

MICROBIOLOGÍA APLICADA

TEMA 1

INTRODUCCIÓN

La microbiología aplicada tiene 2 grandes partes:

- * Aplicaciones clínicas y sanitarias
- * Microbiología industrial (la que se trata en esta asignatura)

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL:

Disciplina que estudia la utilización de los org cultivados a gran escala para obtener productos comerciales de interés.

La industrial nace con el estudio de las primeras fermentaciones elaboración de vino y cerveza, el padre" de esta es Louis Pasteur 1822– 1895.

Mosto -----Vino

Glucosa-----etanol

Pasteur tb vio que cuando los vinos se estropean es debido tb a los org:

Vino-----vinagre

Etanol-----ácido acético

En b industrial potenciamos y optimizamos reacc que los org son capaces de llevar a cabo por sí mismos.

Las 3 funciones pciales que ha de tener un biólogo I:

- Estudiar y conocer toda la biología del org con el que trabaja.
- Manipular estos org con la finalidad de optimizar el proceso.
- Conocer el proceso desde el pto de vista técnico.

BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA:

Acuñado este concepto en 1982 y es la disciplina que estudia aquellos procesos llevados a cabo por org modificados genética/.

OBTENCIÓN DE UN MICROORGANISMO INDUSTRIAL:

Siempre su origen es el medio ambiente, se aíslan y se cultivan en laboratorio.

Al aislar org que sintetizan metabolitos de interés vemos que producen bajas [] por lo que hay que manipularlos para que la produzca en grandes cantidades, hay que conseguir superproductores.

Los superproductores se consiguen por técnicas de mutagénesis clásica o por técnicas de ingeniería genética.

Por ejemplo *Penicillium chrysogenum* ---penicilina

Al aislar las 1ras cepas se vio que producían entre 1 y 10 g de penicilina por L de medio de cultivo (muy bajo), entonces se les sometió a mutagénesis clásica (UV, agentes químicos, etc) y se hicieron varias rondas de mutación se seleccionaban siempre los de mayor producción de penicilina. En unas 50 mutaciones se llegó a conseguir cepas de 50000 g de penicilina por L de medio.

*Aislamiento del org y cultivo

*Selección de los mejores productores.

*Manipulación en el laboratorio para obtener el superproductor (org industrial)

CARACTERÍSTICAS QUE DEBE REUNIR UN ORG PARA SER CONSIDERADO DE INTERÉS INDUSTRIAL:

- Producir sustancias de interés.
- Que sea posible su cultivo en medios puros
- Que sean genéticamente estables, que no pierdan las características por las que fueron seleccionados.
- Que sean fáciles de conservar en laboratorio y planta industrial.
- Que sea capaz de crecer en medios económicos.
- No pueden ser patógenos para el hombre, animales o plantas.

Todos los microorganismos utilizados tienen que ser destruidos

- Que sea posible separarlos del medio de cultivo (por ejemplo centrifugando)
- Que sean susceptibles de manipular.
- Que tengan capacidad floculante (formar agregados que precipiten)
 - Las microalgas son actualmente de interés ya que producen carotenos y sustancias potencialmente anticancerígenas, sb tienen el inconveniente de no poder crecer en medios puros y tienen que ir acompañados de otras bacterias.
 - Los org que producen antibióticos al crecer en cultivo puro dejan de producir antibióticos por que no los necesitan.
 - El tiempo de espera de pase de placa es distinto en cada org, los más interesantes desde el pto de vista industrial es el de menor # de pases por tiempo. Tb se puede conservar en frío u otros métodos. Hongos por ejemplo, sus esporas.
 - Los org con capacidad de sedimentar tienen gran interés por que son más fáciles de separar del medio (en levaduras y hongos es más fácil que en bacterias)

CLASIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS INDUSTRIALES OBTENIDOS MEDIANTE ORGANÍSMOS:

" 3 tipos:

Procesos industriales con finalidad de obtener células vivas:

Saccharomyces cerevisiae. Sirven para varias cosas; para la elaboración de levaduras de panadería, para vinos y cerveza.

Las células lisadas para suplementar dietas y piensos.

Procesos encaminados a la obtención de alimentos:

Derivados lácteos.

Bebidas alcohólicas

Productos cárnicos y vegetales fermentados.

Procesos de obtención de metabolitos que producen los org

Penicilina – antibióticos

Hormonas

Enzimas

Etanol

Ácidos orgánicos

TEMA 2

CRECIMIENTO MICROBIANO Y FORMACIÓN DE PRODUCTOS EN LOS PROCESOS INDUSTRIALES.

CICLO DE CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN MICROBIANA

Los organismos aquí crecen en # y no en tamaño como los animales, las bacterias crecen por división llamada fisión binaria, se da la duplicación del núcleo, se forma un septo que dividirá a la © madre en 2 hijas.

Para microorganismos eucariotas, hongos, puede darse también gemación y cada © madre emite 1 yema que tendrá igual dotación genética, que se desprende y origina una ©.

Si aislamos una © cada una se divide en 2 y así obtenemos una población de © provenientes de una sola y a esto se le denomina cultivo puro, tendremos una colonia visible.

Si estudiásemos esto en medio líquido, añadimos el microorganismo al medio (denominado inóculo), si vemos el N° de © frente al tiempo, para cualquier microorganismo obtendríamos una gráfica /:

FASE DE LATENCIA:

Es el período en el que la bacteria se está adaptando al medio. Si partimos de un inóculo que fue preparado en = medio al que lo pasamos y está en fase exponencial, la fase de latencia no se observa casi.

La fase de latencia es muy larga si las © fueron tratadas con calor o radiaciones

ya que tiene que reponerse.

Si el inóculo se prepara en medio completamente distinto al medio a donde lo pasaremos también tarda mucho la fase de latencia.

FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL:

Cada una de las © madre va dando lugar a 2 © hijas y todos los microorganismos crecen de forma exponencial. La tasa de crecimiento o tiempo de generación es distinta para cada microorganismo. El tiempo de generación es lo que tarda una población en duplicarse.

20–30 min para *Salmonella*

12–24 h para *Micobacterium*.

Vemos que es diferente según el microorganismo. Los + interesantes son los de menor tiempo de generación.

El crecimiento exponencial se para la mayoría de las veces por que se agota la fuente del medio de cultivo, entonces entra en la fase estacionaria. Algunos procesos industriales se detienen porque la bacteria genera tóxicos que en altas [] no permite crecimiento de ©, si no cambiamos el medio entramos en fase de muerte ©, a los sistemas en los que hay que cambiar el medio se les denomina sistemas discontinuos.

SISTEMA CONTINUO:

En recipientes con sistema de entrada para el medio de cultivo y sistema de salida para el medio y © que han crecido.

Aquí el cultivo se inicia igual que en el sistema discontinuo, añadimos el inóculo y dejamos que se desarrolle, al llegar a la fase exponencial se retira por debajo una determinada cantidad de medio con © y al mismo tiempo añadimos medio fresco por arriba.

Estos sistemas hay que optimizarlos.

FACTORES MÁS IMPORTANTES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO MICROBIANO:

Son fundamentalmente 3:

* Temperatura

* pH

* O₂

TEMPERATURA:

Dentro de un intervalo, la tasa de crecimiento aumenta a medida que aumenta la temperatura hasta alcanzar un máximo.

Los microorganismos se clasifican en 4 grupos según su T^a óptima:

- Psicrófilos optimo por debajo de 15 o 20 °C
- Mesófilos óptimo entre 20 y 45
- Termófilos Temp. altas mayores de 45
- Hipertermófilos algunos incluso 100 °C

pH:

" un rango para cada microorganismo dentro del que puede crecer y este está en la mayoría entre 5–9. Es muy difícil encontrar microorganismos por debajo de pH=2 o por encima de pH=10.

Aquellos de pH óptimo < 7 son acidófilos

Aquellos de pH óptimo > 7 son alcalófilos

O₂:

En cuanto a la necesidad es importante pero también en cuanto a la tolerancia;

" dos grandes grupos:

Aerobios *obligados

*facultativos

Anaerobios: *Aerotolerantes

*Estrictos

PARÁMETROS A OPTIMIZAR:

- Medio de cultivo
- Determinar su tasa de crecimiento y optimizar esta en función de la temperatura, pH y O₂.

