

# **FERMENTACIONES INDUSTRIALES**

# PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

- Los ácidos orgánicos que son producidos por fermentación son algunos de los ácidos del Ciclo Tricarboxílicos (málico y cítrico) y también acético y láctico.
- Todos son utilizados como acidulantes en procesamiento de alimentos o como aditivos a otros productos químicos industriales.
- El mayor problema de estos procesos es obtener el producto desde el caldo de fermentación, a la pureza requerida en condiciones económicas.

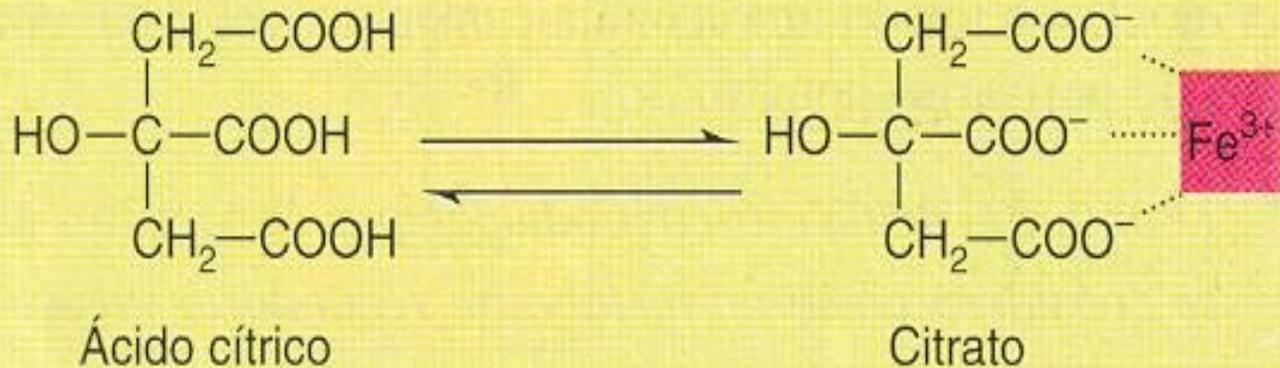
# PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

- **Acido málico:**
- **Para su producción se emplea un cultivo mixto de un hongo y una levadura, los que convierten un sustrato primario como glucosa o parafinas en ác. fumárico y luego un segundo M.O. Que produce fumarasa convierte el ác. fumárico en ac. málico.**
- **M.O. utilizados son: *Rhizopus arrhizus* y distintas cepas de bacterias o de levaduras.**
- **Se alcanza una concentración final de 150g/l**

# PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

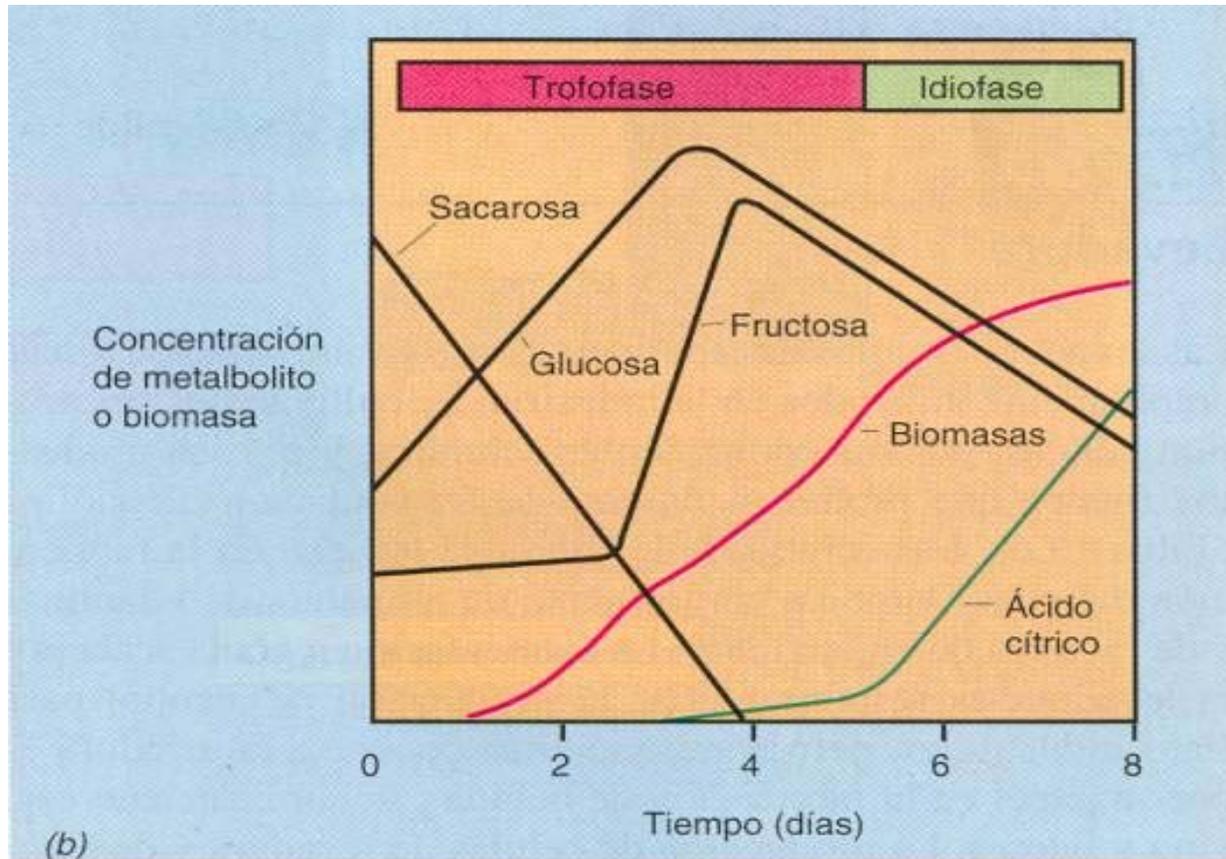
- Acido Cítrico
- *Aspergillus niger* es el mejor productor en presencia de  $Fe^{+3}$ .
- En cultivos mixtos se utiliza *Candida lipolytica* y el hongo *Schizophyllum commune*, creciendo en un medio con parafinas y peptona.
- Se obtiene citrato de una concentración de 98.3g/l, mezclado con ác. Isocítrico.

