbohidratos no debería tener una actividad de proteasa apreciable, puesto que podría influir en la reducción de la espuma del producto final y producir un exceso de nitrógeno  $\alpha$ -amino que favorecería la contaminación de la cerveza durante su almacenamiento.

El proceso de fermentación para la producción de enzimas intracelulares debe finalizar antes de que comience la lisis celular, que daría lugar a la salida del enzima al medio. El aislamiento de enzimas intracelulares implica la ruptura de la célula seguido por el empleo de una combinación apropiada de técnicas bioquímicas de purificación para recuperar el enzima intracelular con unas especificaciones dadas. Con frecuencia los enzimas clínicos se utilizan para determinar la concentración de sustrato mediante procedimientos de análisis acoplados que necesitan varios enzimas y cofactores, midiéndose finalmente el NAD o NADP oxidado o reducido por espectrofotometría a 340 nm. Aunque las especificaciones para estos enzimas incluyen unos valores mínimos de la actividad específica del enzima, son mucho más importantes factores como los máximos niveles de contaminantes permisibles, que podrían dar lugar a falsos posi-

os. Por ejemplo la glucosa puede medirse con un sistema de análisis acoplado con hexoquinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, puesto que la oxidación de la glucosa da lugar a la producción cuantitativa de NADH reducido, que puede medirse espectrofotométricamente. En este caso, los enzimas contaminantes glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfogluconato deshidrogenasa, ATP-asa y ADH oxidasa podrían interferir con el análisis enzimático acoplado y por tanto deberían encontrarse en cantidades despreciables en las preparaciones enzimáticas destinadas a diagnósticos clínicos.

Los procesos para la producción de microorganismos para llevar a cabo biotransformaciones con células deben tener en cuenta una serie de consideraciones. Por ejemplo, la presencia de enzimas que den lugar a reacciones laterales deseables o a la degradación del producto que se desea obtener debe minimizarse. En los casos en los que los enzimas indeseables no sean necesarios para el crecimiento y metabolismo celular se pueden utilizar técnicas de mutación y selección para eliminarlos del organismo. Sin embargo, cuando estos enzimas son necesarios para el crecimiento, pueden emplearse métodos físicos (calor) o químicos (tratamiento con álcalis, ácidos, solventes, inhibidores, detergentes, etc) para suprimir su actividad enzimática por inactivación o inhibición antes de la etapa de biotransformación. Finalmente podría ser necesario modificar la permeabilidad celular para permitir unas velocidades adecuadas de difusión del sustrato y el producto al/y desde el centro de actividad enzimática, lo que a veces se consigue por disrupción de la membrana con acetona o tolueno.

#### PROCESOS DE INMOVILIZACION DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas dentro de la célula huésped fue la técnica utilizada en el primer proceso comercial basado en la glucosa isomerasa. Las células de *Streptomyces* que contenían el enzima se calentaban durante cierto período de tiempo para desnaturalizar los enzimas autolíticos, estabilizar las células y hacerlas permeables a las moléculas pequeñas. Otro método industrial se basaba en el empleo de agentes floculantes para fijar la glucosa isomerasa dentro de las células de *Arthrobacter*. Estas preparaciones enzimáticas se transforman en gránulos con objeto de ser usadas en reactores enzimáticos. La glucosa isomerasa también puede fijarse dentro de las células mediante un aldehído bifuncional reactivo de entrecruzamiento, como el glutaraldehído. En otros procesos para la producción de glucosa isomerasa inmovilizada industrial las células microbianas que contienen el enzima se fijan con glutaraldehído y se atrapan en gelatina.

También se han utilizado procesos de atrapado en fibras, con materiales como el triacetato de celulosa, para atrapar enzimas aislados para uso industrial.

Entre los enzimas comerciales inmovilizados de esta forma se encuentran la glucosa isomerasa, la amiloacilasa y la  $\beta$ -galactosidasa. La glucosa isomerasa inmovilizada se preparó comercialmente por adsorción del enzima de *Streptomyces* en DEAE-celulosa y en alúmina. La primera aplicación a gran escala de los enzimas inmovilizados consistió en el empleo de amiloacilasa fúngica unida a DEAE-Sephadex para la resolución de los acil-D,L-aminoácidos sintetizados químicamente.

#### BIOSINTESIS DE ENZIMAS MICROBIANOS

Los organismos más importantes utilizados en la producción de enzimas extracelulares industriales son los *Bacillus* y los *Aspergillus*, que en conjunto representan del 80 al 85 % del mercado de enzimas extracelulares. Actualmente, los *Trichoderma reesei* son los principales productores industriales de celulasas, que, aunque en estos momentos tengan un mercado pequeño, su potencial comercial futuro puede ser extremadamente grande, superando quizás a los demás enzimas combinados, si pudieran solucionarse los problemas técnicos actuales asociados con la hidrólisis de la lignocelulosa. Las glucosa isomerases se producen a partir de especies de *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Actinoplanes* para la manufactura de jarabes de fructosa.

En el Capítulo 2 ya se han tratado los aspectos generales de la inducción y represión de la síntesis y mecanismos de secreción enzimática. Un dato a recordar de muchos enzimas extracelulares es el de la gran estabilidad de sus RNA mensajeros, lo que puede estar asociado con la necesidad de transportar el mRNA del centro de síntesis a los centros de traslación de la superficie interna de la membrana citoplásmica. La observación de que las células productoras de proteasas parecen ser capaces de acumular grandes cantidades de mRNA específico de las proteasas ha sido en parte atribuida a la relativamente larga vida de reducción a la mitad del mRNA específico de las proteasas.

Las amilasas y proteasas importantes comercialmente de *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* se producen intrínsecamente, es decir, la velocidad de síntesis del enzima es relativamente constante, con independencia del sustrato presente en el medio de fermentación. Los enzimas extracelulares inducibles tienden a sintetizarse a velocidades basales bajas en ausencia de sustrato, aunque mediante inducción la velocidad de síntesis puede incrementarse varios miles de veces. Aunque la maltosa parece ser el mejor inductor de la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae*, también el almidón, la glucosa y otros muchos  $\alpha$ -D-glucósidos pueden inducirla. El almidón, la maltosa y la glucosa estimulan la producción de amiloglucosidasa por el *A. niger*. Está claro que estos enzimas no experimentan la represión por el catabolito por la glucosa. Aunque la celulosa induce al com-

plejo celulasa de *T. reesei*, el verdadero inductor es probablemente la celobiosa. La lactosa es un inductor de las celulasas de *T. reesei* y también sirve como fuente de carbono para el crecimiento. Las especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* producen celobiasas ( $\beta$ -glucosidasas) extracelulares que son inducidas por muchos  $\beta$ -glucósidos incluyendo la celulosa aunque no la celobiosa. Estos organismos también sintetizan  $\beta$ -glucosidasas intracelulares intrínsecamente. La producción de poligalacturonasa por *A. niger* está potenciada por la presencia de sustancias pécticas en el medio de crecimiento.

La síntesis de muchos enzimas extracelulares está controlada por la represión por el catabolito o el producto final. Las  $\alpha$ -amilasas de algunas cepas de *B. licheniformis* experimentan represión por el catabolito por los productos finales mayoritarios de la hidrólisis del almidón con  $\alpha$ -amilasa. La glucosa causa la represión por el catabolito de las celulasas de *T. reesei*, y también reprime la síntesis de celobiohidrolasa y endoglucanasa en presencia de celulosa y otros inductores. Las  $\beta$ -glucosidasas intracelulares intrínsecas producidas por *Trichoderma* y *Aspergillus* son relativamente insensibles a la represión por el catabolito. La producción de poligalacturonasa por *A. niger* está reprimida por el catabolito por la glucosa. La síntesis de proteasas intrínsecas por las especies de *Bacillus*, también es sensible a la represión por el producto final; el glutamato y el aspartato reprimen la síntesis de proteasas por *B. subtilis* y la secreción de proteasas por *B. licheniformis*.

Los modelos clásicos de regulación por el operón para la inducción y represión enzimática se refieren a *Escherichia coli* (véase Capítulo 2). No obstante, las evidencias actuales sugieren que el control de la síntesis de enzimas extracelulares se ejerce primeramente al nivel de la transcripción y que el modelo del operón para la regulación de genes es aplicable a estos sistemas, lo que ha sido confirmado en el caso de la síntesis de penicilinas por *B. licheniformis*. En la mayoría de los casos los operones de los enzimas extracelulares parecen consistir en un único gen estructural en vez de los típicos cluster o genes estructurales que codifican una serie de enzimas en una ruta metabólica. Aunque el cAMP es el principal mediador de la represión por el catabolito en las bacterias entéricas, tales moléculas están ausentes de las cepas de *Bacillus* examinadas hasta la fecha y el mecanismo de la represión por el catabolito permanece oscuro, especulándose que el guanosin-3',5'-monofosfato cíclico puede ser el efector en *B. licheniformis*. Aunque la regulación de la transcripción parece ser el principal punto de control de la síntesis de proteínas eucariotas, la expresión del gen es más compleja que en las bacterias, al procesarse un RNA transcrito de peso molecular elevado, con lo que algunos segmentos (intrones) se eliminan y las secuencias remanentes (exones) se empalman juntas para producir el mRNA que se traduce y que es posteriormente modificado en cada extremo.

La síntesis de enzimas extracelulares está usualmente asociada con la fase de crecimiento exponencial o post-exponencial. En casi todas las condiciones de crecimiento, las especies de *Bacillus* producen proteasas extracelulares durante la fase de crecimiento post-exponencial. La síntesis de la  $\alpha$ -amilasa por *B. licheniformis* y *A. oryzae* ocurre durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que en *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* el enzima se produce en la fase post-exponencial. Se ha postulado que cuando los enzimas se producen en esta fase la desrepresión se debe a la modificación de la especificidad de la RNA polimerasa, a través de la modulación de una pequeña molécula efectora o mediante cambios en la composición de la RNA polimerasa, asociados a veces con sucesos tales como la esporulación.

### Enzimas recombinantes

Las técnicas de ingeniería genética han dado lugar al desarrollo de un cierto número de productos para la industria farmacéutica. Como los enzimas son productos directos de genes son buenos candidatos para mejorar su producción a través de la ingeniería genética. Entre los beneficios que se espera obtener en los procesos útiles comercialmente se incluyen: (a) los menores costos en la producción de enzimas, (b) la producción de enzimas en organismos considerados generalmente como seguros (GRAS) aptos para ser utilizados en la industria alimentaria, (c) modificaciones genéticas específicas al nivel del DNA para mejorar las propiedades del enzima, como la estabilidad térmica y otras características particulares.

En *E. coli* se ha conseguido un alto nivel de expresión con muchas proteínas extrañas en forma de gránulos. Los gránulos se aíslan simplemente para purificar el producto recombinante clonado, por lo que es necesaria su disolución con detergentes o agentes desnaturalizantes, con la consiguiente desventaja de que una etapa de replegamiento que renaturalice la proteína nativa reduce substancialmente el rendimiento, elevando los costos. Las investigaciones recientes han hecho hincapié en el clonado de vectores de la secreción en *E. coli* que capaciten la secreción de la proteína extraña con eliminación de un péptido señal por las peptidasas señal presentes en *E. coli*.

Para la producción masiva de enzimas, quizás la solución final consista en obtener mediante ingeniería genética enzimas útiles a partir de nuevas fuentes en los organismos claves actuales de la industria de los enzimas, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *A. niger*, etc.