FORMACIÓN DE LOS METABOLITOS A LO LARGO DEL CRECIMIENTO:

Se dividen en 2 grandes grupos

Metabolitos primarios:

Se forman en las primeras fases del crecimiento microbiano y cuya síntesis continúa a todo lo largo del crecimiento hasta que este se pare.

Metabolitos secundarios: en las últimas fases del crecimiento normalmente en la fase estacionaria.

Las fases de crecimiento se dividen en 2, a la que corresponde a crecimiento sin producción de metabolitos se le denomina **Trofofase** y a la de producción **Idiofase**

La diferencia entre M1° y M2° es que los 1° se producen con una sustancia y los 2° siempre se producen como conjunto de sustancias similares estructuralmente.

Streptomyces puede producir hasta 31 M2°, es difícil purificar lo que nos interesa. Los procesos de obtener M2° tienen ventaja en que es más fácil conseguir un superproductor de un metabolito 2° que de 1°.

TEMA 3

CARACTERÍSTICAS DE LAS FERMENTACIONES A GRAN ESCALA

FERMENTACIÓN:

Cualquier proceso bioquímico realizado a gran escala independientemente de que desde el pto de vista bioq sea fermentación (ind de que sea en anaerobiosis o aerobiosis)

A los recipientes utilizados para las fermentaciones se les denomina fermentadores, estos son de distintos tamaños según el producto que queremos obtener, del rendimiento (si se produce o no en gran cantidad) y también dependiendo de si es continuo o discontinuo. Las continuas requieren de fermentadores de mayor tamaño, los más pequeños tienen entre 5 y 10 litros, los más grandes hasta 500000 L.

En producción de enzimas de restricción se utilizan fermentadores de 1000 L.

40000–80000 Químicos

Los mayores suelen usarse para producción de aa, que es de bajo rendimiento.

Los fermentadores se dividen en aerobios y anaerobios:

FERMENTADORES AEROBIOS:

Recipientes cilíndricos de acero inoxidable generalmente, son cerrados. Tienen un tubo para introducción del medio de cultivo y a veces ya va el inóculo junto o también por otro tubo distinto. En la parte inferior se cosecha los microorganismos y medio de cultivo. Hay que tener un filtro para que el aire que entre sea estéril. El sistema de esterilizar el fermentador y el medio es una camiseta que envuelve externamente al fermentador por el que circula agua o vapor caliente.

En fermentadores pequeños de laboratorio este sistema de esterilización llega sin embargo a nivel industrial no se consigue que el calor llegue al centro, entonces llevan estos un serpentín de tubos muy finitos por donde circula agua caliente o vapor y esto rodea por dentro al recipiente.

Su sistema de aireación generalmente sólo lleva 1 que introduce aire a presión y esta pasa por un aspersor (ver gráfica). En fermentadores pequeños llega esto pero en grandes es preciso un sistema de agitación (por espas unidas a un eje central que las mueve un motor), así se distribuye homogéneamente el O₂.

También sirve para mezclar las © y el medio de cultivo. La tendencia a sedimentar de las © es buena al final del proceso pero antes no interesa y por esto se mezclan.

También hay que controlar la temperatura, la camiseta externa sirve para esto, la T^a se fija al principio, no obstante hay por el metabolismo un aumento de la Temp. entonces se pasa agua fría por la camiseta o por el serpentín.

También " un detector (sonda) de pH y 2 dispositivos uno ácido y otro con base para que se suelten unas gotas de lo que haga falta.

Hay que controlar también la espuma, sobre todo en las que tienen agitador (o por el propio metab de la ©) . En esta espuma quedan retenidas © microbianas que si tocan la parte superior del fermentador puede causar problemas, hay una sonda que suelta antiespumante.

Para sist continuo por ordenador ya está todo automatizado y ya saca la cosecha y hecha mas medio.

ESCALADO DE UN PROCESO FERMENTATIVO:

Escala de laboratorio entre 5 y 10 L, de aquí se transfiere a escala industrial (optimizarlo) y a este paso se le denomina ESCALADO.

Anaerobiosis parcial: es uno de los problemas en el escalado ya que a escala de laboratorio podemos ajustar la entrada de O₂ y las revoluciones del mecanismo de aplicación, estos datos no sirven a uno de gran escala.

Otro problema es que los microorganismos producen polisacáridos extra © que transforman el medio de cultivo en un medio muy viscoso por el que pasa mas difícilmente el O₂.

Hay que ajustar a nivel industrial, y no se hace en un paso sino en 2 por lo menos:

1º escala piloto entre 300 y 3000 L y de aquí es más fácil optimizar a escala industrial.

El principal generalmente es el O₂ , una vez que se ajusta entrada de aire y agitación hay que medir presión de O₂. En escala piloto se aumenta la entrada de aire (presión) y agitador para conseguir la misma tensión de O₂ que antes, esto lo repetimos para la escala industrial.

SUSTRATOS QUE SE UTILIZAN PARA LOS MEDIOS INDUSTRIALES

Estos sustratos generalmente son subproductos o desechos de otras industrias.

FUENTES DE CARBONO:

MELAZAS: subproducto de industria azucarera (líquido que queda en los recipientes luego de cristalizar el azúcar) puede ser de caña, remolacha, etc. y su contenido en CH es del 50 al 80 % (remolacha y caña respect). También son importantes por que aportan algo de sustancias nitrogenadas y minerales (elementos traza)

EXTRACTO DE MALTA: extracto acuoso de la cebada malteada, tiene contenido de CH de " 90% algunos son monosacáridos fácilmente metabolizables y otros disacáridos que no todos pueden metabolizar y entonces se puede someter a un tratamiento previo con químicos. También tiene algo de N₂ y elementos traza.

ALMIDÓN: cereales, mandioca (+ barato) y es muy adecuada su fuente de C para productos de amilasas (sino hay que someterlo a reacciones que lo rompan).

LÍQUIDOS SULFÍTICOS DE LAS PAPELERAS: productos residuales de la industria papelera. El contenido en CH es entre 2 y 20% (es muy barato).

CELULOSA: viene de la industria papelera, paja de cereales etc. Es imprescindible que los microorganismos sean productores de celulasas (sino hay que hidrolizar previamente)

ALCOHOLES:

Metanol para microorganismos que lo utilicen como fuente de C.

También etanol en algunos casos (el etanol que no se utiliza, el residuo de su fabricación).

ALCANOS

SUERO DE LECHE: muy rico en lactosa que si los microorganismos pueden usarlo pueden obtener C.

FUENTE DE NITRÓGENO:

SALES DE AMONIO: muy barata, también se usa la urea. No es un subproducto.

LÍQUIDO DE MACERACIÓN DEL MAÍZ: luego de extraer el almidón del maíz se obtiene y tiene 4% de N + aa libres.

EXTRACTO DE LEVADURA: a partir de la levadura de panadería (*S. cerevisiae*) hay que lisar las © para

que se liberen las proteínas, " 2 formas de lisarlas:

A 50–55 °C algunas cepas se lisan solas.

Plasmólisis introduciendo las © en solución de cloruro sódico a alta [].

Aporta ad+ de N, muchas vitaminas del grupo B.

HARINA DE SOJA: a partir de la semilla de la soja luego de extraer el aceite, 50% de proteínas (mucho N) y muchos CH (aunque algunos no son utilizables por los microorganismos) .

PEPTONAS: solamente se utiliza para microorganismos muy exigentes ya que son relativamente caras y hay que fabricarlas, hidrolizados de carne, de caseína de la leche, de gelatina etc.

Casi todos los medios son mezcla de estos productos.

TEMA 4

LOS MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS

Hay dos grandes grupos: * Bacterias Lácticas

* Levaduras, hongos filamentosos.