# ACIDO CÍTRICO Y SU FORMA IONICA QUELADA CON Fe(III)



(a)

# CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN DEL ACIDO CÍTRICO



# PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

- Acido láctico
- Se produce por la fermentación homoláctica con bacterias lácticas, *Lactobacillus delbreuckii* en rendimientos de 100% y concentraciones de productos de 120 g/l.
- Para hacerlo más económico se utiliza como sustrato celulosa y se requiere un cultivo mixto, con un hongo celulolítico (*Trichoderma reesei*) y las bacterias lácticas *Lactobacillus delbreuckii*.

# PRODUCCIÓN DE OTROS ORGÁNICOS

- Etanol
- La producción de etanol es una de las más importantes en la industria.
- Al año en USA se producen 400.000 millones de litros a partir de la fermentación de almidón de cereales.
- Se usa como solvente y también en la producción de “gasohol”, combustible sin plomo que contiene 10% de alcohol.

# PRODUCCIÓN DE OTROS ORGÁNICOS

- Etanol
- Para la fermentación se utilizan distintas especies de levadura: *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces*.
- La reacción:
- $$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2$$
- De acuerdo a esta reacción se podría obtener el 50% del peso de la glucosa como etanol, esto no se logra, ya que el etanol inhibe el desarrollo microbiano. Se debe concentrar por destilación.

# PRODUCCIÓN DE OTROS ORGÁNICOS

- **Acetona-butanol (utilizados fundamentalmente como solventes).**
- **Se han obtenido tradicionalmente por fermentación utilizando M.O.**
- **Sin embargo, durante algunos años en que se pensaba que el petróleo era eterno, estos solventes se obtenían por destilación o por síntesis química.**
- ***Clostridium acetobutylicum* es el M.O. mas utilizado en este proceso a partir de azucares fermentables.**

# PRODUCCIÓN DE OTROS ORGÁNICOS

- También se utiliza celulosa como sustrato y un cultivo mixto de bacterias celulolíticas y *C. acetobutylicum*.
- La velocidad de producción de solvente se ve limitada por la lenta degradación de la celulosa.
- Un cultivo de 13 días produjo a partir de 30g de Solka Floc/1 14 g de ác. Butírico, 4 g ácido acético, 3 g de etanol, y 1 g de butanol/1.

# PRODUCCIÓN DE OTROS ORGÁNICOS

- Acido propiónico.
- Se utiliza como inhibidor del desarrollo de hongos en alimentos.
- En general para su producción se utilizan cultivos mixtos de Lactobacillus y Propionibacterium, las que convierten glucosa en ác. propiónico. Las dos especies fermentan la glucosa y producen ácidos láctico y propiónico, pero las Propionibacterias, utilizan mejor el ác. láctico. (Con suero de leche).

Lactobacillus

Propionibacterium

- Glucosa  $\longrightarrow$  Ac. Láctico  $\longrightarrow$  Ac. propiónico

# PRODUCCIÓN DE VITAMINAS

- Las vitaminas se utilizan como suplemento de alimentos para personas y también para animales.
- La producción de vitaminas ocupa un segundo lugar luego de los antibióticos, entre los productos farmacéuticos, en cuanto a ventas (casi 1000 millones de dólares al año).
- Con la excepción de la Vitamina B<sub>12</sub> y la riboflavina (la vitamina de estructura más compleja) todas las otras se pueden producir ya sea por extracción desde fuentes naturales o por rutas de síntesis química.

# PRODUCCIÓN DE VITAMINAS

- Vitamina B<sub>12</sub>
- En la naturaleza la sintetizan exclusivamente los M.O.
- En los animales y el hombre como coenzima esta vitamina participa en el reordenamiento intramolecular de átomos de H y de carbono.
- La deficiencia de ella produce graves trastornos, como anemia perniciosa (baja producción de glóbulos rojos) y alteraciones nerviosas.