Las cepas del género *Bacillus* han sido utilizadas con éxito como huéspedes para la producción de proteínas importantes producidas mediante tecnología DNA recombinante, encontrándose dificultades con la estabilidad de los plásmidos, puesto que los DNA plásmidos pueden no segregarse de forma paritaria entre las células hijas durante la división celular, lo que puede dar lugar a la formación de células hijas sin plásmidos que tienen un crecimiento ventajoso respecto que no gastan energía en la formación de producto. Además con frecuencia puede ocurrir la delección estructural de los plásmidos. Los *Bacillus* clonados podrían contener niveles bajos de proteasa con objeto de reducir la degradación proteolítica de proteínas extrañas. Una vez resueltos estos problemas, las cepas de *Bacillus* pueden volverse huéspedes ideales para la producción extracelular de proteínas heterólogas que no precisen la glicosilación post-transaccional.

Los hongos filamentosos, por ejemplo *A. niger*, pueden producir hasta 20% de enzima a partir de una única copia del gen de la glucoamilasa; también pueden modificarse mediante ingeniería genética de forma que expresen y secreten proteínas de origen bacteriano. Además se ha indicado que los procesos básicos de secreción de los sistemas de mamíferos y de hongos son muy similares. Aunque sea necesario un mayor conocimiento de las rutas de glicosilación en estas células eucariotas, los sistemas fúngicos ofrecen un mayor potencial para la síntesis y secreción de grandes cantidades de proteínas de mamíferos.

Los *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de expresar, glicosilar y excretar enzimas a partir de hongos y de otros eucariotas, por ejemplo la glucoamilasa de *Aspergillus*. Sin embargo, los *Saccharomyces* no procesan correctamente los intrones de los genes fúngicos de forma que debe utilizarse un gen libre de intrones. Las especies de *Aspergillus* son, sin embargo, mucho mejores que las levaduras a elevados niveles de expresión.

Las bacterias se pueden expresar a niveles elevados. Las bacterias Gram-negativas no son en general buenas secretoras de proteínas extracelulares en tanto que las Gram-positivas son significativamente mejores. Algunos de los problemas planteados en la secreción pueden superarse mediante el diseño particular de secuencias señal. Los hongos filamentosos no tienen capacidad para producir proteínas heterólogas a las velocidades de síntesis elevadas observadas para las proteínas homólogas.

La superación de las barreras que impiden la manipulación de organismos recombinantes para producir y secretar cantidades altas de proteínas heterólogas es una prioridad esencial para que la tecnología de DNA recombinante pueda aplicarse a la producción de diversos productos proteicos, incluyendo enzimas industriales.

## Capítulo 12

### Tratamiento de residuos

#### Introducción

La mayor escala de los procesos de fermentación microbiana controlados al menos parcialmente es la del tratamiento de efluentes. Tradicionalmente, el objetivo del proceso de tratamiento de desechos consiste en la reducción de la concentración de materia orgánica de las aguas residuales y en la disminución del número de patógenos potenciales del agua, de forma que el efluente pueda ser vertido con seguridad al medio ambiente.

La materia orgánica contenida en los desechos domésticos, agrícolas e industriales es la principal causa de la contaminación, puesto que al ser metabolizada por los organismos presentes en las aguas receptoras, causa la rápida caída de la concentración del oxígeno y la eliminación de la flora y la fauna acuática natural. El contenido de materia orgánica en los desechos puede determinarse mediante tres análisis. Los análisis de demanda química de oxígeno (COD) y de carbono orgánico total (TOC) miden el contenido de carbono orgánico mediante oxidación química y pirólisis, respectivamente, detectando el CO<sub>2</sub> por infrarrojos. La demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) determina la fracción de desechos que son oxidables biológicamente mediante un proceso de incubación durante 5 días con un inóculo apropiado. La medida del contenido de sólidos suspendidos en las aguas residuales mediante métodos turbidométricos y de filtración, permite clasificar los contaminantes en aquellos que obstaculizan el paso

Las cepas del género *Bacillus* han sido utilizadas con éxito como huéspedes para la producción de proteínas importantes producidas mediante tecnología de DNA recombinante, encontrándose dificultades con la estabilidad de los plásmidos, puesto que los DNA plásmidos pueden no segregarse de forma paritaria entre las células hijas durante la división celular, lo que puede dar lugar a la formación de células hijas sin plásmidos que tienen un crecimiento ventajoso puesto que no gastan energía en la formación de producto. Además con frecuencia puede ocurrir la delección estructural de los plásmidos. Los *Bacillus* clonados podrían contener niveles bajos de proteasa con objeto de reducir la degradación proteolítica de proteínas extrañas. Una vez resueltos estos problemas, las cepas de *Bacillus* pueden volverse huéspedes ideales para la producción extracelular de proteínas heterólogas que no precisen la glicosilación post-translacional.

Los hongos filamentosos, por ejemplo *A. niger*, pueden producir hasta 20 g/l de enzima a partir de una única copia del gen de la glucoamilasa; también pueden modificarse mediante ingeniería genética de forma que expresen y secreten proteínas de origen bacteriano. Además se ha indicado que los procesos básicos de secreción de los sistemas de mamíferos y de hongos son muy similares. Aunque sea necesario un mayor conocimiento de las rutas de glicosilación en estas células eucariotas, los sistemas fúngicos ofrecen un mayor potencial para la síntesis y secreción de grandes cantidades de proteínas de mamíferos.

Los *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de expresar, glicosilar y excretar enzimas a partir de hongos y de otros eucariotas, por ejemplo la glucoamilasa de *Aspergillus*. Sin embargo, los *Saccharomyces* no procesan correctamente los intrones de los genes fúngicos de forma que debe utilizarse un gen libre de intrones. Las especies de *Aspergillus* son, sin embargo, mucho mejores que las levaduras a elevados niveles de expresión.

Las bacterias se pueden expresar a niveles elevados. Las bacterias Gram-negativas no son en general buenas secretoras de proteínas extracelulares en tanto que las Gram-positivas son significativamente mejores. Algunos de los problemas planteados en la secreción pueden superarse mediante el diseño particular de secuencias señal. Los hongos filamentosos no tienen capacidad para producir proteínas heterólogas a las velocidades de síntesis elevadas observadas para las proteínas homólogas.

La superación de las barreras que impiden la manipulación de organismos recombinantes para producir y secretar cantidades altas de proteínas heterólogas es una prioridad esencial para que la tecnología de DNA recombinante pueda aplicarse a la producción de diversos productos proteicos, incluyendo enzimas industriales.

## Capítulo 12

### Tratamiento de residuos

#### Introducción

La mayor escala de los procesos de fermentación microbiana controlados al menos parcialmente es la del tratamiento de efluentes. Tradicionalmente, el objetivo del proceso de tratamiento de desechos consiste en la reducción de la concentración de materia orgánica de las aguas residuales y en la disminución del número de patógenos potenciales del agua, de forma que el efluente pueda ser vertido con seguridad al medio ambiente.

La materia orgánica contenida en los desechos domésticos, agrícolas e industriales es la principal causa de la contaminación, puesto que al ser metabolizada por los organismos presentes en las aguas receptoras, causa la rápida caída de la concentración del oxígeno y la eliminación de la flora y la fauna acuática natural. El contenido de materia orgánica en los desechos puede determinarse mediante tres análisis. Los análisis de demanda química de oxígeno (COD) y de carbono orgánico total (TOC) miden el contenido de carbono orgánico mediante oxidación química y pirólisis, respectivamente, detectando el CO<sub>2</sub> por infrarrojos. La demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) determina la fracción de desechos que son oxidables biológicamente mediante un proceso de incubación durante 5 días con un inóculo apropiado. La medida del contenido de sólidos suspendidos en las aguas residuales mediante métodos turbidométricos y de filtración, permite clasificar los contaminantes en aquellos que obstaculizan el paso

**Tabla 12.1.** Etapas que pueden incluirse en el tratamiento microbiológico aerobio de desechos

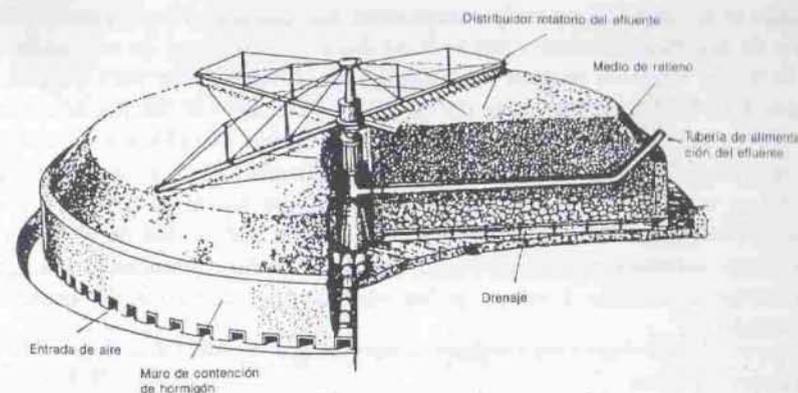
1. Adsorción de sustrato a la superficie biológica
2. Degradación del sustrato adsorbido mediante enzimas extracelulares
3. Absorción celular de materiales disueltos
4. Excreción de los productos de ruptura
5. Lisis celular e ingestión por una población celular secundaria

de la luz (que afectan al crecimiento de las algas) o los que producen deposición de sólidos (que afectan la vida del fondo del río). Aunque el nitrógeno es un nutriente esencial en los procesos de tratamiento de desechos, el amoníaco residual puede ser tóxico para la vida acuática. Los productos de oxidación del ión amonio pueden dar lugar al crecimiento excesivo de las algas y, en los casos en los que se recicle el agua para volver a ser utilizada a nivel doméstico, el nitrato puede ser tóxico para los niños.

### Sistemas de tratamiento de desechos

Las aguas residuales son normalmente complejas en composición por lo que se necesitan plantas de tratamiento de desechos que incluyan microorganismos capaces de metabolizar los diversos materiales de desecho de tal forma que el efluente pueda ser descargado al medio ambiente sin causar efectos adversos. La mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas y también muchos sistemas de tratamiento de aguas residuales de las industrias químicas y alimentarias incluyen tres o cuatro etapas básicas: una primera etapa en la que se separan las arenas y los demás sólidos, que se llevan a un digestor de lodos; una segunda etapa de aireación para degradar los compuestos orgánicos disueltos y algunos sólidos suspendidos mediante el metabolismo microbiano; una etapa de separación de fósforo y nitrógeno con una precipitación química opcional; y una etapa de digestión anaerobia para reducir el volumen de los lodos y generar metano.

Existen sistemas sencillos, como los estanques y las acequias de oxidación, para la eliminación de residuos agrícolas mediante métodos aerobios. Sin embargo, particularmente para las granjas ganaderas intensivas, tiene considerable interés el desarrollo de unidades de digestión anaerobias para la digestión del estiércol.



**Fig. 12.1.** Filtro percolador (reproducido con permiso de Abson y Todhunter, 1967).

### TRATAMIENTO AEROBIO DE RESIDUOS

En la Tabla 12.1 se resumen las etapas incluidas en los tratamientos microbiológicos aerobios de residuos. Existen dos tipos principales de sistemas, los procesos con filtros percoladores y los procesos de lodos activados.