BACTERIAS LÁCTICAS:

Pueden ser cocos o bacilos, los cocos aparecen aislados, en cadenas, tétradas etc, los bacilos aislados o en cadena. Todas son G+ y catalasa — , todas pueden producir ácido láctico. No forman esporas, son inmóviles. En función de su relación con el O₂ se clasifican en:

AEROTOLERANTES: Su hábitat es la leche, y son también microbiota de boca e intestino. Tienen muchos requerimientos nutricionales (poca capacidad biosintética), son capaces de crecer a pH ácido, la mayoría por debajo de 5 e incluso 4. Cuando se desarrollan en la leche, bajan su pH (esto sirve para evitar la acción de los putrefactores *Pseudomonas*, *Enterobacterias*, *Alcalígenes*, *Acinetobacter*).

Desde el pto de vista bioq se dividen en 2 grupos:

Homofermentativas: a partir de glucosa sólo se obtiene ácido láctico.

Heterofermentativas: a partir de glucosa se obtiene ácido láctico, etanol y CO₂.

La homofermentativa tienen la aldolasa, para hacer la glucólisis, las Heterofermentativas no tienen la aldolasa y deben degradar la glucosa por la ruta de las pentosas, el CO₂ que se obtiene es lo que nos permite diferenciarlas en laboratorio.

Estas bacterias se clasifican en:

Lactobacilacea (*Lactobacillus*, aislados en cadenas)

Estas bacterias se usan para queso, yogur, charcutería, vegetales fermentados, ensilados de hierba, algunos

vinos (fermentación maloláctica).

HONGOS:

Unicelulares (levaduras) o filamentosos, forman micelios, crecen muy bien en medios de laboratorio, no como las bacterias.

Levaduras: fam. *Sacharomycetoidae* *Sacharomyces*

Kluyveromyces

Zygosacharomyces

Torulaspora

fam. *Cryptococaceae* *Candida*

Sacharomyces:

Puede producirse de dos formas, vegetativa o completando un ciclo sexual, en el que por recombinación pueden formarse cepas interesantes. Si se reproduce de forma vegetativa, es por gemación, que consiste en que emite una yema que crece hasta que se desprende de la madre. Una © puede emitir unas 40 o 5 yemas (5)

que dejan cicatrices y no pueden seguir gemando.

Sexualmente hay dos tipos:

y a haploides que no se distinguen morfológicamente. Cuando dos tipos se encuentran, conjugan y forman un diploide. Ser o a depende de un locus llamado mad, en el que las llevan el alelo mad y las tipo a llevan el alelo mad a. Cada uno de estos genes produce una feromona específica. Cada tipo sexual detecta la feromona opuesta y entonces las © emiten unas protuberancias a través de las que entran en contacto, se fusionan membranas y luego citoplasmas. Por último se fusionan los núcleos (cariogamia) formando una © de gran tamaño, diploide que evolucionan rápido hacia una normal, pero diploide, esta es estable así y puede empezar a gemar mientras haya nutrientes, pero si llega un momento en que haya un medio pobre en N por ej, sufre una meiosis y esporula, dando asca con 4 ascosporas, 2 de tipo a y 2 de tipo , que cuando se liberan al medio liberan 4 © vegetativas.

Se pueden también hacer protoplastos para fusionarlos y obtener así híbridos.

La pared de *Sacharomyces* tiene glucanos y mananos. Para eliminar la pared se hace un tratamiento con -gluconasa. Pero los protoplastos deben mantenerse en medio osmótico adecuado (con sorbitol). Para fusionarlos, los ponemos a los de dos medios distintos con PEG y CaCl₂, y entonces se fusionan primero membranas, luego citoplasma y luego núcleos, obteniéndose un híbrido entre las © parentales.

A veces se fusionan diploides por que los tetraploides tienen mayor tasa de crecimiento.

HONGOS FILAMENTOSOS: menos importantes.

Géneros: *Penicillium* (quesos, charcutería)

Geotrichium (quesos)

Debariomyces (charcutería)

CULTIVO STARTER O INICIADOR:

Es lo que en laboratorio se llama un inóculo, es el cjto de microorganismos con el que se inicia una fermentación alimentaria.

PREPARACIÓN DEL STARTER:

En algunos casos se distribuyen como cultivos frescos, se hace crecer © del microorganismo adecuado todos los días en medio fresco y se distribuyen así. Pero es más frecuente distribuirlos como cultivos congelados, desecados (hasta eliminar el agua a 37–45°C) o liofilizados (desecar a bajas temperaturas y congelar en vacío).

Hay que elegir la forma que mantenga más microorganismos viables, para eso se hacen los 3 métodos y cada 3 meses; 6 meses; 1 año; varios años, se vuelve a su estado normal una muestra y se siembra en placa, para saber cuantas están muertas.

Los laboratorios que hacen starters recomiendan una cantidad determinada de starter para iniciar una fermentación, para eso debe saber cuantas son viables.

En hongos filamentosos suelen liofilizarse, en levaduras desecada o liofilizada (excepto la de panadería: centrifugada y prensada, cultivo fresco), las bacterias depende, son muy sensibles, pueden ir como cultivo fresco si lo _____(6 por detrás)

Antes de usarlos hay que rehidratar los starters.

TEMA 5

ELABORACIÓN DE MASAS PANADERAS:

Las primeras masas fermentadas datan del 2500 a.c. en Egipto, dejando masas con agua de un día para otro.

En el S. XVII se le echaba a las masas espuma de la fermentación de cerveza. En el S: XIX ya se usó la levadura de la cerveza industrialmente para hacer pan.

Así pues, las primitivas fermentaciones eran espontaneas por los microorganismos propios de la harina, que eran *S.cereviciae* sobre todo, *Candida* y *Pichia*.

Aparecen en [] de 103– 104 © /g de harina. También hay bacterias (*Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y sobre todo *Lactobacillus*).

En una fermentación natural estas levaduras aumentan hasta 107–108 ©/g masa. Las bacterias varían mucho su nº según la harina. En fermentación espontánea son las responsables de la acidificación (glucosaácido láctico) y también de las características organolácticas del pan (aroma, etc). *S cereviciae* degrada glucosa hasta pirúvico, y el CO₂ hace las burbujas de la masa, y el pirúvico se descarboxila a acetaldehído y este a etanol (se evapora en la cocción).

HAY 4 FERMENTACIONES DISTINTAS:

MASA AUTOFERMENTADA: espontánea, con la microbiota de la harina, es el más antiguo y largo (3 días), se mezcla la harina con agua, se deja fermentar 12–24 h, y luego se añade más harina y agua, se deja

fermentar otras 12–24 h y se vuelve a añadir harina y agua y la última masa fermentada se usa para elaborar el pan.

MASA LEVADURA: se mezcla primero harina con agua, se deja fermentar 12–24 h y en el siguiente paso se añade harina, agua y levadura comercial (*S. cerevisiae*), se añade de levadura el 82% de la masa. Así se consigue buen pan, porque se desarrollan también bacterias que dan aroma y buenas características organolépticas, etc.

DIRECTA: se mezcla agua, harina y levadura comercial, es el más rápido, pero las levaduras crecen muy rápido y no dejan a las bacterias, por lo que hay menos aroma. El esponjamiento es bueno.

PODISH: Harina mezclada con agua al 50 % y se añade levadura y hace variar las características organolépticas porque las bacterias no se desarrollan igual.

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE CO₂ DE LA MASA PANADERA:

Composición media de harina: almidón 72%

agua 10%

proteínas (gluten) 12%

azúcares directa/ asimilables 2%

glucosa 0,1–0,2%

sacarosa 0,2–0,3%

levosina 0,5%

Sales minerales 1,5%

S. cerevisiae sólo utiliza los azúcares directamente asimilables, porque no tiene amilasas. Entonces, esta levadura produce CO₂, insuficiente para esponjar bien. Desde que comienza la fermentación se produce mucho CO₂ hasta llegar a 1 h y se para, luego vuelve a comenzar a las 2h y dura hasta las 4h.

Esto ocurre mientras *S. cerevisiae* usa los azúcares asimilables directamente. Después, hay amilasas en la harina que vuelven a dejar un 15–20% del almidón como maltosa a las 1:30–2h, y entonces *S. cerevisiae* prepara enz para la maltosa y vuelve a actuar y producir CO₂. Esto ocurre siempre en cualquier fermentación, la única diferencia está en la velocidad (mayor con métodos más recientes). Las mejores condiciones son pH 4,5–6, Tª 26–28°C. A veces se añaden a la harina amiloglicosidasas fúngicas.