# **PRODUCCIÓN DE VITAMINAS**

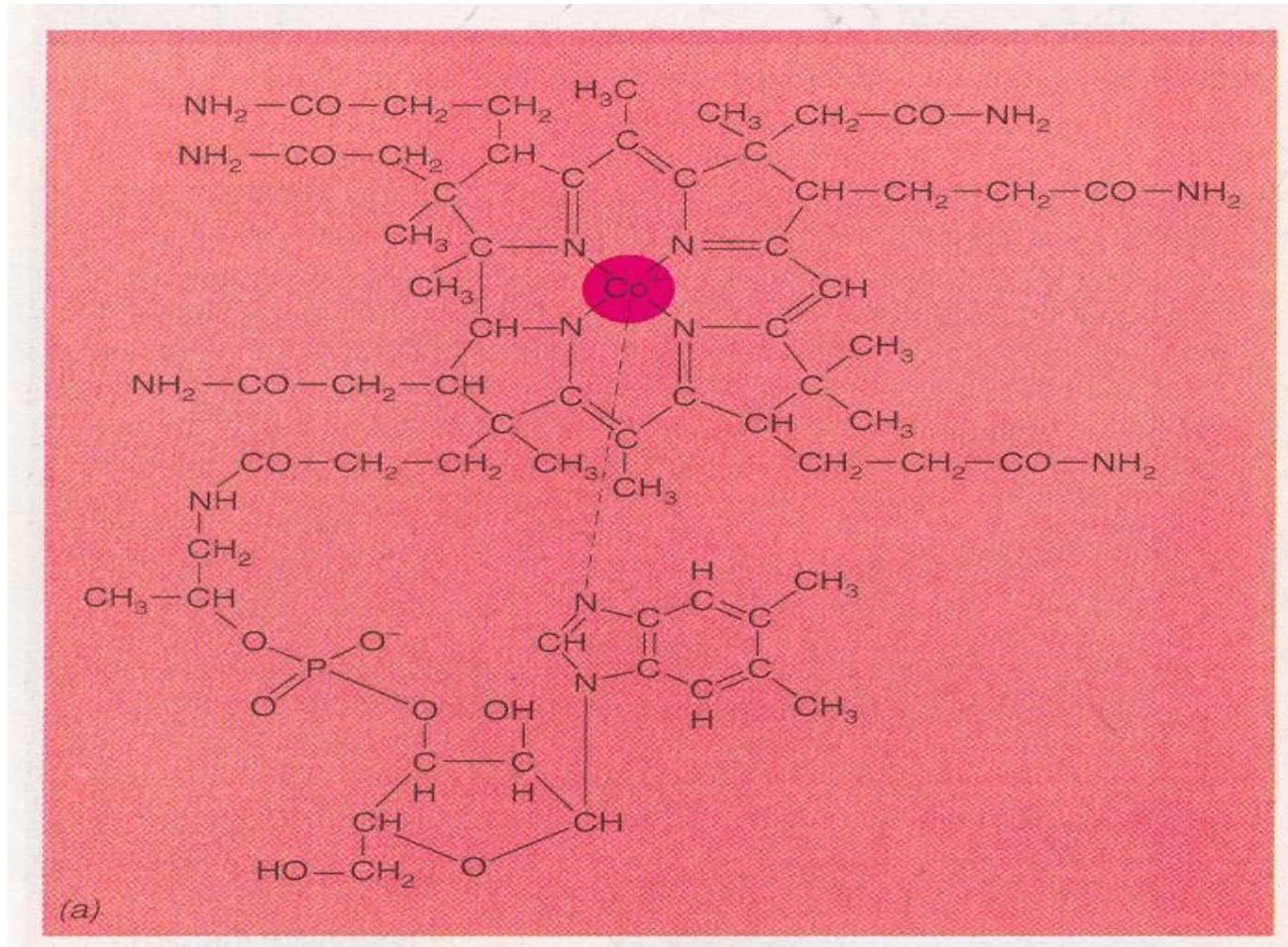
- **Los requerimientos de esta vitamina por parte de los animales y del hombre se satisfacen por los alimentos o por absorción a través del intestino de la vitamina producida por los M.O. presentes en el intestino.**
- **Los vegetales no producen ni requieren esta vitamina.**
- **Para su producción se utilizan algunas cepas microbianas que la producen con altos rendimientos.**

# PRODUCCIÓN DE VITAMINAS

- ***Propionibacterium* en un proceso en dos etapas, da rendimientos que oscilan entre 19 y 23 mg/l.**
- ***Pseudomonas denitrificans* en un proceso en una etapa y utilizando melaza de remolacha azucarera como fuente de carbono produce 60 mg/l de la vitamina.**
- **Esta vitamina contiene Co en su estructura por lo que si se añade a los medios nutritivos se produce en mayor concentración.**

# VITAMINA B<sub>12</sub>

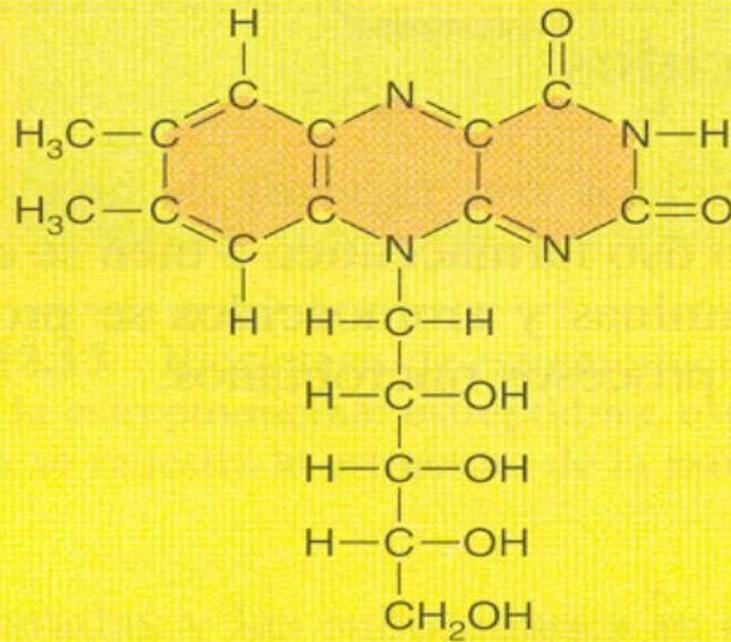
## CIANOCOBALAMINA



# PRODUCCIÓN DE VITAMINAS

- Riboflavina
- Es la vitamina relacionada con las flavinas: FAD y FMN, coenzimas que participan en numerosas reacciones de oxido-reducción de todos los organismos vivos.
- Esta vitamina es sintetizada por muchos M.O.: hongos, bacterias y levaduras.
- El hongo *Ashbya gossypii* produce una gran cantidad, hasta 7 g/l y por lo tanto se utiliza en su síntesis.
- A pesar de este buen rendimiento su síntesis microbiológica compite con la síntesis química.

# VITAMINA B<sub>2</sub> RIBOFLAVINA



(b)

# PRODUCCIÓN DE AMINOACIDOS

- Los aminoácidos tienen una gran utilización en la industria de alimentos, como aditivo para el ganado y en una serie de procesos industriales.
- El AA comercial más importante es el ácido glutámico, el que se utiliza como saborizante como glutamato monosódico (MSG).
- Otros dos AA : fenilalanina y ác. aspártico son utilizados para preparar el edulcorante artificial ASPARTAME.