#### Filtros percoladores

Un filtro percolador sencillo típico consiste en un tanque cilíndrico de unos 10 m de diámetro y 2,5 m de profundidad, relleno con un lecho poroso de piedras o de otro soporte, y equipado con un sistema de drenaje en el fondo (Fig. 12.1). A medida que el efluente va goteando a través del lecho, en la superficie del soporte se van formando capas de lodo biológico. El aire fluye de forma ascendente a través del lecho y permite la oxidación biológica de los desechos. El excesivo crecimiento de los microorganismos en el filtro restringe la respiración y el flujo, causando el bloqueo y el fallo del filtro, por lo que alternando sistemas de penetración doble, en los que el flujo de efluente se invierte periódicamente, se consigue mejorar la eficacia del filtro medida como eliminación de la DBO.

#### Lodos activados

El sistema alternativo más común al filtro percolador es el proceso de lodos activados, consistente en el mezclado con aireación y agitación por difusión desde el fondo o agitación superficial (véase Fig. 9.3). El efluente parcialmente clari-

leado se dirige hacia un recipiente aireado que contiene una suspensión floculada de microorganismos y allí se airea durante un tiempo de residencia de 4 a 10 horas. Después se pasa a un tanque de sedimentación para eliminar los lodos activos floculados, parte de los cuales se reciclan al tanque de aireación y se mezclan con los desechos que entran, mientras que el resto se desagua y se seca para desecharse o utilizarse como fertilizante. El sistema de lodos activados es un tratamiento de desechos más potente que el de filtración puesto que puede tratar mucha mayor carga de efluente por unidad de volumen que los filtros percoladores. Sin embargo, los costos de funcionamiento son significativamente mayores a causa de las operaciones necesarias de aireación y mezclado.

#### Avances recientes

El diseño de una planta de tratamiento aerobio de desechos se basa en la optimización de las condiciones de fermentación considerando los desechos, la población microbiana y el aireado. Normalmente, el factor limitante es la velocidad de aireación. El empleo de medios de soporte plásticos ligeros, moldeados para optimizar el área superficial y la ventilación, ha facilitado el desarrollo de plantas con filtros percoladores compactos que no necesitan muros de contención importantes.

Otro avance reciente es el uso de discos rotatorios sumergidos aproximadamente en un 50 % de forma que la película microbiana va alternando lentamente su exposición al líquido y al aire ambiente. Una unidad típica de 7,5 m de longitud y 3,5 m de diámetro puede tener un área superficial de 9.500 m<sup>2</sup> para el crecimiento biológico. Este contactor biológico rotatorio tiene unas características similares a los filtros percoladores.

La disponibilidad de oxígeno barato ha conducido al diseño de plantas de lodos activados cerradas modificadas que utilizan oxígeno puro para conseguir concentraciones de oxígeno disuelto más altas, operando a concentraciones de biomasa más altas y tiempos de residencia menores sin pérdida de eficacia (Fig. 12.2). También se ha diseñado una planta de tratamiento de desechos aireada eficazmente basada en los principios del fermentador agitado por aire, que contiene un tubo de retorno interno (véase Fig. 3.10); los desechos entrantes, los lodos reciclados y el aire se inyectan en la sección de flujo descendente y las burbujas de aire se inyectan en la sección de flujo ascendente, con objeto de reducir la densidad en esta zona. El gradiente de densidad entre los líquidos ascendente y descendente por encima del punto de inyección de aire, es el responsable de la circulación del líquido.

Recientemente se han diseñado sistemas de tratamiento aerobio de desechos con lecho fluidizado que en esencia combinan los principios de operación de los filtros percoladores con los sistemas de lodos activados, empleándose so-

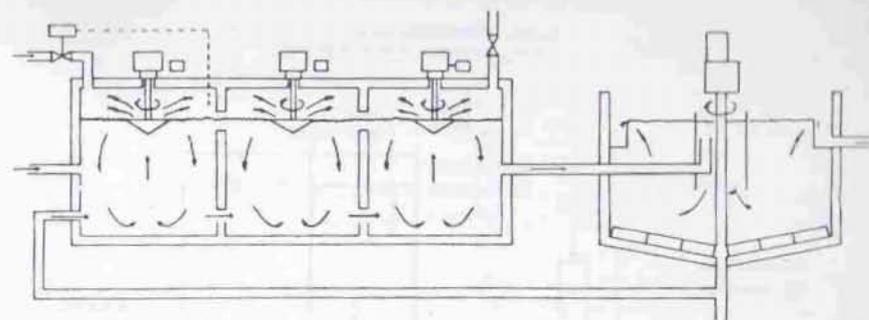


Fig. 12.2. Planta de lodos cerrada activada con oxígeno puro (reproducida con permiso de Wheatley, 1984).

portes biológicos como plástico o arena para los materiales biológicos; la fluidización se consigue mediante inyección de aire u oxígeno en el fondo del lecho (Fig. 12.3), pudiendo mantenerse concentraciones de biomasa elevadas. Estos nuevos sistemas son prometedores para la eliminación intensiva de desechos.

#### TRATAMIENTO ANAEROBIO DE DESECHOS

La digestión anaerobia de desechos, que se originó con el empleo de fosas sépticas, se basa actualmente en digestores de velocidad elevada. Entre las ventajas de los sistemas anaerobios respecto a los aerobios se encuentran la menor potencia necesaria por unidad de DBO tratada, la capacidad de carga del digestor, la producción de gas natural como producto final y la producción de un volumen de biomasa a eliminar más reducido. A pesar de estas ventajas, no es posible obtener la degradación total de los desechos mediante este método, siendo necesario complementarlo con métodos aerobios para mejorar su eficacia.

En la Figura 12.4 se muestran las secuencias biológicas seguidas por los desechos en la degradación anaerobia para producir metano y dióxido de carbono. Estos procesos dependen del desarrollo de una comunidad bacteriana interdependiente compleja basada en tres grupos microbianos: el grupo fermentativo hidrolítico, el acetogénico hidrogénico y el metanogénico hidrogenotrófico. Las bacterias fermentativas hidrolíticas convierten los polímeros complejos en azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes y ésteres, generando dióxido de carbono e hidrógeno. Las bacterias acetogénicas hidrogénicas transforman los productos de fermentación del primer grupo en acetato, dióxido de carbono e hidrógeno, y las metanógenas convierten el acetato y el hidrógeno en metano y dióxido de carbono.

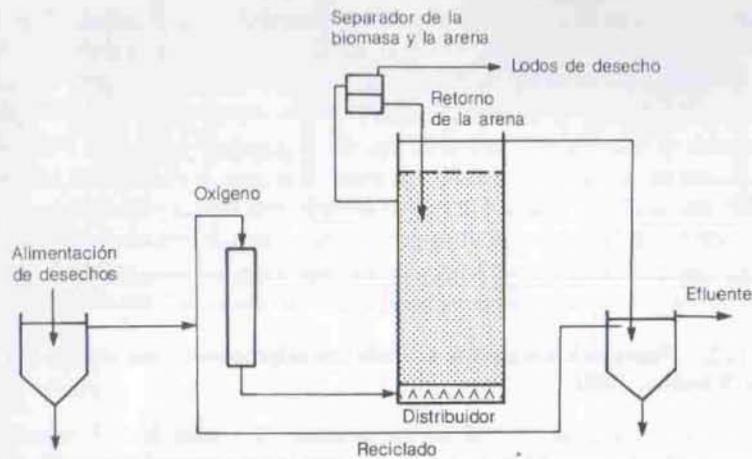


Fig. 12.3. Planta de tratamiento de residuos con lecho fluidizado aireado con oxígeno que utiliza como soporte partículas de arena (reproducido con permiso de Wheatley, 1984).

Las metanógenas, sensibles a la acumulación de hidrógeno y al exceso de carga, crecen lentamente y motivan la mayoría de los problemas operacionales asociados con los sistemas de digestión anaerobios. Sólo a presiones parciales de hidrógeno inferiores a  $10^{-3}$  atm pueden degradarse los carbohidratos en condiciones anaerobias. Los metanógenos hidrogenotróficos, que son los responsables de la eliminación del hidrógeno, tienen un tiempo estimado de duplicación de 8 a 10 horas en tanto que las bacterias hidrolíticas formadoras de ácido tienen un tiempo de duplicación de unos 30 minutos. Una situación que condujera al declive de la población de metanógenos y al aumento relativo de las bacterias hidrolíticas puede desembocar en la acumulación de hidrógeno. En presencia de una concentración creciente de hidrógeno, el metabolismo de las bacterias formadoras de ácido se altera, produciéndose ácido propiónico, butírico, caproico, valérico y láctico en vez de acetato e hidrógeno. Por consiguiente, aunque la sobrecarga de la digestión viene indicada por un aumento de la concentración de hidrógeno y ciertos ácidos, la monitorización continua de estos metabolitos puede utilizarse para controlar la velocidad de alimentación.

#### Diseño de un reactor anaerobio

En la Figura 12.5 se muestran los diseños básicos de algunos de los reactores anaerobios. El digestor convencional (a) es un sistema de mezcla completa sin

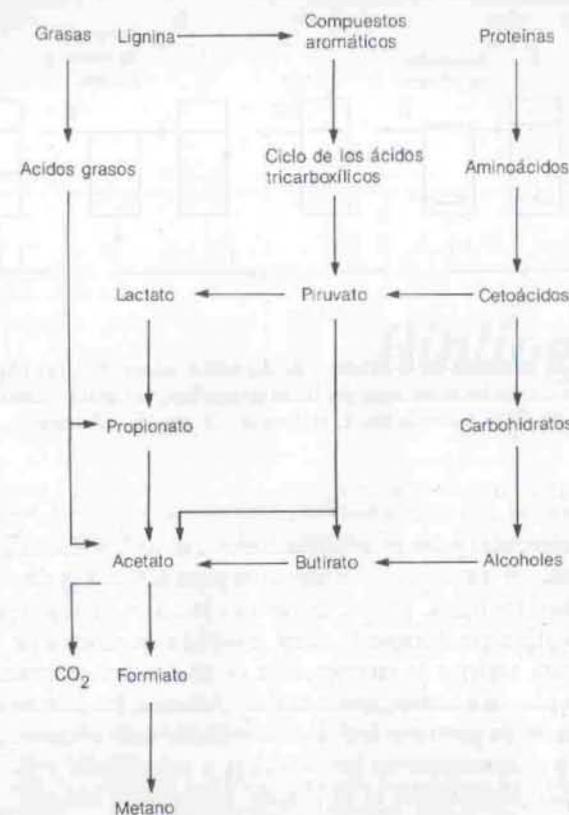


Fig. 12.4. Metabolismo anaerobio de diversos compuestos hasta metano y dióxido de carbono.

reciclado de biomasa con una eficacia baja en cuanto al tratamiento de desechos. Los sistemas (b) a (e) retienen concentraciones de biomasa elevadas dentro del reactor, el (b) recuperando y reciclando la corriente de efluente, el (c) por floculación y los (d) y (e) por unión de la película microbiana a un soporte.