Una buena cepa panadera debe reunir:

- * Rápida capacidad fermentativa

- * Producción de maltasas.

Hay cepas recombinantes en fase experimental que sobreexpresan algunos de estos enzimas.

TEMA 6

PRODUCTOS FERMENTADOS DERIVADOS DE LA LECHE

COMPOSICIÓN PRINCIPAL DE LA LECHE:

LACTOSA: utilizado por bacterias lácticas como fuente de C.

PROTEÍNAS: sobre todo la Caseína que precipita formando el cuajo en queso y yogur, también hay albúminas y globulinas, pero no pasan a derivados porque son solubles y quedan en el suero, que se retira en el queso, no tanto en yogur.

GRASA: depende según si es de cabra, oveja o vaca, en cabra es el doble.

Tiene sobre todo los ácido grasos palmítico, esteárico y oleico, además en la cabra está el capricho.

Estos son los que producen compuestos que dan el aroma y sabor a derivados.

SALES: fosfatos y Mg (inorg), nitrato (orgánico) , sabor y olor de derivados sobre todo mantequilla.

ENZIMAS: lipasas(degradan ácido grasos para dar aroma y sabor) amilasas, lactasas y fosfatasa.

Si el animal del que procede la leche está sano, los únicos microorganismos que deben de haber son las bacterias lácticas pero puede contaminarse de microorganismos del suelo, mamas y utensilios. Por eso, después de ordeñadas pueden aparecer coliformes y otros, si la analizamos. Si son bacterias psicrófilas, se eliminan con pasteurización, pero si son termófilas pueden sobrevivir, son peligrosas, es el caso de las bacterias esporuladas.

Por esto antes de utilizar la leche para un derivado hay que determinar la calidad bacteriológica de la leche, que se hace en base a 4 parámetros, que determinamos cuando la leche entra en la planta industrial.

El primer control que se le hace es un recuento de microorganismos viables normalmente en placa, para cada muestra se siembra 3 placas, una se incuba a 17°C para psicrófilos, otra a 35–37°C para mesófilos y a 40–44°C para termófilos. El resultado se expresa como UFC/ml de leche.

En 2º lugar se hace un recuento de totales en microscopio porque si hay muchos muertos tampoco es señal de calidad.

En 3º lugar se mide el tiempo de reducción del azul e metileno, ya que esta reducción la hace la reductasa de las bacterias y entonces pasa a color blanco cuanto menor sea este tiempo, mayor es la carga bacteriana de la leche.

En 4º lugar hay que medir el tiempo que la leche puede permanecer a Tª ambiente 22°C sin que al hervirla coagule. Cuanto menor sea el tiempo mayor será la carga bact. de la leche.

En función de estos 4 parámetros, la normativa establece 2 tipos de leche:

Leche de grado A:

De alta calidad definida por estos parámetros: <100000 ufc/ml (viables)

<200000 ufc/ml (totales)

>5h de tiempo de reducción del azul e metileno.

>24h de tiempo que se puede dejar a temperatura ambiente sin que coagule al hervirla.

Leche de grado B:

Hay 2 tipos, la leche buena y la leche mala.

Leche Buena: 105–106 ufc/ml (viables) Leche Mala: (no apta para consumo)

2x105–106 ufc/ml (totales) >106 ufc/ml (viables)

2–5h de t. de reducción del >106 ufc/ml (totales)

azul de metileno <2h de t. de reducción.

12–24h a T^a ambiente. <12h a T^a amb.

Para derivados lácteos sólo se puede utilizar leche de grado A.

Otras pruebas se hacen para detectar antibióticos, que pueden proceder de piensos y este uso indiscriminado de antibióticos crea cepas resistentes de patógenos. Esta prueba es muy sencilla, se hace en placa de Petri, con un microorganismo testigo, sembrado por extensión en césped, y encima se deposita un disco impregnado con una cantidad conocida de leche (debe ser una cepa sensible a antibiótico), si en la leche hay antibiótico se ve un halo de inhibición del crecimiento. Si hay el ab. es necesario también saber su cantidad (permitido <de 0,054 g) para esto en la misma placa se ponen discos con [] conocidas.

La leche, una vez caracterizada como grado A y sin ab. puede usarse para derivados, pero antes debe sufrir un proceso de pasteurización, que puede ser por 3 métodos:

A BAJA T^a: someter la leche a 62°C durante 30 min, suficiente para eliminar *Micobacterium tuberculosis*, pero no elimina *Coxiella burnetti* (agente causal de la fiebre Q), por eso se prefiere el siguiente tratamiento.

72°C DURANTE 15 SEG.

UHT: el de la leche en tetra brick se somete la leche a Temp. de 87–93°C durante períodos cortos (1–2 seg) es el más efectivo, y sólo podrían sobrevivir los esporulados.

Si la pasteurización ha sido efectiva, en la leche no puede haber más de 20000 bacterias/ml y esto se puede determinar en un ensayo enzimático para determinar la presencia de fosfatasa activa, la cual se inactiva a >= 65°C lo cual es muestra de una buena pasteurización. Para la prueba se añade P–nitrofenil fosfato (incoloro), si hay fosfatasa activa libera paranitrofenol (amarillo) cuantificable espectrofotométricamente y fosfato.

Puede que la contaminación sea después de la pasteurización. A veces es mejor la de baja Temp. por que favorece a los derivados lácteos en cuanto a aroma, sabor y mejor rendimiento de los microorganismos fermentadores.

DERIVADOS LÁCTEOS, ELABORACIÓN DEL YOGUR:

El sustrato es leche entera, desnatada o concentrada (con un poco menos de agua, o con suplemento de leche en polvo, así se [] más la caseína), también se añaden aromatizantes, edulcorantes, azúcar, si lo va a llevar el yogur.

Las cepas que se inoculan a la leche pasteurizada son 2, *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*

(*S.salivaris sbsp termophilus* y *L. del brueckii sbsp bulgaricus*, también denominados respectivamente).

Estas bacterias se añaden en = cantidad, primero hidrolizan la lactosa en glucosa y galactosa (con una -galactosidasa).

La glucosa forma el ácido láctico responsable del descenso del pH y entonces precipita la caseína y forma gel que es el yogur (la galactosa permanece en la leche).

Un 20-30% de la lactosa es consumida inicialmente, para pasarla a ácido láctico. Durante la 1ª parte de la fermentación, ambas bacterias se desarrollan al = tiempo mientras hay péptidos y aa libres, cuando se acaban, los *Streptococos* mueren porque no producen proteasas, pero *Lactobacillus* si las produce y sigue creciendo y por acción de sus proteasas vuelve a crecer *Streptococcus*. Aunque el producto final es ácido láctico, también se producen metabolitos 2º como acetaldehído (aroma típico del yogur), esta es una de las capacidades en las que se basan para la selección de cepas.

TÉCNICAS PARA LA ELABORACIÓN DEL YOGUR:

YOGUR FIRME: pasteurización, inoculación de cepas a [] =2 respecto a la leche, se mezclan en la leche esta distribuye en recipientes individuales y se deja fermentar 2-3 h a 42°C. La fermentación se detiene cuando [] de ácido láctico =1% (se detiene bajando la temperatura, para yogur con aromas se les hecha antes de la fermentación), y se guardan a 2-3°C suficiente para la fermentación.

YOGUR BATIDO: igual pero en recipiente único, y al final se bate la cuajada y se envasa, en este caso se añade parte del azúcar al pcpio y otra parte al batir, junto con la fruta si es que lleva.

Tª óptima de *Strept.* 40°C, de *Lactobacillus* 45°C, se suele hacer 1h a 42°C y otra a 45°C (sin embargo se ha visto que juntas van mejor a Tª intermedias).

Una vez elaborado dura unos 24 días por debajo de 8°C (se detiene la act. de las bacterias lácticas, pero no todas y sigue degradándose lactosa a ácido láctico, y ad+ también hay proteólisis por proteasas de *Lactobacillus*, que degrada la cuajada y da sabor amargo). Esta formación de ácido láctico y proteólisis se evitaría con una pasteurización posterior al proceso (postres lácteos por ley no se pueden llamar yogur si no tienen bacterias vivas), el yogur debe tener unas 109 ©/g vivas.