# PRODUCCIÓN DE AMINOACIDOS

- Lisina
- Lisina un AA esencial para los seres humanos es producido comercialmente por *Brevibacterium flavum* para uso como aditivo en alimentos.
- La mayoría de los AA se puede producir químicamente, pero de esta manera se obtienen formas ópticamente inactivas de las formas D y L. Así para producir las formas L se requiere síntesis biológica.
- Los AA se pueden producir por fermentación directa o por síntesis enzimática (un M.O. produce una enzima y luego se utiliza esta en la producción del AA).

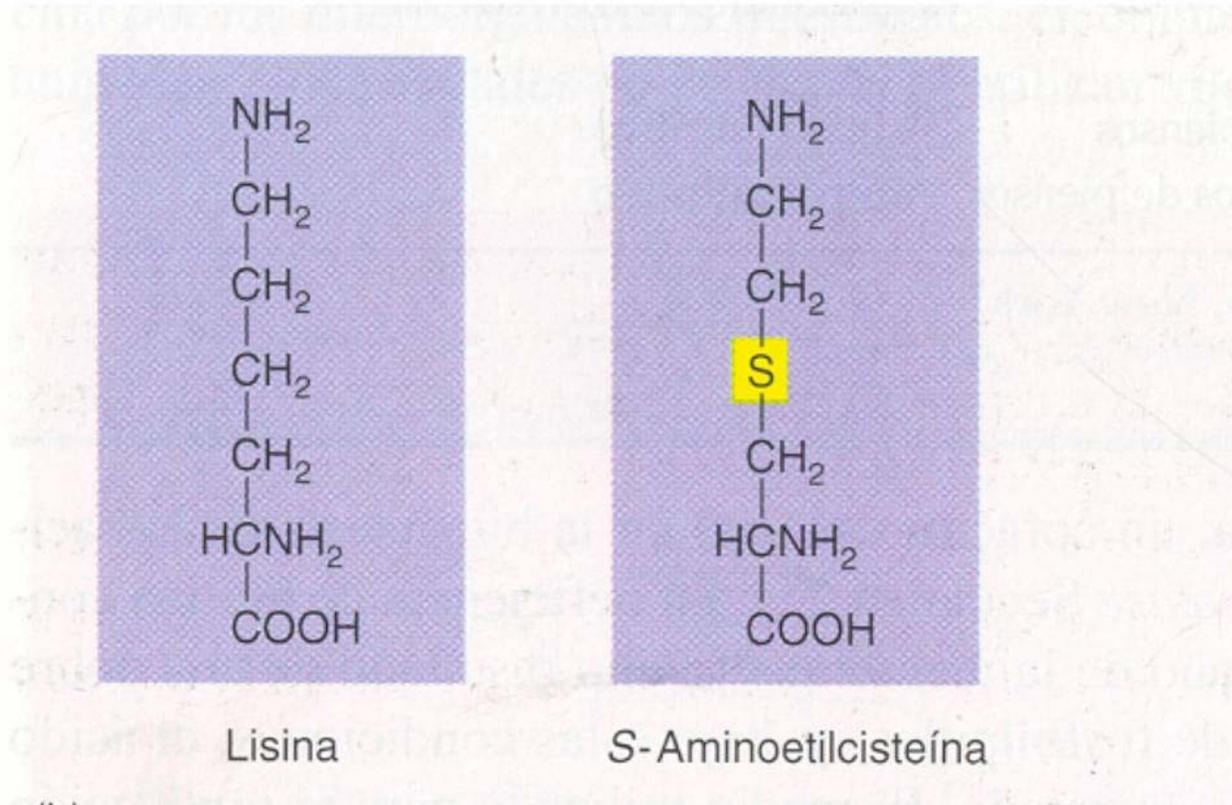
# REGULACIÓN Y SECRECIÓN DE AA

- Los M.O. producen los AA para utilizarlos en sus vías metabólicas (síntesis de proteínas), de este modo su producción es perfectamente regulada.
- Para la producción industrial de un AA se necesita eludir los mecanismos regulatorios, y así poder obtener una cepa superproductora y así producir el AA en forma económica.
- Se ha trabajado con *Brevibacterium flavum* para producir lisina.

# REGULACIÓN Y SECRECIÓN DE AA

- La producción de lisina por *Brevibacterium flavum* está bioquímicamente controlada a nivel de la enzima aspartoquinasa, de manera que el exceso de lisina, por retroalimentación, inhibe la actividad de esta enzima.
- La superproducción de esta enzima puede lograrse aislando mutantes de *B. flavum* en los que la aspartoquinasa ya no está sujeta a inhibición por retroalimentación.
- Esto se hace aislando mutantes resistentes al análogo de la lisina, S-aminoetilcisteína (AEC) el cuál se une al sitio alostérico de la aspartoquinasa y bloquea la actividad de esta enzima.

LISINA Y SU ANÁLOGO (AEC) EL QUE INHIBE EL CRECIM. LOS MUTANTES RESISTENTES TIENEN UN SITIO ALTERADO EN LA ASPARTOQUINASA, ASI CRECEN Y SUPERPRODUCEN LISINA



# REGULACIÓN Y SECRECIÓN DE AA

- Los mutantes AEC resistentes que se obtienen fácilmente por selección positiva producen una forma mutante de aspartoquinasa con un sitio alostérico que ya no reconoce AEC ni lisina y por ello la inhibición por retroalimentación por lisina se reduce grandemente.
- Estos mutantes pueden producir más de 60 g/l de lisina a escala industrial.