#### Inóculos microbianos y enzimas para el tratamiento de desechos

Durante los últimos 10 años se han desarrollado una serie de inóculos microbianos y aditivos enzimáticos para el tratamiento de desechos. Los enzimas

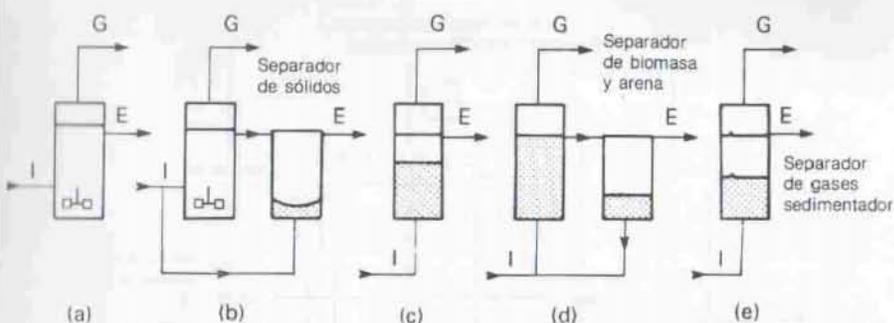


Fig. 12.5. Reactor utilizado en el proceso de digestión anaerobia. (a) Digestor estándar; (b) proceso de contacto anaerobio; (c) filtro anaerobio; (d) lecho fluidizado; (e) tipo todos anaerobios de flujo ascendente. I, influente; G, gas; E, efluente.

microbianos comerciales y los microorganismos que los producen pueden añadirse a los sistemas de tratamiento de efluentes para acelerar la descomposición de la celulosa, hemicelulosa, grasas, proteínas, etc. Los inóculos microbianos también pueden utilizarse durante la etapa inicial de un sistema de tratamiento de desechos o para acelerar la recuperación de un sistema colapsado por una carga excesiva o por una alimentación tóxica. Además, las nuevas técnicas genéticas son capaces de producir inóculos con cepas más eficaces que puedan digerir aerobias o anaerobias los desechos a velocidades más rápidas que sus contrapartidas presentes en la población microbiana natural.

Además de las aplicaciones de los inóculos en el tratamiento de residuos agrícolas y urbanos, hay un substancial interés en el empleo de sistemas biológicos para la degradación de hidrocarburos y compuestos químicos resistentes. Los inóculos microbianos son adecuados para la degradación de crudos y ciertos materiales tóxicos, como el fenol. En la actualidad los métodos de aislamiento de cultivos microbianos enriquecidos, así como las investigaciones sobre manipulación genética se dirigen hacia el desarrollo de cepas microbianas adecuadas para la degradación de compuestos como colorantes azoicos, estilbenos, compuestos clor aromáticos, hidrocarburos clorados y DDT.

## Bibliografía

- Abson, J.W. and Todhunter, K.H. (1967). Effluent disposal, in *Biochemical and Biological Engineering Science*, Vol. 1. Ed. Blakebrough, N., pp. 310-343. London, Academic Press.
- Adler-Nissen, J. (1987). Newer uses of microbial enzymes in food processing, *Tibtech* 5, 170-174.
- Aharonowitz, Y. and Cohen, G. (1981). The microbial production of pharmaceuticals, *Scientific American* 245, 141-152.
- Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K. and Yamada, H. (eds.) (1986). *Biotechnology of Amino Acid Production. Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 24. Amsterdam, Elsevier.
- Anderson, C. and Solomons, G.L. (1984). Primary metabolism and biomass production from *Fusarium*, in *The Applied Mycology of Fusarium*, Eds. Moss, M.O. and Smith, J.E., (British Mycological Society Symposium No. 7) pp. 231-250. Cambridge, Cambridge University Press.
- Anderson, L.A., Phillipson, J.D. and Roberts, M.F. (1985). Biosynthesis of secondary products by cell cultures of higher plants, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 31. Ed. Fiechter, A., pp. 1-36. Berlin, Springer-Verlag.
- Atkinson, B. and Mavituna, F. (1983). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. London, Macmillan.
- Axelsson, H.A.C. (1985). Centrifugation, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Ed. Moo-Young, M., pp. 325-350. Oxford, Pergamon.
- Bacus, J. (1984). Update: meat fermentation 1984, *Food Technology* 38 (6), 59-63.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd Edition. New York, McGraw-Hill.
- Belter, P.A. (1985). Ion exchange recovery of antibiotics, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Ed. Moo-Young, M., pp. 473-487. Oxford, Pergamon.
- Benda, I. (1982). Wine and brandy, in *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th Edition. Ed. Reed, G., pp. 293-402. Westport, AVI Publishing Co.
- Bernstein, S., Tzeng, C.H. and Sisson, D. (1977). The commercial fermentation of cheese

- whey for the production of protein and/or alcohol, in *Single Cell Protein from Renewable and Nonrenewable Resources, Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 7. Eds. Humphrey, A.E. and Gaden (Jr.), E.L., pp. 1-9. New York, Wiley.
- Berry, D.R. (1984). The physiology and microbiology of Scotch whisky production, in *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 19. Ed. Bushell, M.E., pp. 199-244. Amsterdam, Elsevier.
- Best, D.J., Jones, J. and Stafford, D. (1985). The environment and biotechnology, in *Biotechnology, Principles and Applications*. Eds. Higgins, I.J., Best, D.J. and Jones, J., pp. 213-256. Oxford, Blackwell Scientific.
- Beuchat, L.R. (1984). Fermented soybean foods, *Food Technology* 38 (6), pp. 64-70.
- Boeriu, C.G., Dordick, J.S. and Klibanov, A.M. (1986). Enzymatic reactions in liquid and solid paraffins: application for enzyme-based temperature sensors, *Bio/Technology* 4, 99-103.
- Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M. and Dunnill, P. (1986). Protein purification: the right step at the right time, *Bio/Technology* 4, 954-958.
- Brierley, C.L., Kelly, D.P., Seal, K.J. and Best, D.J. (1985). Materials and biotechnology, in *Biotechnology, Principles and Applications*. Eds. Higgins, I.J., Best, D.J. and Jones, J., pp. 163-212. Oxford, Blackwell Scientific.
- British Valve Manufacturers Association (1966). *Technical Reference Book on Valves for the Control of Fluids*. Oxford, Pergamon Press.
- Brock, T.D. (1986). *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology*. New York, Wiley.
- Buckland, B. (1985). Fermentation exhaust gas analysis using mass spectrometry, *Bio/Technology* 3, 982-988.
- Bull, D.N. (1985). Instrumentation for fermentation process control, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Ed. Moo-Young, M., pp. 149-163. Oxford, Pergamon.
- Bull, D.N., Thoma, R.W. and Stinnett, T.E. (1983). Bioreactors for submerged culture, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 1. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 1-30. New York, Alan R. Liss.
- Bulloch, W. (1979). *The History of Bacteriology*. New York, Dover.
- Bu'Lock, J.D., Detroy, R.W., Hostalek, Z. and Munin-Al-Shakarchi, A. (1974). Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, *Transactions of the British Mycological Society* 62, 377-389.
- Bylinsky, G. (1987). Coming: star wars medicine, *Fortune* 115(9), pp. 153-165.
- Cantell, K., Hirvonen, S., Kauppinen, H.L. and Myllyla, G. (1981). Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. *Methods in Enzymology*, Vol. 78A. Ed. Pestka, S. pp. 27-38. New York, Academic Press.
- Carleysmith, S.W. and Fox, R.I. (1984). Fermenter instrumentation and control, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 3. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 1-51. New York, Alan R. Liss.
- Commercial Biotechnology, An International Analysis*, (1984). Office of Technology Assessment Report. Washington, US Congress.
- Cooney, C.L. (1981). Growth of microorganisms, in *Biotechnology*, Vol. 1. Eds. Rehm, H.J. and Reed, G., pp. 73-112. Weinheim, Verlag-Chemie.
- Cooney, C.L. (1983). Bioreactors: design and operation, *Science* 219, 728-734.
- Crueger, W. and Crueger, A. (1984). *Biotechnology: a Textbook of Industrial Microbiology*. Madison, Science Tech, Inc.
- Cullen, D. and Leong, S., (1986). Recent advances in the molecular genetics of industrial fungi, *Tibtech* 4, 285-288.

- D'Amore, T. and Stewart, G.G. (1987). Ethanol tolerance of yeast, *Enzyme and Microbial Technology* 9, 322-330.
- Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. (1986). *Molecular Cell Biology*. New York, Scientific American Books.
- Deacon, J.W. (1984). *Introduction to Modern Mycology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Demain, A.L. (1971). Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation, in *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 1. Eds. Ghose, T.K. and Fiechter, A., pp. 113-142. New York, Springer-Verlag.
- Demain, A.L. (1980). The new biology: opportunities for the fermentation industry, in *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vol. 4. Ed. Tsao, G.T., pp. 93-208. Orlando, Academic Press.
- Demain, A.L. and Solomon, N.A. (1981). Industrial microbiology, *Scientific American* 245, 67-75.
- Demain, A.L. and Solomon, N. (1985). *Biology of Industrial Microorganisms*. California, Benjamin/Cummings Co.
- Dimmling, W. (1985). Critical assessment of feedstocks for biotechnology, in *Critical Reviews of Biotechnology*, Vol. 2. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 233-285. Boca Raton, CRC.
- Doelle, H.W., Ewings, K.N. and Hollywood, N.W. (1982). Regulation of glucose metabolism in bacterial systems, in *Advances in Biochemical Engineering*, Vol. 23. Ed. Fiechter, A. pp. 1-35. Berlin, Springer-Verlag.
- Dwyer, J.L. (1984). Scaling up byproduct separation with high performance liquid chromatography, *Bio/Technology* 2, 957-964.
- Eisenbarth, G.S. (1985). Monoclonal antibodies, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 4. Ed. Moo-Young, M., pp. 31-40. Oxford, Pergamon.
- Elander, R.P. (1985). Present and future roles for biotechnology in the fermentation industry, in *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 26. Ed. Underkofler, L.A., pp. 1-21. Arlington, Society for Industrial Microbiology.
- Enders, Jr, G.L. and Kim, H.S. (1985). AgriCultures: beneficial applications for crops and animals, in *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 26. Ed. Underkofler, L.A., pp. 347-376. Arlington, Society for Industrial Microbiology.
- Enei, H., Shibai, H. and Hirose, Y. (1982). Amino acids and nucleic acid-related substances, in *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vol. 5. Ed. Tsao, G.T., pp. 79-100. Orlando, Academic Press.
- Enei, H., Shibai, H. and Hirose, Y. (1985). 5'-Guanosine monophosphate, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 653-658. Oxford, Pergamon.
- Eveleigh, D.E. (1981). The microbial production of industrial chemicals, *Scientific American* 245, 155-178.
- Fassatiava, O. (1968). Moulds and filamentous fungi in technical biology, in *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 22. Amsterdam, Elsevier.
- Fayerman, J.T. (1986). New developments in gene-cloning in antibiotic producing microorganisms, *Bio/Technology* 4, 786-789.
- Fish, N.M. and Lilly, M.D. (1984). The interactions between fermentation and protein recovery, *Bio/Technology* 2, 623-627.
- Flickinger, M. (1985). Anticancer agents, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 231-273. Oxford, Pergamon.
- Flynn, D.S. (1983). Instrumentation and control of fermenters, in *The Filamentous Fungi*, Vol. IV, *Fungal Technology*. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., pp. 77-100. London, Arnold.