CARACTERÍSTICAS DE INTERÉS EN LAS CEPAS DE YOGUR:

- producción de acetaldehído.
- Producción de polisacáridos extracelulares (glucanos), dan yogures más cremosos.
- Resistentes a fagos que pueden producir graves pérdidas. Se conocen 4 tipos de fagos y las cepas comerciales son resistentes a ellos. Si aparece un fago nuevo, hay que volver a aislar a la cepa resistente, esto es fácil, se siembra en placa (a partir del yogur donde apareció el fago), y si hay alguna colonia, esa es resistente al fago. Esta resistencia se debe al cambio de receptores externos de la bact.

ALTERACIONES: Sólo por laguna espesa que quede luego de pasteurizar o que llega al yogur durante el envasado. Gral/ por otra razón no por que es un medio ácido que no lo resisten muchas bacterias.

YOGURES TERAPÉUTICOS:

Se comercializan con el nombre de Bioyogurt, se les atribuye ventajas o beneficios a la salud el hombre, la tecnología de fermentación es = que la tradicional y se diferencia en los microorganismos que " en el producto. Ad+ de *S.t* y *L.b* aparecen otras dos cepas que son *Lactobacillus acidófilus* y el *Bifidobacterium longum* (2 bacterias intestinales).

PROPIEDADES:

- Reestablecen la biota normal.
- Previenen contra infecciones.
- Pueden ayudar a controlar los niveles de colesterol.
- Se ha demostrado que pueden producir sust antitumorales.

Para que sirvan hay que asegurar que lleguen vivas al intestino y que se implanten y proliferen.

Hay mucha variabilidad en cuanto a sensibilidad del pH, se seleccionan las que más aguantan. También las que resisten y viven en presencia de bilis, son las que llegan vivas al intestino y se considera que si al menos llega 106 ©/ml vivas al intestino vale.

ALTERACIONES EN EL YOGUR:

Sólo levaduras y hongos las producen, por sobrevivir a pH ácido. Las contaminaciones suelen ser antes del envase.

OTRAS LECHES FERMENTADAS:

Kefir *Candida kefir*

S. cerevisiae ø Forman agregados como coliflores

Bacterias lácticas

QUESOS:

Son en realidad conservas de leche, a diferencia del yogur, la tecnología de fermentación varía con cada tipo de queso.

La elaboración del queso comienza con el tratamiento de la leche. No hace falta siempre pasteurizarla, está permitido. Los quesos que no se hacen con leche cruda son mas estandarizados, no tienen flora autóctona, se usan fermentos comerciales.

La pasteurización que se usa es suave, esto permite que algunos enzimas liberados por los microorganismos permanezcan activos para después.

También se añade entonces –caroteno (colorante) si es necesario, también bacterias lácticas (si es que van a intervenir) tras la pasteurización.

Luego se realiza la coagulación de la leche, de la que hay 3 tipos:

- láctica
- enzimática
- mixta

LÁCTICA: Es la más sencilla, se lleva a cabo sólo con bacterias lácticas (*Lactococcus lactis*, *L.cremoris*, *L.diacetylactis*), la caseína se estabiliza por el bajo pH, dando un gel, como en el yogur.

ENZIMÁTICA: se lleva a cabo con un enzima llamado quinosina o renina, aislada del estómago de los terneros lechales, actúa hidrolizando la caseína (hay varios tipos de caseína , , ,) en un solo pto,

apareciendo 2 péptidos, paracaseína y caseína macropéptida)

Las proteínas en la leche pueden encontrarse en partículas denominadas submicelas, y estas pueden unirse entre sí, formando micelas globulares, con lo hidrofílico hacia fuera. Cuando la quimosina corta estas micelas, pierden capacidad de hidratación y precipita formando un gel llamado cuajada enzimática, la cual con el tiempo se retrae y expulsa el lactosuero (a esto se le denomina sinéresis).

MIXTA: intervienen tanto la quimosina como las bacterias lácticas, son las de la mayoría de quesos.

El 3º paso es el corte de la cuajada, con la finalidad de dar forma al queso, envasarlo y porque en trozos menores expulsa mejor el lactosuero.

El 4º paso es el calentamiento de la cuajada, este calentamiento puede ser muy suave, o más severo, hasta 55°C. La finalidad es eliminar el lactosuero y conseguir cuajadas más compactas.

A continuación la cuajada se sala y seguidamente se añaden los microorganismos que van a intervenir en la maduración del queso, al mismo tiempo que la sal.

En algunos quesos se prensa la cuajada para eliminar restos de suero.

Finalmente el queso se pone a madurar en cámaras con Tª y humedad controladas. Los enzimas son lipasas, estos ácido. grasos normalmente se esterifican, dando aroma y sabores) y proteasas (aa aminas, que también dan propiedades organolépticas), pero estos procesos deben controlarse, en exceso pueden ser perjudiciales.

TIPOS DE QUESOS:

- quesos frescos
- quesos de pasta blanda
- quesos de pasta prensada
- quesos de pasta azul
- quesos de pasta cocida prensada

QUESOS FRESCOS: se elaboran únicamente mediante coagulación láctica, intervienen los *Lactococcus* de antes. Se consumen así, recién hecha la cuajada, sin maduración. Así son el Ricota y Cottage)

QUESOS DE PASTA BLANDA: De este tipo es el Camembert, hecha con cuajada láctica, pero se añade a veces en poca cantidad quimosina y también se añaden levaduras (*Sacharomyces*, *Torula*) que intervendrán en maduración (se añaden a la leche al pcpio).

Se espera a que se forme cuajada, luego esta se corta, se da forma, se enjuaga y se cubre con esporas de *Penicillium camemberti*, y así se lleva ya a cámaras de maduración, y se lleva a cámaras entre 13–15°C.

Torulensis hidroliza lactosa a alcoholes, ácidos orgánicos y acetato de etilo (aroma de queso fresco).

Una vez germinado el *Penicillium* forma la corteza blanquecina, una vez formado el micelio de la superficie aparecen otras bacterias _____ que completan la maduración (*Staphylococcus*, *Brevobacterium*) dándole color rosáceo en superficie y entonces se considera apto para la venta.

QUESOS DE PASTA PRENSADA: la cuajada se prensa y es muy densa, así son el Gouda y el Cheddar.

Se forma por cuajada enz, a veces se añaden bacterias lácticas, pero poca cantidad, tras hacer la cuajada se sube la Tª entre 2–7°C por encima de 32°C. Seguidamente se añaden los microorganismos de la maduración:

Debariomyces hansenii, *Geotrichum candidum*. Después se meten en las cámaras de maduración, un tiempo que depende según el queso que se quiera.

QUESOS DE PASTA AZUL: como ejemplo el Roquefort, recibe este nombre aquellos quesos en cuyo interior está el hongo *Penicillium roqueforti*, se elabora por cuajada láctica y también se añaden bacts del género *Leuconostoc*. Las esporas de *Penicillium roqueforti* se añaden también al pcpio. Una vez que se forma la cuajada, se bate, se mezcla, se coloca en moldes y se coloca en cámaras de maduración. Durante el proceso de maduración hay que hacer agujeros en la cuajada para que se desarrolle bien el penicillium. También se desarrollan en el interior bacterias del género *Leuconostoc*, e el CO₂ que producen hace fisuras en la cuajada favoreciendo el desarrollo de *Penicillium* en esas fisuras. El hongo, igual que en *P.camemberti* es lipolítico y muy proteolítico, degradando mucho la cuajada (quesos de untar).