# REGULACIÓN Y SECRECIÓN DE AA

- Otro punto importante en relación con la producción industrial de AA es la secreción.
- En general los organismos no excretan metabolitos esenciales como los AA.
- Modificando la excreción, las elevadas concentraciones que podrían producir inhibición o represión, incluso en mutantes resistentes, generalmente no se producen dentro de las células.
- La excreción se estimula por varios caminos, como ejemplo el caso del ácido glutámico.

# REGULACIÓN Y SECRECIÓN DE AA

- Acido glutámico
- *Corynebacterium glutamicum* se utiliza para su producción, requiere la vitamina biotina, un cofactor esencial en la biosíntesis de los ácidos grasos.
- La deficiencia de biotina lleva a un daño en la membrana (como resultado de una pobre producción de fosfolípidos) y, bajo estas condiciones, el ácido glutámico es excretado.

# REGULACIÓN Y SECRECIÓN DE AA

- El medio utilizado para la producción comercial de ácido glutámico, contiene por tanto, suficiente biotina para obtener un buen crecimiento, después del cual se impone una deficiencia de biotina y el ácido glutámico es excretado.

# BIOCONVERSIÓN MICROBIANA

- Los M.O. son capaces de hacer ciertas transformaciones que no es posible realizar mediante reacciones químicas.
- La biotransformación o bioconversión implica el crecimiento del organismo en grandes fermentadores, seguido en el momento oportuno de la adición del compuesto químico que se desea transformar.
- Se deja que el M.O actúe y luego se corta la fermentación y se purifica el compuesto desde el caldo de fermentación.

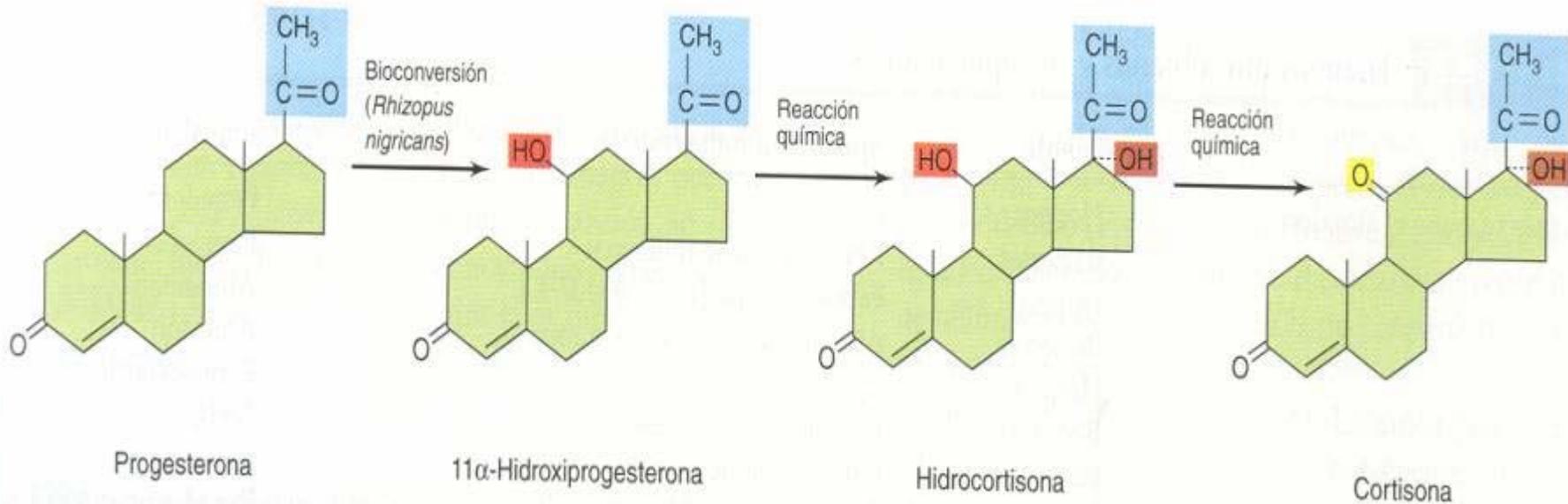
# BIOCONVERSIÓN MICROBIANA

- Un ejemplo de esto es la producción de hormonas esteroideas.
- Algunos esteroides (que regulan varios procesos metabólicos) se usan como medicamentos.
- Los esteroides adrenocorticoides reducen la inflamación y por lo tanto son útiles en el tratamiento de las alergias y la artritis.
- Los esteroides en general pueden producirse químicamente, pero el proceso es caro y complicado. Ciertos pasos de estas síntesis, los hacen mas eficientemente algunos M.O.

# BIOCONVERSIÓN MICROBIANA

- Cortisona e hidrocortisona
- El hongo *Rhizopus nigricans* realiza la hidroxilación estereoespecífica clave de un precursor de la cortisona.
- La mayoría de las bioconversiones de esteroides implican hidroxilaciones de este tipo, así se utilizan varias cepas distintas de hongos.
- La producción de esteroides suele ser un gran negocio ya que la venta mundial de hidrocortisona, cortisona, prednisona y prednisolona supera las 800 toneladas/año.

# PRODUCCIÓN DE CORTISONA UTILIZANDO UN M.O.



# **PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS**

- **De los productos microbianos fabricados comercialmente, probablemente los mas importantes son los antibióticos.**
- **Los antibióticos son sustancias químicas producidas por los M.O. que matan o inhiben el crecimiento de otros M.O.**
- **Los antibióticos son productos del metabolismo secundario.**
- **Su rendimiento en los cultivos es en general bajo, pero debido a su alta actividad terapéutica y por su alto valor económico pueden ser producidos por fermentación.**
- **Muchos antibióticos pueden ser producidos químicamente, pero en general su fabricación es muy compleja debido a lo complejo de sus estructuras.**

# PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

- Los antibióticos que se producen comercialmente provienen de hongos filamentosos y de bacterias del grupo de los Actinomicetos.
- Existen varios grupos de antibióticos químicamente relacionados, por lo que se habla de familias de antibióticos y así se clasifican.
- Existen mas de 8000 compuestos que actúan como antibióticos, pero se espera que se descubran mas de estos compuestos, utilizando otros M.O. o diseñando las estructuras mediante computador.

# PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

- El procedimiento que se sigue es utilizar un computador para estudiar los modelos de interacción entre la diana de un medicamento (por ejemplo una proteína específica) y una versión modificada de un fármaco conocido.
- Así se puede utilizar un computador para escrutar varios fármacos conocidos y predecir su eficacia.
- Los compuestos identificados de este modo pueden ser sintetizados mediante modificaciones químicas o biológicas de los existentes y ensayarse para determinar su eficiencia química.

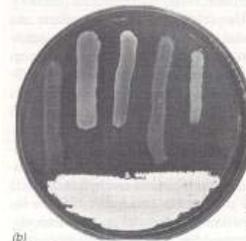
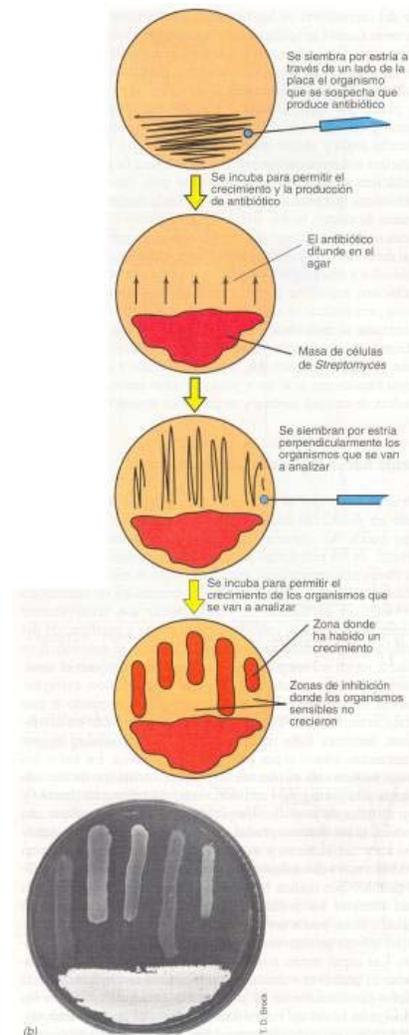
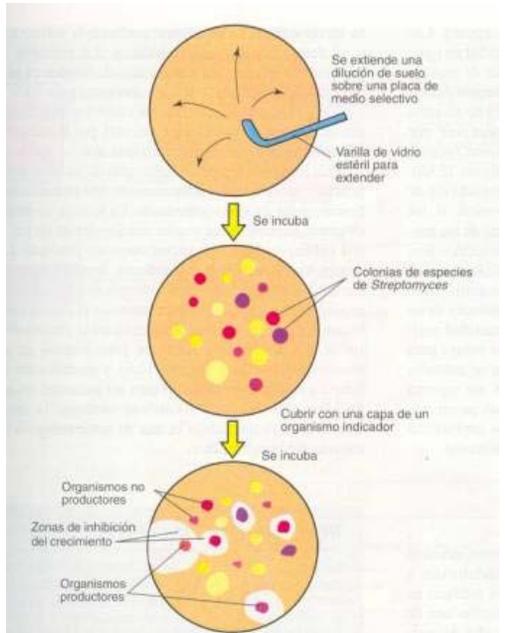
# PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

- El principal camino por el cuál fueron descubiertos en el pasado los nuevos antibióticos fue por rastreo.
- A partir de muchos cultivos axénicos de M.O. posibles productores de antibióticos se prueban para ver si los producen, observando si se producen zonas de inhibición sobre bacterias utilizadas como control.
- Las bacterias control son específicamente patógenos bacterianos o relacionadas con ellos.

# PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

- Si efectivamente se ha obtenido un antibiótico se debe revisar que sea nuevo y en ese caso es necesario revisar su no toxicidad y su efectividad terapéutica.
- Solo unos pocos de estos son útiles y se producen posteriormente a nivel industrial.
- Un antibiótico que va a ser producido comercialmente, debe ser producido con éxito en fermentadores industriales a gran escala.
- Lo siguiente es el desarrollo de métodos de purificación eficientes.