- Fogarty, W.M. (1980). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London, Applied Science Publishers.
- Fowler, M.W. and Stepan-Sarkissan, G. (1983). Chemicals from plant cell fermentation, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 2. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 135-158. New York, Alan R. Liss.
- Fujita, Y. and Hara, Y. (1985). The effective production of shikonin by cultures with an increased cell population, *Agricultural and Biological Chemistry* **49**(7), 2071-2075.
- Furuya, A., Abe, S. and Kinoshita, S. (1968). Production of nucleic acid related substances by fermentative processes. XIX. Accumulation of 5'-inosinic acid by a mutant of *Brevibacterium ammoniagenes*, *Applied Microbiology* **16**, 981-987.
- Gaden, E.L. (1981). Production methods in industrial microbiology, *Scientific American* **245**, 181-197.
- Germanier, R. (1984). *Bacterial Vaccines*. Orlando, Academic.
- Glick, B.R. and Whitney, G.K. (1987). Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*, *Journal of Industrial Microbiology* **1**, 277-282.
- Godfrey, T. and Reichelt, J. (1983). *Industrial Enzymology*. New York, Nature Press.
- Greenshields, R.N. (1978). Acetic acid: vinegar, in *Economic Microbiology*, Vol. 2. Ed. Rose, A.H., pp. 121-186. London, Academic Press.
- Grein, A. (1987). Antitumour anthracyclines produced by *Streptomyces peucetius*, in *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 32. Ed. Laskin, A.I., pp. 203-214. Orlando, Academic Press.
- Guthrie, R.K. and Davis, E.M. (1985). Biodegradation in effluents, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 5. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 149-192. New York, Alan R. Liss.
- Hamer, G. (1985). Chemical engineering and biotechnology, in *Biotechnology, Principles and Applications*. Eds. Higgins, I.J., Best, D.J. and Jones, J., pp. 346-414. Oxford, Blackwell Scientific.
- Hamman, J.P. and Calton, G.J. (1985). Immunosorbent chromatography for recovery of protein products, in *Purification of Fermentation Products*. Eds. Le Roith, D., Shiloach, J. and Leahy, T.J., pp. 105-122. ACS Symposium Series 271. Washington, American Chemical Society.
- Hara, Y. and Suga, C. (1986). Method for producing secondary metabolites of plants, EP0071999B1 (European patent).
- Heckendorf, A.H., Ashare, E. and Rausch, C. (1985). Process scale chromatography, in *Purification of Fermentation Products*. Eds. Le Roith, D., Shiloach, J. and Leahy, T.J., pp. 91-103. ACS Symposium Series 271. Washington, American Chemical Society.
- Helbert, J.R. (1982). Beer, in *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th Edition. Ed. Reed, G., pp. 403-467. Westport, AVI Publishing Co.
- Hemming, M.L., Ousby, J.C., Plowright, D.R. and Walker, J. (1977). 'Deep shaft'—latest position, *Water Pollution Control* **76**, 441-451.
- Hirose, Y., Enei, H. and Shibai, H. (1985). L-Glutamic acid fermentation, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 593-600. Oxford, Pergamon.
- Hopwood, D.A. (1981). The genetic programming of industrial microorganisms. *Scientific American* **245**, 91-102.
- Hough, J.S. (1985). *The Biotechnology of Malting and Brewing*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Hsiung, H.M., Mayne, N.G. and Becker, G.W. (1986). High-level expression, efficient screening and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*, *Bio/Technology* **4**, 997-999.
- Huggins, A.R. (1984). Progress in dairy starter cultures, *Food Technology* **38**(6), 41-50.

- Hutter, R. (1982). Design of culture media capable of provoking wide gene expression, in *Bioactive Microbial Products: Search and Discovery*. Eds. Bu'Lock, J.D., Nisbet, L.J. and Winstanley, D.J., pp. 37-50. London, Academic Press.
- Ignoffo, G.M. and Anderson, R.F. (1979). Bioinsecticides, in *Microbial Technology*, Vol. 1. Eds. Pepler, H.J. and Perlman, D., pp. 1-28. New York, Academic Press.
- Irving, D.M. and Hill, A.R. (1985). Cheese technology, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 523-565. Oxford, Pergamon.
- Jayme, D.W. and Blackman, K.E. (1985). Culture media for propagation of mammalian cells, viruses and other biologicals, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 5. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 1-30. New York, Alan R. Liss.
- Jegade, V.A., Kowal, K.J., Lin, W. and Ritchey, M.B. (1978). Vaccine technology, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 23. Ed. Grayson, M., pp. 629-643. New York, Wiley.
- Johnson, I.S. (1983). Human insulin from recombinant DNA technology, *Science* **219**, 632-637.
- Katinger, H.W.D. and Blien, R. (1983). Production of enzymes and hormones by mammalian cell culture, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 2. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 61-95. New York, Alan R. Liss.
- Kato, N., Tani, Y. and Yamada, H. (1983). Microbial utilization of methanol: production of useful metabolites, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 1. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 171-203. New York, Alan R. Liss.
- Kennedy, J.F. and Bradshaw, I.J. (1984). Production, properties and applications of xanthan, in *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 19. Ed. Bushell, M.E., pp. 319-372. Amsterdam, Elsevier.
- Khosrovi, B. and Gray, P.P. (1985). Products from recombinant DNA, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 319-330. Oxford, Pergamon.
- Kisser, M., Kubicek, C.P. and Röhr, M. (1980). Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation, *Archives of Microbiology* **128**, 26-33.
- Klausner, A. (1986). 'Single chain' antibodies become reality, *Bio/Technology* **4**, 1041-1043.
- Klein, F., Ricketts, R., Pickle, D. and Flickinger, M.C. (1983). Interleukin-2 and Interleukin-3: suspension cultures of constitutive producer cell lines, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 2. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 111-134. New York, Alan R. Liss.
- Klibanov, A.M. (1986). Enzymes that work in organic solvents. *Chemtech*, **16**, 354-359.
- Kristiansen, B. and Chamberlain, H.E. (1983). Fermenter design, in *The Filamentous Fungi*, Vol. 4. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., pp. 1-19. London, Edward Arnold.
- Kubicek, C.P. and Röhr, M. (1986). Citric acid fermentation, in *Critical Reviews of Biotechnology*, Vol. 3. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 331-373. Boca Raton, CRC.
- Kula, M.-R. (1985). Liquid-liquid extraction of biopolymers, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Ed. Moo-Young, M., pp. 451-471. Oxford, Pergamon.
- Laine, B.M. (1974). What proteins cost from oil, *Hydrocarbon Processing* **53**(11), pp. 139-142.
- Lambert, P.W. (1983). Industrial enzyme production and recovery from filamentous fungi, in *The Filamentous Fungi*, Vol. IV, *Fungal Technology*. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., pp. 210-237. London, Edward Arnold.
- Law, B.A. (1982). Cheeses, in *Fermented Foods, Economic Microbiology*, Vol. 7, Ed. Rose, A.H., pp. 147-198. London, Academic Press.
- Law, B.A. (1984). Microorganisms and their enzymes in the maturation of cheeses, in

- Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 19. Ed. Bushell, M.E., pp. 245-284. Amsterdam, Elsevier.
- Le, M.S. and Howell, J.A. (1985). Ultrafiltration, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Ed. Moo-Young, M., pp. 383-409. Oxford, Pergamon.
- Lechevalier, H.A. and Solotorovsky, M. (1974). *Three Centuries of Microbiology*. New York, Dover.
- Lehninger, A.L. (1982). *Principles of Biochemistry*. New York, Worth Publishers.
- Litchfield, J.H. (1983). Single-cell proteins, *Science* **219**, 740-746.
- Lockwood, L.B. (1979). Production of organic acids by fermentation, in *Microbial Technology*, Vol. 1. Eds. Pepler, H.J. and Perlman, D., pp. 355-387. New York, Academic Press.
- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S. and Ramakrishna, S.V. (1985). Engineering aspects of solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology* **7**, 258-265.
- Lyons, T.P. and Rose, A.H. (1977). Whisky, in *Alcoholic Beverages, Economic Microbiology*, Vol. 1. Ed. Rose, A.H., pp. 635-692.
- Macleod, A.M. (1977). Beer, in *Alcoholic Beverages, Economic Microbiology*, Vol. 1. Ed. Rose, A.H., pp. 43-137. London, Academic Press.
- Magee, R.J. and Kosaric, N. (1987). The Microbial production of 2,3-butanediol, in *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 32. Ed. Laskin, A.I., pp. 89-161. Orlando, Academic Press.
- Margaritis, A. and Pace, G.W. (1985). Microbial polysaccharides, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 1005-1043. Oxford, Pergamon.
- Maxon, W.D. (1985). Steroid bioconversions: one industrial perspective, in *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vol. 8. Ed. Tsao, G.T., pp. 171-186. Orlando, Academic Press.
- McGregor, W.C. (1983). Large-scale isolation and purification of recombinant proteins from recombinant *E. coli*. *Annals of the New York Academy of Science* **413**, 231-236.
- McNeil, B. and Kristiansen, B. (1986). The acetone butanol fermentation, in *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 32. Ed. Laskin, A.I., pp. 61-92. Orlando, Academic Press.
- Miller, M.W. (1982). Yeasts, in *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th Edition. Ed. Reed, G., pp. 15-43. Westport, AVI Publishing Co.
- Miller, T.L. (1985). Steroid fermentations, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 297-318. Oxford, Pergamon.
- Miller, T.L. and Churchill, B.W. (1986). Substrates for large-scale fermentations, in *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Eds. Demain, A.L. and Solomon, N.A., pp. 122-136. Washington, American Society for Microbiology.
- Millis, N.F. (1985). The organisms of biotechnology, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 7-19. Oxford, Pergamon.
- Misawa, M. (1985). Production of useful plant metabolites, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 31. Ed. Fiechter, A., pp. 59-88. Berlin, Springer-Verlag.
- Moo-Young, M., Moreira, A.R. and Tengerdy, R.P. (1983). Principles of solid-substrate fermentation, in *The Filamentous Fungi*, Vol. IV, *Fungal Technology*. Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., pp. 117-144. London, Edward Arnold.
- Nakayama, K. (1985). Lysine, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 607-620. Oxford, Pergamon.
- Ng, T.K., Busche, R.M., McDonald, C.C. and Hardy, R.W.F. (1983). Production of feedstock chemicals, *Science* **219**, 733-740.
- Nielsen, M.D., Henning, M.D. and Duncan, J.R. Monoclonal antibodies in veterinary medicine, in *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol. 1. Ed. Russel, G.E., pp. 331-353. Newcastle, Intercept.
- Nilsson, K., Buzsaky, F. and Mosbach, K. (1986). Growth of anchorage-dependent cells on macroporous microcarriers, *Bio/Technology* **4**, 989-990.
- Ogata, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. and Aida, K. (1976). *Microbial Production of Nucleic Acid-Related Substances*. Tokyo, Kodansha.
- Oki, T. (1984). Recent developments in the process improvement of production of antitumour anthracycline antibiotics, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 3. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 163-196. New York, Alan R. Liss.
- Olsen, S. (1986). *Biotechnology, An Industry Comes of Age*. Washington, National Academy.
- Onions, A.H.S., Allsopp, D. and Eggins, H.O.W. (1981). *Smith's Introduction to Industrial Mycology*, 7th Edition. London, Edward Arnold.
- Onken, U. and Weiland, P. (1983). Airlift fermenters: construction, behaviour and uses, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 1. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 67-95. New York, Alan R. Liss.
- Oura, E., Soumalainen, H. and Viskari, R. (1982). Breadmaking, in *Fermented Foods, Economic Microbiology*, Vol. 7. Ed. Rose, A.H., pp. 87-146. London, Academic Press.
- Pandrey, R.C., Kalita, C.C., Gustafson, M.E., Kline, M.C., Leidhecker, M.E. and Ross, J.T. (1985). Process developments in the isolation of largomycin F-II, a chromoprotein antitumour antibiotic, in *Purification of Fermentation Products*. Eds. Le Roith, D., Shiloach, J. and Leahy, T.J., ACS Symposium Series 271, pp. 133-153. Washington, American Chemical Society.
- Phaff, H.J. (1981). Industrial microorganisms, *Scientific American* **245**, pp. 77-89.
- Pirt, S.J. (1982). Microbial photosynthesis in the harnessing of solar energy, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **32**, 198-202.
- Porubscan, R.S. and Sellars, R.L. (1979). Lactic starter culture concentrates, in *Microbial Technology*, Vol. 1. Eds. Pepler, H.J. and Perlman, D., pp. 59-91. New York, Academic Press.
- Posillico, E.G. (1986). Microencapsulation technology for large-scale antibody production, *Bio/Technology* **4**, 114-117.
- Priest, F.G. (1984). *Extracellular Enzymes*. Wokingham, UK, Van Nostrand Reinhold.
- Purchas, D.B. (1971). *Industrial Filtration of Liquids*. Glasgow, Leonard Hill.
- Queener, S.W. and Swartz, R.W. (1979). Penicillins: biosynthetic and semisynthetic, in *Economic Microbiology*, Vol. 3. Ed. Rose, A.H., pp. 35-123. London, Academic Press.
- Ratafia, M. (1987). Mammalian cell culture: worldwide activities and markets, *Bio/Technology* **5**, 692-694.
- Reed, G. (1982). Microbial biomass, single cell protein, and other microbial products, in *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, 4th Edition. Ed. Reed, G., pp. 541-592. Westport, AVI Publishing Co.
- Reuveny, S. (1983). Microcarriers for culturing mammalian cells and their applications, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 1. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 1-32. New York, Alan R. Liss.
- Ricketts, R.T. and Leberer III, W.B., Klein, F., Gustafson, M.E. and Flickinger, M.C. (1985). Application, sterilization and decontamination of ultrafiltration systems for large-scale production of biologicals, in *Purification of Fermentation Products*. Eds. Le Roith, D., Shiloach, J. and Leahy, T.J., pp. 51-69. ACS Symposium Series 271. Washington, American Chemical Society.
- Robbers, J.E. (1984). The fermentative production of ergot alkaloids, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 3. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 197-239. New York, Alan R. Liss.
- Roiz, C., de Cabrera, S., Calzada, F., Garcia, R., de Leon, R., del Carmen de Arriola, M., de Micheo, F. and Morales, E. (1983). Concepts on the biotransformation of