QUESOS DE PASTA COCIDA PRENSADA: Su cuajada es muy compacta porque se prensa y se calienta. Se caracterizan por sufrir 2 fermentaciones distintas, por un lado hay una fermentación por bacterias lácticas, seguida de una 2ª fermentación por bacterias propiónicas. Un ej es el emental. Durante la elaboración, primero se mezcla con leche con quimosina y bacterias lácticas que en este caso son termófilas, no como las ya vistas (*Strep. thermophilus*, *L. helveticus* y *L. del brueckii*)

Esta mezcla se pone a 32°C y se forma la cuajada pero las bacterias lácticas termófilas no desarrollan a esa Tª sino que se desarrollan en las 24h siguientes en las que la cuajada se somete a 55°C. En general crecen más hacia los bordes del queso. Durante este período la cuajada se acidifica (lactosa-ác láctico). A continuación la cuajada se enfría, se sala se corta y se mete en cámaras de maduración, en dónde actúan las bacterias propiónicas (gen. propionibacterium), se caracterizan por utilizar azúcares y además ácidos y alcoholes como fuente de C todas son G⁺, su Tª óptima es de 3 pero pueden sobrevivir a 76°C/10 seg. pudiendo sobrevivir a la pasteurización.

En cuanto a requerimientos nutricionales complejos, necesitan vitaminas pero no tienen problemas en la leche. El sustrato sobre el que se desarrollan es el ácido láctico de la 1ª fermentación. El ácido láctico lo pasan a pirúvico y este pasa a ácido propiónico. El CO₂ formado en el paso succinato--piruvato es el responsable de los agujeros de estos quesos. Las propionibacterias son capaces también de degradar citratos a diacetilo, que da el aroma a estos quesos.

ALTERACIONES EN LOS QUESOS:

Son menos ácidos que el yogur y sí pueden sufrir alteraciones sobre todo en la superficie y también en el interior si penetran. Alteraciones en olor y sabor (amargo u olor afrutado) son debidas a levaduras, así como la rancidez de los quesos (oxidación de ácidos grasos).

También hay alteraciones superficiales en color sobre todo por el desarrollo del hongo. Si es negro es *Aspergillus niger*, si es verdoso-azulado es algún *Penicillium* (*P. glaucum* sobre todo) a veces en fisuras en la corteza aparece color rojo-rosado debido a propionibacterias.

ALTERACIONES MAS GRAVES: estropean el producto como la gasificación (desarrollado por *Enterobacter aerogenes*), lo más grave es la putrefacción por bacterias del género *Clostridium*, además de *Aspergillus*, también aparece a veces *Mucor*.

Para proteger a los quesos se impregnan normalmente en un antifúngico que es la Natamicina. En quesos con cera o PVC la natamicina se incluye ya en estos.

La legislación europea quiere prohibir el PVC y la natamicina pero hacen falta alternativas, en el caso del antibiótico parece que se van a emplear conjuntos de enzimas que hidrolizan la pared de hongos y de recubrimiento sistemas tradicionales como cera de abeja.

Actualmente las cepas comerciales se aíslan de los quesos artesanos.

ELABORACIÓN DE LA MANTEQUILLA:

En la fermentación sólo intervienen las bacterias lácticas como *Lactococcus lactis* y *L. ciemoris* y además se añade *Leuconostoc citrovorum*. Este último deja de crecer al bajar el pH de 4 pero las enzimas que libera dan aroma característico así como el diacetato (del citrato).

TEMA 7

PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADOS Y VEGETALES

LOS EMBUTIDOS: el sustrato sobre el que actúan es la carne (músculo animal) y en 2º lugar la grasa. Apenas hay CH (falta fuente de C aunque en preparados comerciales van azúcares, glúcidos, sales y especias que se añaden a carnes. No hay ningún tratamiento térmico que elimine a microorganismos por lo que hay microbiota abundante y variada.

Una gran parte de los microorganismos son bacterias lácticas que hacen bajar el pH. Las bacterias lácticas (*Periostococcus cerevisiae* y *Lactobacillus*) están a baja [] por lo que antes de que se desarrollen del todo, el producto se estropea, por lo que se usan cultivos comerciales para suplementar así se hace más rápido, más seguro y se mantienen viables más tiempo.

Una característica de los Starters es que se suministran en un soporte de lactosa. Son bacterias homofermentativas y deben tener una viabilidad alta (deben sobrevivir unas 10^6 – 10^7 /g hasta la caducidad del producto, son los encargados de conservarlo). Pero además también se añaden bacterias micrococáceas del género *Staphylococcus* que pueden transformar nitratos en nitritos (mayor coloración el producto)

Otra característica es que son catalasa +, con esa catalasa degradan peróxidos que podrían decolorar esos productos. Además se sabe también que inhiben el desarrollo de *C. botulinum*, también es lipolítico y contribuye al aroma de los productos aunque no es el único. En el caso de embutidos están los microorganismos de superficie que se utilizan para recubrir externamente a los productos y contribuyen a darle buen aspecto al producto y completar la maduración. Uno de los microorganismos más utilizados es *Debaryolices hansenii* (produce lipasas: chorizos y salchichas aromáticas), pero es poco colonizadora (*Aspergillus*, etc que dan mal aspecto al embutido) para evitar esto se ha utilizado en su lugar otro hongo (*Penicillium nalgiovense*) pero da menos aromas, la tendencia actual es utilizar las dos. (estos hongos son de superficie).

COLES PEPINILLOS Y ACEITUNAS:

Son los más usuales fermentados, aunque podría hacerse con cualquiera. Las fermentaciones son espontáneas, no hay starters, se usa la microbiota de los vegetales: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *enterobacterias* (que no deben utilizarse) y en menor proporción bacterias lácticas que sí son útiles. Lo normal es que haya una sucesión en las poblaciones de la fermentación. Los vegetales se ponen en salmuera al 5% como mínimo con lo cual sólo algunas bacterias consiguen crecer y fermentar, y además inhibe a las enzimas pectinasas que hacen ablandar a los vegetales.

En la fermentación hay dos fases:

Inicio: aquí se multiplican todas las bacterias excepto las que no resistan la salmuera, una vez que las lácticas van formando más ácido láctico se va inhibiendo el desarrollo de las demás bacterias (y géneros esporulados). El éxito de esta fase consiste en que las lácticas se desarrollen lo suficiente en esta fase y bajen pH para inhibir a las demás.

Toda la microbiota láctica sigue desarrollándose en la fase primaria, pero deben competir con las levaduras ácido tolerantes (no son buenas). Las bacterias deben acabar todos los azúcares residuales (con esto baja mucho el pH por eso al pcpio se tampona la salmuera un poco con acetato cálcico para que no se inhiban las bacterias) sino las levaduras forman productos no deseables.

Se aíslan 3 tipos de bacterias lácticas: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*. Los 2 primeros son los más sensibles al pH ácido y a la salmuera (si está por encima de 5%, no se desarrollan) por eso es *Lactobacillus* la que finaliza la fermentación, sobre todo *L. plantarum*.

DERIVADOS DE LA SOJA:

De gran interés en Asia hasta 38% prot con todos los aa esenciales, vitamina B12, ácidos grasos insaturados en 18% puede competir con la carne. Muy buena para vegetarianos e intolerantes a la lactosa. El queso de soja es el de más interés, en su preparación primero se tritura la semilla y se macera en agua 12 h, luego se hierve, obteniéndose la leche de soja. Para obtener el queso, se coagula químicamente con sulfato de calcio, dando lugar a una cuajada llamada Tofu, que se puede tomar así o fermentar para producir el queso, entonces la cuajada debe cortarse e inocularse en su superficie con 3 sp de hongos del género *Mucor*, *Actinomucor* o *Rhizopus*, y entonces se mantiene entre 12–24°C (según el hongo) durante una semana, cuando está ya desarrollado el micelio, entonces se lava, se sala y se mezcla con alcohol de arroz y se pone en maduración, en ella proteasas y lipasas hacen lo mismo que en quesos animales, las lipasas dan ácido grasos que se esterifican y dan el aroma característico. El nombre original del queso de soja es Sufu. También con leche de soja se puede obtener yogur.

ENSILADO:

Se realiza con bacterias lácticas en un proceso similar al de las coles pero con el forraje. Curiosamente las bacterias lácticas, en la hierba fresca no aparecen o muy pocas, sin embargo son las responsables de la fermentación. Se cree que provienen de contaminación con utensilios (lo mismo ocurre con *S. cerevisiae* en vino).