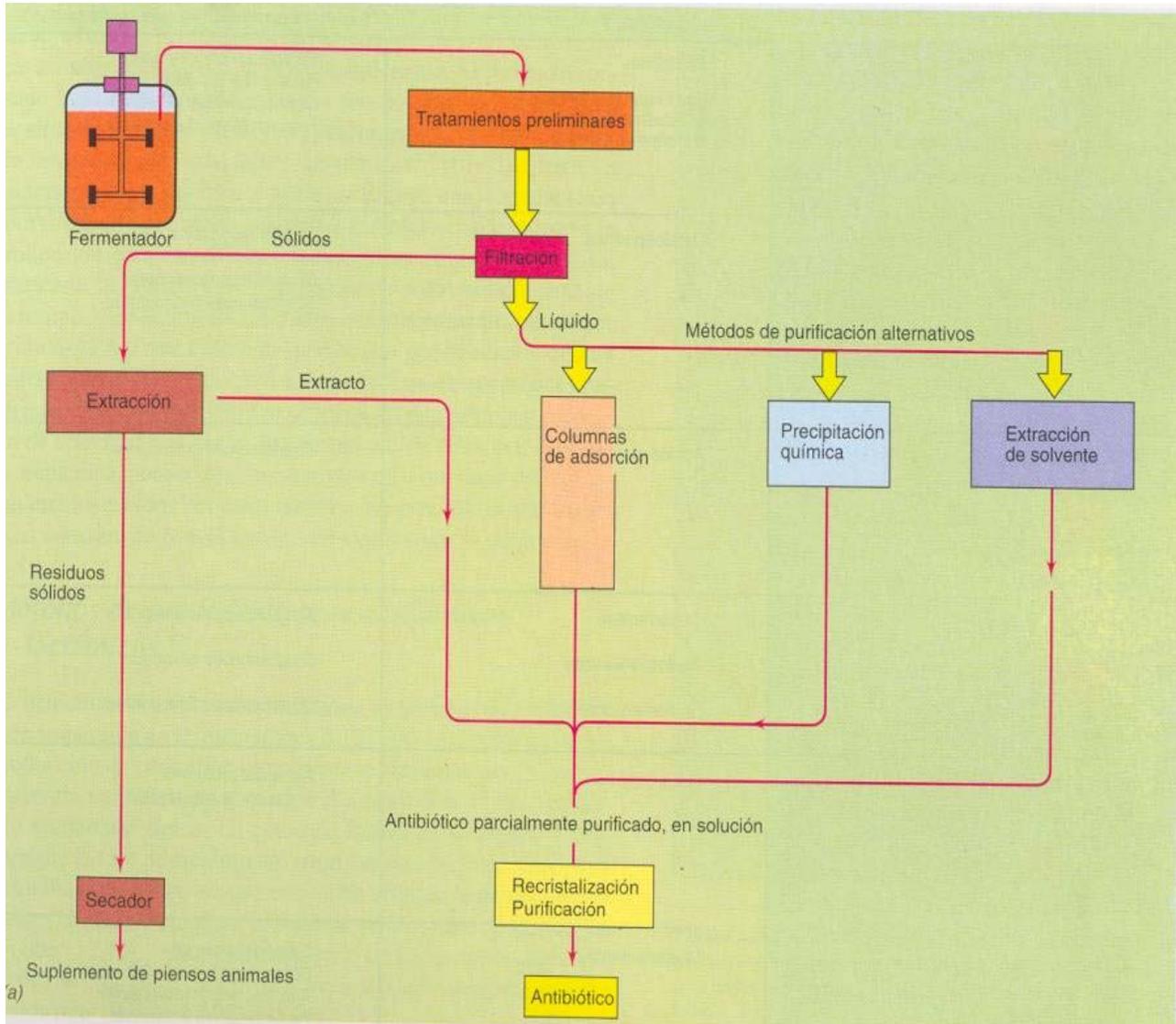
# AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ANTIBIÓTICOS



# **PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS**

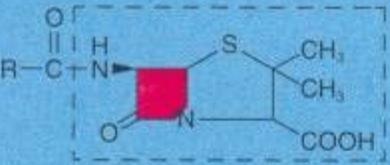
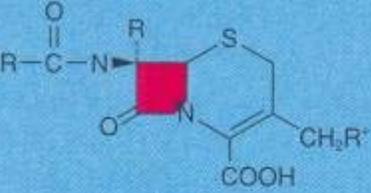
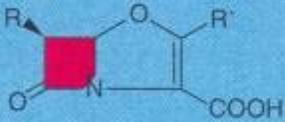
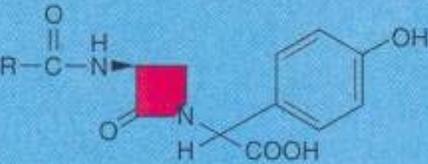
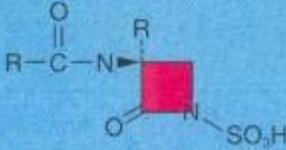
- **Las cantidades de antibiótico son normalmente bajas, por lo que se requieren métodos de extracción y purificación muy elaborados.**
- **Se debe llegar a un producto cristalino de alta pureza.**
- **Así se debe trabajar con un antibiótico que sea producido con alto rendimiento.**
- **Se ha utilizado mutagénesis e ingeniería genética con este fin.**
- **La alteración en los mecanismos de regulación también sirven a este fin.**