- carbohydrates into fuel ethanol, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 1. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 97-142. New York, Alan R. Liss.
- Rose, A.H. (1980). *Microbial Enzymes and Bioconversions, Economic Microbiology*, Vol. 5. London, Academic Press.
- Rose, A.H. (1981). The microbiology of food and drink, *Scientific American* **245**, 127-138.
- Samuelov, N.S. (1983). Single-cell protein production: review of alternatives, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 1. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 293-336. New York, Alan R. Liss.
- Shoham, J. (1983). Production of human immune interferon, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 2. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 209-269. New York, Alan R. Liss.
- Sinden, K.W. (1987). The production of lipids by fermentation within the EEC, *Enzyme and Microbial Technology* **9**, 124-125.
- Sitrin, R.D., Chan, G., De Phillips, P., Dingerdissen, J., Valenta, J. and Snader, K. (1985). Preparative reversed phase high performance liquid chromatography, in *Purification of Fermentation Products*. Eds. Le Roith, D., Shiloach, J. and Leahy, T.J., pp. 71-89. ACS Symposium Series 271. Washington, American Chemical Society.
- Smith, J.E. (1985). *Biotechnology Principles*. Wokingham, UK, Van Nostrand Reinhold.
- Solomons, G.L. (1983). Single Cell Protein, in *Critical Reviews of Biotechnology*, Vol. I. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 21-58. Boca Raton, CRC.
- Solomons, G.L. (1985). Production of biomass by filamentous fungi, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 483-505. Oxford, Pergamon.
- Spier, R.E. (1983). Production of veterinary vaccines, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 2. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 33-59. New York, Alan R. Liss.
- Stanbury, P.F. and Whitaker, A. (1984). *Principles of Fermentation Technology*. Oxford, Pergamon.
- Steinkraus, K.H. (1983). Industrial applications of oriental fungal fermentations, in *The Filamentous Fungi*, Vol. IV, *Fungal Technology*, Eds. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B., pp. 171-189. London, Edward Arnold.
- Stewart, G.G., Panchal, C., Russell, I. and Sills, A.M. (1984). Biology of ethanol-producing organisms, in *Critical Reviews of Biotechnology*, Vol. 1. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 161-188. Boca Raton, CRC.
- Stewart, G.G. and Russell, I. (1985). Modern brewing technology, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 335-382. Oxford, Pergamon.
- Street, G. (1983). Large scale industrial enzyme production, in *Critical Review of Biotechnology*, Vol. 1. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 59-89. Boca Raton, CRC.
- Strom, P.F. and Chung, J.-C. (1985). The rotating biological contactor for wastewater treatment, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 5. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 193-225. New York, Alan R. Liss.
- Stroshane, R.M. (1984). Production of daunorubicin, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 3. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 141-161. New York, Alan R. Liss.
- Stutzenberger, F. (1985). Regulation of cellulolytic activity, in *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vol. 8. Ed. Tsao, G.T., pp. 111-154. Orlando, Academic Press.
- Swartz, R.W. (1985). Penicillins, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 7-47. Oxford, Pergamon.
- Szmat, H.H. (1986). *Industrial Utilization of Renewable Resources*. Lancaster, Technomic.
- Tautorius, T.E. (1985). Mushroom fermentation, in *Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 5. Eds. Mizrahi, A. and Van Wezel, A.L., pp. 227-273. New York, Alan R. Liss.
- Thielsch, H. (1967). Manufacture, fabrication and joining of commercial piping, in *Piping Handbook*. Ed. King, R.C., pp. 7.1-7.300. New York, McGraw-Hill.

- Trevar, M.D., Boffey, S., Goulding, K.H. and Stanbury, P. (1987). *Biotechnology, The Biological Principles*. Milton Keynes, Open University Press.
- Tutunjian, R.S. (1985). Ultrafiltration processes, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2. Ed. Moo-Young, M., pp. 411-437. Oxford, Pergamon.
- Tzeng, C.H. (1985). Applications for starter cultures in the dairy industry, in *Developments in Industrial Microbiology*, Vol. 26. Ed. Underkofler, L.A., pp. 323-338. Arlington, Society for Industrial Microbiology.
- Van Brunt, J. (1986a). Fungi: the perfect hosts? *Bio/Technology* **4**, 1057-1062.
- Van Brunt, J. (1986b). Immobilized mammalian cells: the gentle way to productivity, *Bio/Technology* **4**, 505-510.
- Van Hemert, P. (1974). Vaccine production as a unit process, in *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 13. Ed. Hockenhull, D.J.D., pp. 151-271. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Van Uden, N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance of yeasts, in *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vol. 8. Ed. Tsao, G.T., pp. 11-58. Orlando, Academic Press.
- Ward, O.P. (1985a). Hydrolytic enzymes, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 819-836.
- Ward, O.P. (1985b). Proteolytic enzymes, in *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3. Ed. Moo-Young, M., pp. 789-818. Oxford, Pergamon.
- Wasserman, B.P. (1984). Thermostable enzyme production, *Food Technology* **38** (2), 78-89, 98.
- Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. and Weiner, A.M. (1987). *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition. California, Benjamin/Cummings.
- Wheatley, A.D. (1984). Biotechnology of effluent treatment, in *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol. 1. Ed. Russell, G.E., pp. 261-310. Newcastle, Intercept.
- White, R.J., Klein, F., Chan, J.A. and Stroshane, R.M. (1980). Large-scale production of human interferons, in *Annual Reports on Fermentation Processes*, Vol. 4. Ed. Tsao, G.T., pp. 109-234.
- White, T.J., Meade, J.H., Shoemaker, S.P., Kothe, K.E. and Innis, M.A. (1984). Enzyme cloning for the food fermentation industry, *Food Technology* **38** (2), 90-95.
- Wiegel, J. and Ljungdahl, L. (1986). The importance of thermophilic bacteria in biotechnology, in *Critical Reviews of Biotechnology*, Vol. 3. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 39-108. Boca Raton, CRC.
- Wilson, T. (1984). Bioreactor, synthesizer, biosensor markets to increase by 16 percent annually, *Bio/Technology* **2**, 869-873.
- Wiseman, A. (1983). *Principles of Biotechnology*. London, Surrey University Press.
- Wodzinski, R.J., Gennaro, R.N. and Scholla, M.H. (1987). Economics of the bioconversion of biomass to methane and other vendable products, in *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 32. Ed. Laskin, A.I., pp. 37-88. Orlando, Academic Press.
- Wood, B.J.B. (1982). Soy Sauce and Miso, in *Fermented Foods, Economic Microbiology*, Vol. 7. Ed. Rose, A.H., pp. 39-86. London, Academic Press.
- Wood, B.J.B. (1984). Progress in soy sauce and related fermentations, in *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 19. Ed. Bushell, M.E., pp. 373-410. Amsterdam, Elsevier.
- Workman, W.E., McLinden, J.H. and Dean, D.H. (1986). Genetic engineering applications to biotechnology in the genus *Bacillus*, in *Critical Reviews of Biotechnology*, Vol. 3. Eds. Stewart, G.G. and Russell, I., pp. 199-234. Boca Raton, CRC.
- Zahka, J. and Leahy, T.J. (1985). Practical aspects of tangential flow filtration in cell separations, in *Purification of Fermentation Products*, Eds. Le Roith, D., Shiloach, J. and Leahy, T.J., pp. 51-69. ACS Symposium Series 271. Washington, American Chemical Society.

## A

- Absorción por intercambio iónico, 100
- Aceite de palma, 83
  - de primavera, 197
  - de semillas de algodón, 83
  - de soja, 83
- Aceites, 196
  - de fusel, 137
  - vegetales, 196
- Acetaldehído, 137
  - deshidrogenasa, 155
- Acetato de etilo, 137
  - de isoamilo, 137
  - producción de, 176
- Acetator Frings, 156
- Acetobacter*, 157
- Acetobacter acetii*, 7
- Acetoína, 237
- Acetona, 173
- Acido acético, 7, 137, 175
  - — producción de, 35
  - algínico, 78
  - 6-aminopenicilánico, estructura, 201
  - cítrico, 7, 61, 75, 78, 105
  - — fermentación del, 167
  - — producción de, 165
  - fenilacético, 75
  - fumárico, 78
  - giberélico, 10, 177
  - glutámico, 74, 184
  - — producción de, 34, 170, 185, 189
  - itacónico, 78, 105, 171, 172
  - láctico, 7, 128, 172
  - — producción de, 35
  - $\gamma$ -linolénico, 197
  - úrico, 120
- Acidos orgánicos, 7
- Actinomicina, 75
- Activador tisular del plasminógeno, 226
- Actividad del agua, 30
- Actividades específicas, 89
- Aditivos alimentarios, 183
- ADP, 41
- Adriamicina, 227
- Adsorción, 100
- Aerobios estrictos, 18
- Agentes tamponantes, 80
- Agitación con perlas de vidrio, 99
- Agitador de turbina, 56
- Alambique, 145, 147
- Alcaligenes entrophus*, 9, 180
- Alcaloides del cornezuelo, 210
  - estructuras de los, 211
- Alcanos, 112
- Alcohol, 1
  - amílico, 137
  - como combustible, 162
  - deshidrogenasa, 34
  - industrial, 8
  - isoamílico, 137
  - producción de, 124, 165
  - programa nacional brasileño, 163
- Alcoholes, 112
  - de fusel, 137
- Alergias, 207
- Alginato, 9
- Alginatos, 179
- Almidón, 82
- American Type Culture Collection, 88
- $\alpha$ -amilasa, 11, 135
- $\alpha$ -amilasas, 233
- Amilasas, 82, 245
  - microbianas, 4
- Amiloglucosidasa, 143, 145
- Aminoácido permeasa general, 135
- Aminoácidos, 8, 83, 88, 105, 183
  - cepas productoras de, 187
  - producción anual, 186
- Amoniaco, 83
- AMP, 41
  - biosíntesis de, 192
- Anaerobios estrictos, 18
- Antibióticos, 12, 35, 199, 200
  - sintéticos, 206
- Anticancerosos, 227
- Anticuerpos monoclonales, 14, 102, 220
  - — mejorados, 224
  - — producción, 222, 224
- Antiespumantes, 80
- Antiinflamatorios, 231
- Antimicina, 170
- Antraciclina, 227
- Aroma, componentes del, 136
- Arrhenius*, ecuación de, 29
- Ascomycetes*, 10
- Ashbya gossypii*, 10, 194
- Aspergillus*, 15, 24
- Aspergillus niger*, 7, 22, 34, 61, 78, 166, 168, 170, 248
  - *ochraceus*, 209
  - *oryzae*, 65, 154, 233
  - *terreus*, 78, 172
- ATP, 41