Durante las 8–12 primeras horas del forraje se aíslan *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Acrobacterium*, *Enterobacterias* y pocas lácticas. Pero a las 12–24h se hace el ambiente anaerobio (se agota el O₂ por respiración vegetal), se desarrollan entonces sólo anaerobios o facultativos. Hasta el octavo día aún se aíslan las anteriores bacterias (las más resistentes *Enterobacterias*, *E. coli* hasta el 7º día y *Streptococcus* algo más), pero a partir de aquí sólo las lácticas que van acidificando el medio y al final son las únicas que quedan. Las sp de lácticas son las mismas que antes y también es *Lactobacillus* el que suele acabar el proceso (*L. plantarum*).

TEMA 8

BEBIDAS ALCOHÓLICAS

LA CERVEZA:

Se obtiene por fermentación microbiana de la cebada germinada y las especies de levaduras de *Sacharomyces* son las más imp, Antes de nada hay que preparar el sustrato con azúcares para que puedan actuar las *Sacharomyces* (que no tienen amilasas).

Primer paso: germinación de cebada para obtener la malta esto se hace sumergiendo las semillas de cebada en agua, subiendo la Tº desde 13 hasta 15–22°C progresivamente.

La germinación se detiene cuando la radícula es 2/3 de la semilla y se para por calentamiento (esto se

denomina secado o tostado) en esta fase se usan al pcpio T° bajas, luego intermedias pero al final hasta 80–90°C cuanto más T° el color de la cerveza será más oscuro.

A continuación la malta tostada se muele y se mezcla de nuevo con agua caliente (se activan amilasas y proteasas; hidrolizan proteínas y almidón) la Tª y también es ahora importante y de ella depende el tipo de cerveza. Si la Tª está entre 69–79°C actúan sobre todo las –amilasas rompiendo los –1–4 en cualquier punto de la molécula obteniendo glucosa (asimilable por levaduras), maltosa (también utilizada, estas dos las hay en poca cantidad) y sobre todo oligosacáridos denomina dextrinas no utilizables por levaduras del *gro* *Sacharomyces*, estos mostos dan cervezas pesadas de poca graduación alcohólica y muchas dextrinas.

Pero si se mezcla con agua a 50–55°C los enzimas que actúan sobre el almidón son sobre todo las –amilasas y el producto final es siempre la maltosa entonces estos mostos dan cervezas ligeras de mayor graduación alcohólica. También hay cervezas intermedias.

A continuación la Tª se baja a 40°C y en esta fase actúan proteasas que liberan péptidos y aa que son la fuente de N de las levaduras. Ahora por centrifugación y filtración se separa la parte acuosa del residuo de cebada y esta parte acuosa se mezcla con el lúpulo responsable del sabor amargo cuanto más se añada más amargo y además es antiséptico.

En estas condiciones se hierve 4 horas también esto es bactericida y además precipitan parte de las proteínas que enturbian y así el producto es más claro. Entonces después el mosto está listo para ser fermentado y esta fermentación se puede hacer con dos levaduras:

*** levaduras de fermentación alta (14–23°C):** inglesas se distribuyen homogéneamente por el mosto el microorganismo es *S. cerevisiae*.

*** levaduras de fermentación baja (6–12°C)** mayoría de alemanas y holandesas, son las que floculan y se van al fondo el microorganismo es *S. uvarum* (también denominado *S. carlsbergiensis* considerado una variedad de *S.c*)

La fase primaria es la de fermentación y en ella la glucosa pasa a etanol por glucólisis y los períodos de fermentación varían según la sp, para *S.cerevisiae* 5–7 días y *S. uvarum* 8–15 días.

Al cabo de este tiempo las de f. baja se recogen y se reutilizan 6–10 veces como inóculos para nuevos procesos. Una vez finalizada la ferm se produce el envejecimiento del producto a baja Tª en barriles almacenados, para *S.uvarum* –1 a 4 °C y para *S.c.* 4,8 °C, en este período se desarrollan los alcoholes superiores y ésteres que dan aroma. Después se pasteuriza o filtra y se embotella. A penas hay ningún tipo de alteración.

TEMA 9

PRODUCCIÓN DE VINO

CARACTERÍSTICAS DEL SUSTRATO USADO:

VINO: es el producto obtenido por fermentación microbiana del zumo de uva. Hay vinos elaborados por fermentaciones espontáneas y otros se obtienen añadiendo cultivos iniciadores de levaduras seleccionadas con ambos tipos se obtienen productos de gran calidad. La calidad depende de las características del mosto (uva y madurez) y de las levaduras usadas.

El componente principal del mosto son los hidratos de C constituidos sobre todo por glucosa, fructosa, pectina (de paredes ©). El azúcar del mosto oscila entre 18–20%. También hay ácidos: tartárico, málico y cítrico. Por

eso el mosto tiene pH 3–3,5, los organismos deben poder resistirlos. Cuanto más madura esté la uva, más azúcares y menos ácidos. En el mosto hay también proteínas, aa, aminos, vitaminas y sales minerales.

La primera parte del proceso es obtener el mosto de las uvas por estrujado. En vinos tintos, el mosto fermenta con pieles y rabillos de uvas y en los blancos sólo el zumo de la uva, esto es importante por que en las uvas están los microorganismos, así que los mostos de vino blanco tienen menos carga microbiana. Una práctica frecuente es estrujar la uva en presencia de enzimas pectolíticas que degradan la pectina y así se obtiene más mosto de la uva, además estos mostos dan vinos mucho más fáciles de filtrar porque la pectina obtura los filtros y además estas enzimas tienen otro efecto: originar vinos más aromáticos (los aromas se deben a terpenos de la uva, que se liberan más así).

El siguiente paso es el tratamiento del mosto con bisulfito potásico, añadido como antioxidante y antiséptico.

Ahora el mosto se puede dejar fermentar espontáneamente o hacer fermentaciones dirigidas.

FERMENTACIONES ESPONTÁNEAS: Los microorganismos del mosto tienen dos orígenes, por una parte de la uva y por otra de las bodegas y utensilios de vendimia, transporte, etc.

Cuando se hacen aislamientos de las uvas, antes de que lleguen a la bodega aparecen 2 géneros principales: *Kloeckera* y *Hanseniaspora* que son entre el 50 y 75% de levaduras aisladas de la sup de las uvas. En mucha menor proporción se aíslan otros géneros como *Cándida*, *Pichia*, *Kluiveromyces* y *Hanasenula*.

El género considerado principal responsable de la fermentación del vino es *Sacharomyces*, o bien no se aísla de la uva o bien en muy poca cantidad (50 ufc). Pero tanto en la bodega como en materiales para la elaboración del vino, la especie mayoritaria es *S.cereviciae* y las demás aparecen menos, las proporciones se invierten. Además se sabe que las cepas de *S.c* que colonizan bodegas son las que aparecen luego en la fermentación, hay entre 104–106 ©/ml al inicio de la fermentación y llegan a 108–109 ©/ml al final.

Pero hay un desarrollo secuencial de especies a lo largo de la f. y las cepas que inician la f. suelen ser *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida*, se llaman levaduras apiculadas (por su forma) estas cepas se desarrollan durante los 3–4 primeros días de la fermentación y son las responsables de los 5–6 primeros grados de alcohol obtenido. A medida que pasan días y sube la graduación se mueren la mayoría, se les denomina también levaduras de bajo poder fermentativo lo que pasa es que resisten poco al etanol. Entonces comienza a desarrollarse *S:cereviciae* serán sus © las responsables de consumir el resto del azúcar y acabar la fermentación, por lo que conviene que sean muy tolerantes al etanol, para que acaben todos los azúcares. Cuando esto no es así, a continuación pueden desarrollarse las levaduras perjudiciales entre las que hay algunas cepas que pertenecen al gro *Cándida* y *Pichia* que pueden producir grandes cantidades de ácido acético.

Hay otro tipo de levaduras artificiales que son las levaduras oxidativas como *Sporobolomyces*, *Hiptococcus*, *Rhodotorula*, que oxidan el etanol a acetaldehído dando también vinos de baja calidad.

Las levaduras apiculadas todas producen algo de ácido acético.