# PROCESO COMPLETO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE UN ANTIBIÓTICO



# ANTIBIÓTICOS B- LACTÁMICOS: LA PENICILINA Y SUS PARIENTES

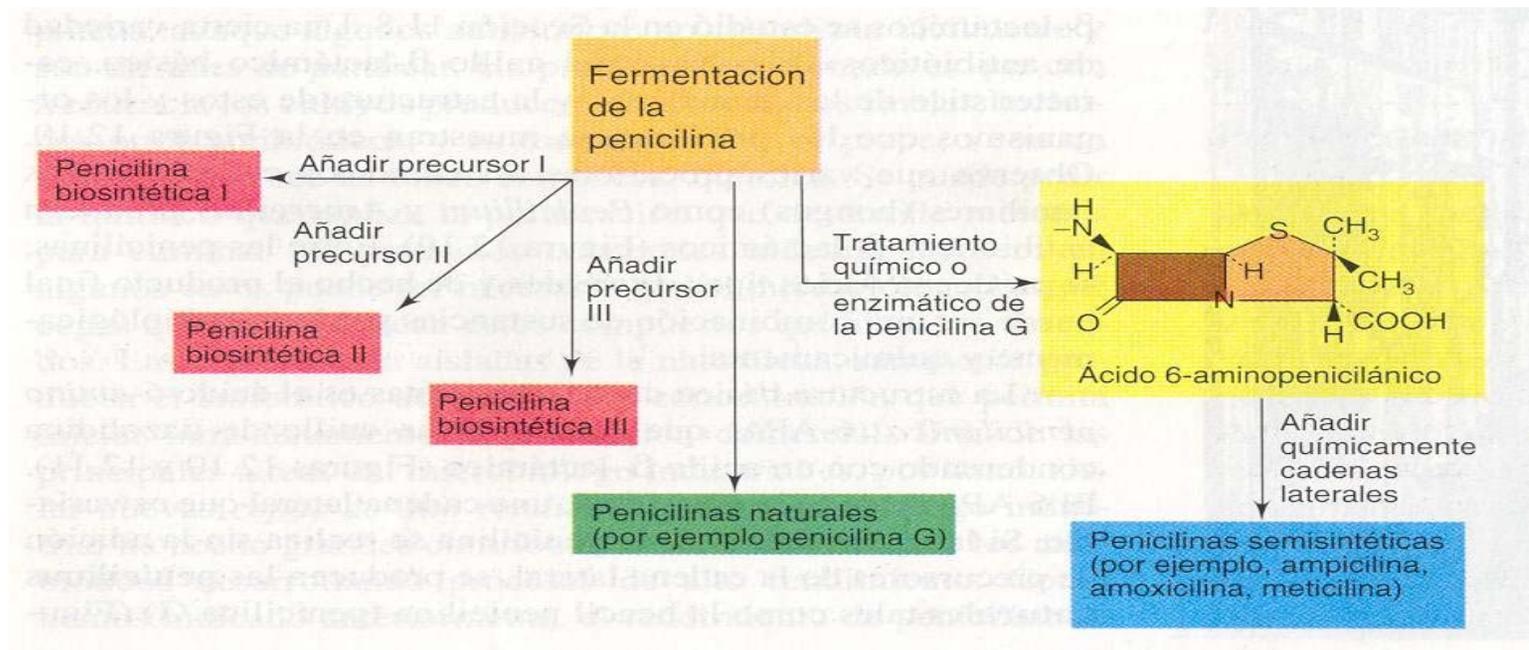
- Una serie de procariotas, además de *Penicillium* y *Aspergillus* producen estos antibióticos.
- Entre las penicilinas, se producen varios tipos diferentes y de hecho el producto final puede ser una combinación de sustancias producidas biológicamente y químicamente.
- La estructura básica de las penicilinas es el ácido 6-amino penicilánico (6-APA).
- Si la fermentación de la penicilina se realiza sin la adición de precursores de la cadena lateral, se producen las penicilinas naturales tales como la bencil penicilina (penicilina G).
- Si se agrega algún precursor se obtendrá la pen. deseada.

Estructuras básicas	Antibióticos	Especies productoras más importantes
Penema 	Penicilinas (las líneas de puntos encuadran el ácido 6-aminopenicilánico)	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
Cefema 	Cefalosporinas	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Nocardia lactamdurans</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
Clavama 	Ácidos clavulánicos	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Carbapemada 	Tienamicinas Ácidos olivánicos Epitienamicinas	<i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Streptomyces flavogriseus</i>
Monolactama 	Nocardicinas	<i>Nocardia uniformis</i> subsp. <i>tsuyamanesis</i>
	Monobactamas	<i>Gluconobacter</i> sp. <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Pseudomonas mesoacidophila</i> <i>Flexibacter</i> sp. <i>Acetobacter</i> sp.

# ANTIBIÓTICOS B- LACTÁMICOS: LA PENICILINA Y SUS PARIENTES

- El producto obtenido de esta forma se llama penicilina biosintética.
- Para obtener penicilinas con actividad frente a las Gram negativas es necesario, realizar un procedimiento químico, lo que conduce a las penicilinas semisintéticas.
- Estas últimas tienen la ventaja de poder ser administradas por vía oral, por lo que no requiere una inyección. Ej. Ampicilina.

# PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE PENICILINA. LA FERMENTACIÓN NORMAL CONDUCE A LAS PEN. NATURALES. AL AÑADIR COMPUESTOS SE OBTIENEN OTRAS PENICILINAS



# ANTIBIÓTICOS B- LACTÁMICOS: LA PENICILINA Y SUS PARIENTES

- La penicilina G se produce utilizando un proceso de fermentación sumergida en fermentadores de 40.000 a 200.000 litros.
- La producción de penicilina es un proceso altamente aeróbico y requiere una eficiente aireación.
- La penicilina es un metabolito secundario típico, así se produce muy poco durante el crecimiento (trofofase) y se desarrolla en la fase estacionaria (idiofase).

# ANTIBIÓTICOS B- LACTÁMICOS: LA PENICILINA Y SUS PARIENTES

- Uno de los componentes principales de esta fermentación es el licor de maceración del maíz, el que contiene fuente de nitrógeno además de factores de crecimiento.
- Lactosa es la fuente de carbono.
- La cadena lateral de la pen. G es la porción fenilacilo y los rendimientos de pen. Aumentan si se añade ácido fenil acético como precursor.
- La penicilina G es excretada al medio y luego de separar las células por filtración, se baja el pH del medio y del caldo filtrado se extrae el antibiótico con un solvente.

# ANTIBIÓTICOS B- LACTÁMICOS: LA PENICILINA Y SUS PARIENTES

- Después de la concentración con el solvente, el antibiótico se vuelve a extraer pasándolo a un medio acuoso alcalino donde se concentra más y luego cristaliza.
- Otro tipo de B lactámicos son las cefalosporinas, que son producidas por *Cephalosporium acremonium*.
- Otros productos no antibióticos son aquellos capaces de inhibir la actividad B-lactamasas de las bacterias, las que destruyen las penicilinas (se utilizan en conjunto con ellas y son mas efectivas).

# PRODUCCIÓN DE TETRACICLINA

- Un gran número de pasos enzimáticos están implicados en la síntesis de tetraciclina.
- En el caso de la clorotetraciclina pueden estar implicados hasta 72 productos intermedarios; involucrando mas de 300 genes.
- *Streptomyces aureofaciens* es la bacteria implicada en la producción de este antib.
- Se sabe que tanto la glucosa como el fosfato producen represión de la síntesis.

# PRODUCCIÓN DE CLOROTETRACICLINA CON *STREPTOMYCES AUREOFACIENS*