*Aureobasidium*, 25  
 — *pullulans*, 9, 179  
 Auxiliares de filtración, 97  
 Auxinas, 88  
*Azotobacter vinelandii*, 9, 179  
 Azúcar, 82  
 Azúcares fermentables, 152  
 — ruptura de los, 32

## B

$\beta$ -galactosidasa, 38  
*Bacillus*, 15  
 — *licheniformis*, 11, 233  
 — *mesentericus*, 11  
 — *polymyxa*, 176  
 — *popilliae*, 181  
 — *sphaericus*, 181  
 — *subtilis*, 10, 11, 191, 213  
 — *thuringiensis*, 10, 181  
 Bacitracina, 75  
 Bacterias del ácido acético, 138  
 — — — láctico, 138  
 — Gram-negativas, 20, 248  
 — Gram-positivas, 20, 248  
 — reproducción de, 20  
 Bagazo, 165  
 Bebidas alcohólicas, 133  
 Bencilpenicilina, 75  
 Bingham, plásticos de, 57  
 Bioinsecticidas, 181  
 Biomasa, 159, 215  
 — producción de, 111  
 — productividad de, 117  
 — recuperación de, 106  
 — rendimiento de, 117  
 Biopolímeros, 9, 178  
 Biorreactor, 52  
 — con bucle externo, 62  
 — — — interno, 62  
 — controlado por, 71  
 — de bucle, 62  
 — de lodos activos, 63  
 Biotina, 74  
 BME, 85, 86  
*Bordetella pertusis*, 215  
 Brandy, 133  
*Brevibacterium*, 184  
 — *ammoniaenes*, 193  
 — *flavum*, 188  
 Bromuro, 76

## C

Caña de azúcar, 164  
*Candida*, 121, 166  
 — *guilliermondii*, 62, 168  
 — *pichia*, 113  
 — *utilis*, 6, 23, 112, 113, 114  
 Carbohidratos, 82, 112  
 Carbopol, 78  
 Carboximetilcelulosa, 78  
*Carica papaya*, 234  
 Cartucho de fibra hueca, 103  
 — espiral, 103  
 Cebada, germinación de la, 10  
 — malteada, 145  
 Cefalosporinas, 105  
 Células BCG, producción de, 217  
 Células  $\beta$ , 226  
 — cultivo de, 3  
 — de híbrido, crecimiento de 224  
 — eucariotas, 17, 18  
 — procariotas, 17, 18  
 — vegetales, cultivo de, 23  
 Celulosa, 122  
 Centrifuga de descarga de sólidos, 95  
 — de tornillo decantador, 95  
 Centrifugación 94  
 Centros alostéricos, 41  
*Cephalosporium acremonium*, 12  
 Cereal, 65  
 Cereales malteados, 138  
 Cerveza, 133, 134  
 — ale, 142  
 — elaboración de la, 138, 144  
 — fermentación de la, 142  
 — lager, 142  
 — levaduras de la, 1  
 — maduración de la, 143  
 — pasteurización de la, 5  
 — producción de, 1  
*Chrysosporium pruinosum*, 160  
 Ciclo de los ácidos tricarbóxicos, 32  
 Citoquinonas, 88  
 Citrato, producción de, 168  
 Cizalla sólida, 99  
 Clarificación, cámara de, 139  
*Claviceps*, 211  
 Cloranfenicol, 75  
 Clorotetraciclina, 76  
 — producción de, 206  
*Clostridia*, 18  
*Clostridium acetobutylicum*, 7, 35, 174  
 — *botulinum*, 155

— *tetani*, 218  
 — *thermoaceticum*, 35, 175, 176  
 — *thermocellum*, 175  
 COD, 249  
 Coloración de Gram, 20  
 Compost, 65  
 Compuestos químicos orgánicos, 159  
 Cornezuelo, alcaloides del, 210  
 Cortisol, 208  
 Cortisona, 13, 207  
*Corynebacterium*, 184  
 — *diphtheriae*, 217  
 — *glutamicum*, 188  
 Crecimiento celular, 27  
 Cromatografía con inmuoabsorbentes,  
 102  
 Cromosomas, 18  
 CSF, 87  
 Cuajos microbianos, 235  
 Cultivo continuo, síntesis de, 50  
 Cultivos starter, 126, 155  
 — — lácticos, producción, 130  
*Cunninghamella elegans*, 197

## D

D-glucono-d-lactona, 170  
 Daunorrubicina, 227  
 — estructuras de la, 228  
 — producción de, 229  
 Destilación, 92  
 Detergentes, 99  
*Deuteromycotina*, 22, 181  
 Dextranasas fúngicas, 234  
 Dextrinas límite, 142  
 Diacetilo, 137  
 Digestión anaerobia, 256  
 Diosgenina, 207  
 Disrupción de células microbianas, 97,  
 99  
 DNA recombinante, tecnología de, 212

## E

Eagle, 4  
 ED, 32  
 Efectos Pasteur, 77  
 EGF, 87  
 Elección del microorganismo, 115  
 Embden Meyerhof Parnas, ruta de, 32

*Endomycopsis fibuliger*, 23  
 Enfermedades inflamatorias, 207  
 Entner-Doudoroff, ruta de, 32  
 Enzimas, degradación de los, 37  
 — en tratamientos de desechos, 255  
 — extracelulares, recuperación, 106  
 — hidrolíticos, 138  
 — industriales, 233  
 — inmovilización de, 244  
 — microbianos, 11  
 — — biosíntesis de, 245  
 — para diagnóstico, 90  
 — para investigación, 90  
 — producción de, 242  
 — recombinantes, 247  
 — secreción de, 43  
 — síntesis de los, 37  
*Eremothecium ashbyii*, 10  
 Ergocornina, 211  
 Ergocriptina, 211  
 Ergocristina, 211  
 Ergosina, 211  
 Ergostina, 211  
 Ergotamina, 211  
 Eritropoietina, 226  
 Escarabajo japonés, 181  
*Escherichia coli*, 10, 15, 38, 212  
 — — división del, 21  
 Escleroglucano, 9  
 Esporas, formación de, 79  
 Espuma, 80  
 Esteroides, 12, 105  
 — biotransformación de los, 209  
 — obtención de, 207  
 — estructuras de los, 208  
 Estigmasterol, 207  
 Estreptomina, 12, 78, 105  
 Etanol, 83, 159  
 — fermentación del, 134  
 — producción de, 161, 164  
 Evaporación, 92  
 Exocitosis, 42, 43  
 Explantación, 3  
 Extracción líquido-líquido, 100  
 Extractos de maíz, 74

## F

Factor de crecimiento epidérmico, 226  
 — de transferencia, 226  
 — estimulante de los granulocitos, 226  
 — VIII, 226  
 Factores de crecimiento, 87

Fase de latencia, 28  
 — estacionaria, 28  
 — logarítmica, 28  
 Fermentación, 242  
 — discontinua, 163  
 — koji, 154  
 — maloláctica, 138  
 — on line, sistemas de, 68  
 Fermentaciones en alimentos, 4, 133  
 — en sustratos sólidos, 64  
 — fúngicas, 11  
 Fermentador, diagrama de un, 56  
 — diseño de un, 118  
 — — del, 52, 53  
 — potencia del, 60  
 — tipo torre, 61  
 Fermentadores, 119  
 — agitados por aire, 119  
 — — de sistema de cubeta, 66  
 — — — de flujo de, 66  
 — de tambor rotatorio, 66  
 FGF, 87  
 FHA, 219  
 Filtración, 94  
 — con flujo tangencial, 97  
 — convencional, 98  
 — en flujo cruzado, 98  
 Filtro de placas, 103  
 — de vacío rotatorio, 97  
 — percolador, 251  
 Filtros de placas, 95  
 Fitohormonas, 177  
 Fleming, A., 12  
 Floculación, 94  
 Fluidos newtonianos, 55  
 — no newtonianos, 56  
 — pseudoplásticos, 56  
 Formiato de etilo, 137  
 Fosfato orgánico, 75  
 Frings acetator, 60  
 Fructosa, 88, 136  
 Fuerzas de cizalla, 99  
*Fusarium*, 25  
 — *graminearum*, 6, 113, 120, 121  
 — *moniliforme*, 177

## G

$\beta$ -galactosidasa, 38  
 GAP, 135  
 Gasohol Program, 8  
 — programa, 162  
 Gautheret, 4  
 Gelano, 9

*Gibberella fujikuroi*, 177  
 Giberelina, producción de, 178  
 Giberelinas, 10, 177  
 Ginebra, 133  
 Glicerol, obtención del, 173  
 — producción de, 7, 34, 76, 174  
 Glucoamilasa, 236  
 Gluconato de sodio, 105  
 — fermentación del, 170  
 Gluconatos, 170  
*Gluconobacter*, 157  
 — *suboxydans*, 170  
 Glucosa, 82, 88, 113  
 — isomerasa, 234  
 — — microbiana, 11  
 — oxidación de la, 76  
 Glutamato de sodio, 185  
 — monosódico, 8  
 GMP, biosíntesis de, 192  
 Goma xantano, 9, 179  
 GRAS, 247  
 Grasas, 196  
 Griseofulvina, 75

## H

HAM, 86  
 Hemicelulasas, 233  
 Hexosa monofosfato, ruta de la, 32  
 Hibridomas, 14, 23, 221  
 Hidrólisis enzimática, 99  
 Hierro, 75  
 Hifa fúngica, 26  
 HMP, 32  
 Hongos, clasificación de los, 22  
 Hormona del crecimiento humano, 226  
 Hormonas vegetales, 88  
 HPLC, 102

## I

IMP, biosíntesis de, 192  
 Inducción, 38  
 Industrias cárnicas, 130  
 — lácteas, 128  
 Inóculos microbianos, 126, 131, 255  
 Insecticidas microbianos, 10  
 — químicos, 10  
 Insectos, virus de los, 182

Insulina humana, 15, 212  
 — recombinante, 226  
 Interferón alfa, 226  
 — humano, producción de, 230  
 — producción de, 228  
 Interferones, 213  
 Interleukina-2, producción de, 212  
 Ion amonio, 75  
 Isoenzimas, 41  
 Levaduras, 2, 22  
 — de cervecera, 111  
 — de destilería, 146  
 — de panadería, 5, 111, 126  
 — fermentación con, 134  
 — floculación de las, 79  
 — producción de, 124  
 Lignocelulosa, 82, 160, 238  
 Líneas celulares, 23  
 Linfocinas, 226  
 Liofilizado, 92  
 Lipasas fúngicas, 234  
 Lisina, 8  
 — fermentación de la, 190  
 — producción de, 34, 188, 190  
*Lithospermum erythrorhizon*, 231  
 — *erythrorhizon*, 4  
 Lodos activados, 251

## J

Jarabes de maíz ricos en fructosa, 11  
 Jerez, 134  
 Jugo de caña, 165

## K

$\kappa$ -caseína, 150  
*Katsubushi*, 191  
*Klebsiella oxytoca*, 175  
*Khuyveromyces fragilis*, 8, 113, 121  
 — *lactis*, 22  
 Koch, Robert, 3

## L

Lactasas, aplicaciones de las, 236  
 — fúngicas, 234  
 Lactato cálcico, 105  
 — deshidrogenasa, 35  
*Lactobacillus*, 137, 146  
 — *delbruckii*, 7, 35, 173  
 Lactosa, 82, 88  
 Lactosuero, 124  
 Lactosuero, fermentación del, 8  
 Largomicina F-II, recuperación de, 108, 110  
 Leche, acidificación de la, 149  
 — coagulación de la, 149  
 — homogeneización de la, 149  
 Lecho fluidizado, 252  
 Legumbres, 65  
*Leuconostoc oenus*, 138  
 Levadura, gemación de una, 26

## M

Maceración, 139  
 — por decocción, 139  
 — por infusión, 139, 145  
 Madeira, 134  
 Madera, 65  
 Maillard, reacción de, 139  
 Maíz, 163  
 Maltosa, 88  
 Manganeso, 75, 79, 193  
 — deficiencia de, 168  
 Masas agrias, 152  
 Medio aséptico, 52  
 — basal de Eagle, 86  
 — contenido de carbono del, 74  
 — de cultivo, mantenimiento, 88  
 — de fermentación óptimo, 74  
 — formulación del, 73  
 Medios de cultivo de células animales, 83  
 — — — para células, 86  
 — de fermentación microbiana, 81  
 Meningitis, vacuna contra la, 219  
 Mesófilos, 29  
 Metabolitos secundarios, biosíntesis, 35  
 Metabolismo, 31  
 — primario, 31  
 — regulación del, 36  
 — secundario, 35  
 Metabolitos no volátiles, 104  
 Metano, 114  
 Metanógenas, 254  
 Metanol, 83, 122  
*Methylophilus*, 33  
 — *methylophilus*, 6, 114, 121

- Michaelis-Menten, ecuación de, 76  
 Micoproteína, 6  
 Micoproteína RHM, obtención de, 123  
 Micrococcus, 132  
 Microorganismos, 18  
 — fisiología de los, 77  
 — industriales, 17  
 Miso, 154  
 — producción de, 153  
 Monod, ecuación de, 30, 50  
 Morgan, 4  
 Moromi, 154  
*Mortierella isabellia*, 197  
 Moscas negras, 181  
 Mosquitos, 181  
 Mosto de cerveza, 135  
 — de uva, 136  
 — separación del, 141  
*Mucor*, 24  
 — *miehei*, 150  
*Mycobacterium tuberculosis*, 214, 215
- N**
- Neomicina, 75  
 Newton, ley de la viscosidad de, 55  
 NGF, 87  
 Nitrato, 75  
 Nitratos, 83, 88  
 Nitrógeno, fuentes de, 83  
 NPU, 120  
 Nucleósidos, 191  
 Nucleótidos, producción de, 195
- O**
- Operones, 38  
 Oporto, 134  
 Ortoclón, 226  
 Orugas, 181  
 Osmosis inversa, 101  
 Oxígeno, 76  
 — velocidad de absorción, 76, 77
- P**
- Paja, 65  
 Pan, fabricación del, 150  
 — masa del, 1, 4  
 Papaina, 234  
 Parafinas, 113  
 Pasteur, Louis, 2  
 PDGF, 87  
 Pectinasas, 233  
*Pediococcus*, 137, 155  
 — *cerevisiae*, 132  
 Penicilina, 12, 75, 78, 105  
 — fermentación de la, 205  
 — producción de, 202  
 — ruta biosintética de la, 202  
 Penicilinas, 201  
 — modificadas, 12  
 — semisintéticas, 201  
*Penicillium*, 11, 25  
 — *camemberti*, 128, 150  
 — *chrysogenum*, 78  
 — *notatum*, 12, 199  
 — *roqueforti*, 128, 150  
 Pentosas, fermentación de las, 162  
 Peptidasa señal cotraducciona, 44, 45  
 Péptido señal, 44  
 Péptidos, purificación de, 106  
 Permeabilidad, 79  
 Petróleo, 159  
 pH, 30  
 — control del, 80  
 PHB, 180  
 Plásmidos, 18  
 Plásticos biodegradables, 9  
 Poli-b-hidroxibutirato, 180  
 Polihidroxibutirato, 9  
 Polio, vacuna contra la, 214  
 Polisacáridos, degradación de los, 238  
 — microbianos, 178  
 — recuperación de, 106  
 Potencia, número de, 60  
 Precipitación, 100  
 Pregnenolona, 208  
 Proceso Melle Boinot, 165  
 — Viena, 6  
 Procesos continuos, fermentación en,  
 47, 48  
 — de recuperación, 103  
 — de separación, 91  
 — discontinuos alimentados, 47, 48  
 — — fermentación, 47, 48  
 Producto, purificación del, 89  
 — recuperación del, 89  
 Productos cárnicos fermentados, 155  
 — para uso médico, 199  
 — químicos, biosíntesis de, 161  
 Proceso Holandés, 6  
 Progesterona, 13  
*Propionibacterium*, 149, 194

- Proteasa alcalina, 233  
 Proteasas, 39, 233, 245  
 — microbianas, 5  
 Proteína C, 226  
 Proteínas activadoras, 38  
 — de organismos unicelulares, 5, 33,  
 112, 114, 116, 117, 121, 125,  
 — purificación de, 106, 108  
 — represoras, 38  
 Pruteen, 6  
*Pseudomonas*, 10, 32  
 — *denitrificans*, 194  
 — *elodea*, 9, 179,  
 Pseudorrabia, 15  
 — vacuna contra la, 220  
 Psicrófilos, 29  
 Pululanasa, 135  
 Pululano, 9, 179
- Q**
- Queso, 1  
 — elaboración del, 5  
 — fabricación del, 148, 151  
 Quimiorganotrofos, 18  
 Quimosina, 235  
 Quimostatos, 51
- R**
- Reactor anaerobio, diseño de un, 254  
 Recuperación de los productos solubles,  
 100  
 Regulación feedback acumulativa, 41  
 — — concertada, 41  
 Rendimiento, 91  
 Reograma, 57  
 Represión feedback, 40  
 — por el catabolito, 38  
 RER, 120  
 Residuos de alambique, 165  
 — tratamiento de, 249  
 Reynolds, número de, 60  
*Rhizopus*, 24  
 — *arrhizus*, 13, 78  
 — *nigricans*, 209  
 — *oligosporus*, 154  
 Riboflavina, 75, 105, 194  
 — producción de, 10
- Ribulosa monofosfato, ciclo de la, 123  
 — — vía de la, 33  
 Ron, 133  
 Roux, 3  
 Rutas metabólicas anaerobias, 34
- S**
- Sacarificación, 146  
 Sacarosa, 82, 88  
*Saccharomyces*, 15  
 — *bailli*, 135  
 — *cerevisiae*, 22, 76, 111, 126, 134, 162,  
 213, 248  
 — *diastaticus*, 237  
 — *rouxii*, 135  
 — *uvarum*, 134  
*Saccharomycopsis fibuligera*, 113  
 SAEC, 189  
 Sake, 133  
*Salmonella typhi*, 215  
 — — producción de, 216  
 Salsa de soja, producción de, 153  
 — koikuchi, 154  
 Salvado de trigo, 65  
*Schwanniomyces castelli*, 237  
*Sclerotium*, 9  
 SCP, 33, 111  
 Secado por atomización, 92  
 Secreción cotraducciona, 44, 45  
 — postraducciona, 45  
 Sedimentación, 94  
*Sclerotium*, 179  
 Sensores off line, 67  
 — on line, 67  
 Separación por tamaños, 100  
 SH<sub>2</sub> en cerveza, 137  
 SHAM, 169  
 Shikonina, 4  
 — estructura de la, 232  
 — producción de, 64, 231  
 SIDA, 220  
 Sidra, 133  
 Sinéresis, 149, 150  
 Síntesis proteica de los eucariotas, 37  
 — — — procariotas, 37  
 Sistemas de aireación, 54  
 — de cultivo sumergido, 60  
 — de mezclado, 54  
 — en dos fases, 239  
 SO<sub>2</sub> en cerveza, 137  
 Soja fermentada, 152  
 — salsa de, 3

Spirulina, 1

*Staphylococcus aureus*, 12, 155  
— *carneus*, 155

*Streptococcus*, 146

— *cremoris*, 128

— *lactis*, 128

— *pneumonia*, 219

*Streptomyces*, 12, 18, 76, 244

— *aureofaciens*, 206

— *griseus*, 78

— *peucetius*, 227

— *pluricolorescens*, 108, 110

Substratos, 112

— complejos, 83, 84

— sólidos, 65

Suero de leche, 112

— fetal de ternera, 83

— funciones del, 85

## T

Takadiastasa, 11

TCA, 32

Tecnología de DNA recombinante, 15

— microbiana, 2

Tempeh, 154

— producción de, 153

Temperatura, 29

Termófilos, 29

Tetraciclina, 76

— ruta biosintética de la, 204

Tetraciclinas, 204

TGF, 87

*Thermoanaerobacter ethanolicus*, 162

TOC, 249

Toxinas bacterianas, 217

Transferencia de energía, 58

— de masa, 57

— de oxígeno, 58

Traslocasas, 43

Tratamiento aerobio de residuos, 251

— anaerobio de desechos, 253

*Trichoderma*, 24



## U

Ultrafiltración, 101

Urea, 83

Uroquinasa, 226

## V

Vacuna de poliovirus, 219

Vacunas, 13, 214

— producción de, 214

— víricas, 4, 218

Válvula de muestreo aséptica, 52

Velocidad de crecimiento, 29

*Vibrio cholerae*, 13, 215

— — producción de, 216

Vinagre, 1, 155

— producción de, 60

Vino, 133

— blanco, 137, 147

— clarificación del, 148

— elaboración del, 1, 147

— tinto, 137, 148

Viruela, 13

— vacuna contra la, 214

Virus, 26

Viscosidad, 56

Vitamina B<sub>12</sub>, 194

— síntesis de la, 10

Vitaminas, 9, 194

— del grupo B, 9

## W

Wodka, 133

Whisky, 133

— bourbon, 145

— de centeno, 145

— destilación del, 147

— escocés, 145

— fermentación del, 146

— maduración del, 147

— producción de, 145

## X

*Xanthomonas campestris*, 9

## Z

Zinc, 75

Zygomycotina, 22

*Zyomonas mobilis*, 162



664.024 Ward, Owen P.

W256b Biotecnología de la fermentación

21.347

Ej.2