Otra razón por la cual no debe quedar azúcar residual es por que en el mosto también se pueden desarrollar muchos tipos de bacterias por un lado las bacterias acéticas y por otro las malolácticas, bacterias lácticas que pasan el ácido málico a láctico (esto no lo hacen las de la leche), pero los géneros son los mismos *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*.

Estas bacterias acéticas si pueden ser perjudiciales al hacer:

etanol–acetaldehído–ácido acético

Si el nº de levaduras presentes inicialmente en mosto es suficientemente alto y las levaduras de la fermentación consumen todos los azúcares para evitar que aparezcan los microorganismos perjudiciales dan vino de gran calidad. Pero puede fallar por varias razones, en años muy lluviosos las uvas pierden carga microbiana y las fermentaciones pueden no arrancar e incluso pudrirse el mosto antes de tiempo.

Otra cuestión es el uso de funguicidas en la viña, que afecta también a las uvas y también puede llegar a ocurrir que las sp perjudiciales sean más resistentes a funguicidas que las otras. Además a veces las sp que aporta la bodega, utensilios, etc son cepas no resistentes al metabisulfito ni al etanol y no ocurre la fermentación.

Si ocurre algo de esto se obtienen vinos de baja calidad. Así que los vinos e fermentaciones espontáneas pueden ser a veces muy buenos y otras veces muy malos, para evitar esto se proponen otras fermentaciones.

FERMENTACIONES DIRIGIDAS:

Una vez que el mosto está sulfitado se añade una sólo cepa de *Sacharomyces* (denominada pie de cuba) que debe ser capaz de iniciar la fermentación, desplazar por competencia a las otras y acabar los azúcares. En estos casos se añade mas metabisulfito para eliminar mejor a las otras (nuestra cepa debe ser resistente a el) además esta cepa debe añadirse a más de 106 ©/ml y así se consigue que esta cepa domine, los vinos obtenidos serían de calidad mas regular (pero siempre iguales).

El problema de estas fermentaciones es que tienden a estandarizar los vinos obtenidos. De todas formas la tendencia actual es no usar cepas comerciales, sino aislar el máximo nº posible de levaduras dentro de cada comarca vinícola. Estas levaduras se denominan Levaduras ecotípicas.

LAS CARACTERÍSTICAS EN BASE A LAS CUALES SE SELECCIONAN ESTAS LEVADURAS SON:

- **VELOCIDAD FERMENTATIVA**, cuanto mayor sea antes coloniza y desplaza a la microbiota autóctona. Una gran variabilidad entre cepas garantiza una colonización rápida
- **TOLERANCIA A METABISULFITO**, importante para poder desarrollarse con las cantidades de ese producto.
- **TOLERANCIA A ETANOL**, deben ser tolerantes a su producto final.
- **CAPACIDAD PARA PRODUCIR TOXINA KILLER**, es una toxina producida por algunas cepas que matan a cepas sensibles de la misma sp, respecto a esto hay: las K⁺, productoras, las K⁻ sensibles y las K⁻ neutras que no la producen pero la resisten. El K⁺ es el más interesante, la toxina la produce el genoma de un virus metido en un genoma. Todas las cepas comerciales lo tienen porque aunque no sean productoras, es un carácter fácil de transferir por la técnica de fusión de protoplastos en la que se elimina la pared © de dos © de *S.c* y luego en presencia de PEG y Ca⁺⁺ se fusionan. Hay una variante de esta técnica que utiliza los mutantes *Kar* de *S.cerevisiae* son mutantes deficientes en cariogamia, incapaces de fusionar sus núcleos, entonces se emplean unas cepas que son K⁺ y llevan una mutación en el gen *Kar1* y si las fusionamos con una levadura vínica, se fusionará membrana, citoplasma, pero no núcleo, el núcleo de la cepa mutante *Kar* degenera y entonces el híbrido lleva núcleo de nuestra cepa seleccionada y en citoplasma los virus productores de toxina. Esta característica por sí sola no garantiza la predominancia de la cepa en el medio, por varias razones: no todas las otras levaduras serán sensibles a la toxina y a veces el pH del mosto-vino no es el óptimo para la toxina que varía entre 4-4,5 mientras que en mostos o mostos-vinos está a 3-3,5 normalmente.
- **CARÁCTER FLOCULANTE**, capacidad que tienen las © de algunas cepas de *S.c* para formar agregados y sedimentar espontáneamente. Esto favorece la filtración porque así las levaduras se retiran y no colmatan los filtros usados luego. Esta característica es debida a una prot de superficie denominada floculina del tipo de las lectinas, que atraviesa la pared de la levadura y se une a un receptor en la © adyacente, este receptor es el manano (residuos de manosa), como receptor competitivo de este manano puede funcionar la glucosa, esto es importante porque las levaduras sólo deben flocular una vez alcanzada la fase estacionaria, sino

podrían irse al fondo sin acabar de fermentar todos los azúcares.

La glucosa puede ser receptor de la floculina, entonces no floculan hasta que se acaba.

En la mayoría de vinos el proceso termina con la fermentación alcohólica por *S.cereviciae*, pero en vinos muy ácidos puede tener lugar una 2ª fermentación llamada f. maloláctica por bacterias de género *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* las especies de estos géneros que hay en vino se diferencian de las de la leche porque hacen:

L-malato---piruvato---L-lactato

Y esto produce una subida del pH y además el ácido producido es más suave al paladar. Pero esto sólo interesa en vinos de pH 3-3,5 y la sufren vinos de uvas que tienen mucho malato o no están maduras. Pero se considera una alteración del vino en aquellos de pH superior a 4 (por tanto filtramos el vino antes de que pueda ocurrir esta fermentación).

- **PRODUCCIÓN DE ENZIMAS**, los 2 más importantes son por un lado las pectinasas y por otro glucosidasas. Las primeras degradan restos de paredes celulares, evitando la posterior obturación al filtrar los vinos. Las pectinas son polímeros de ácido galacturónico unidos entre sí por enlaces -4 glucosídicos, estos polímeros suelen esterificarse con metilos y entonces se llama pectina (sino se llaman pectonas o ácido poligalacturónico), sobre ellos actúan 3 tipos de enzimas:
 - **endopoligalacturonasas**, cortan la cadena en cualquier pto, productos finales: trozos menores de pectina
 - **exopoligalacturonasas**, actúan sólo en extremos liberando monómeros de ácido galacturónico
 - **pectinmetilesterasas** que actúan liberando los grupos metilo, estas enzimas se añaden en mezcla al mosto, son producidas por *Aspergillus*, y se obtienen del sobrenadante de su cultivo.

Estos enzimas pécticas comerciales tienen efecto negativo y es que por acción de las pectinmetilesterasas aumenta mucho el contenido en metanol de los vinos. Entonces si tenemos una cepa que produce estas enzimas ya no hace falta añadir las comerciales. Potencialmente todas las cepas llevan un gen *pgu1* que codifica endopoligalacturonasa pero no en todas se expresa. En las que se expresa el enzima tendrá prácticamente el mismo efecto que los preparados comerciales, y tienen la ventaja de no liberar metanol.

Las otras enzimas de interés son las glucosidasas, que contribuyen a potenciar los aromas del vino. Los aromas del vino dependen de tres componentes pciales:

- Alcoholes superiores: se forman mediante degradación de aa.
- Ésteres: se forman por reacción del etanol o alcoholes superiores con ácidos orgánicos.
- Terpenos: pciales resp de aromas agrutados, pueden encontrarse en dos formas: libres en el mosto (son los que olemos) o bien ligados a un azúcar y en este caso se denominan terpenilglucósidos, nosotros no los percibimos. Las glucosidasas pueden hidrolizar el enlace terpeno-azúcar y así aumentar la cantidad de terpenos libres y por tanto aumentar el aroma.
- **MENOR PRODUCCIÓN POSIBLE DE SH₂**, se forma de aa azufrados y da mal olor al vino, cuanto menos produzca mejor.

Los 4 primeros aseguran el predominio en el mosto y las otras se refieren a la calidad del producto.

Una gran variabilidad entre cepas garantiza una colonización rápida.

VINOS ESPUMOSOS:

Se obtienen mediante una 2ª fermentación alcohólica inducida por la adición de azúcar y levadura en la que se forma el CO₂ que les da el gas.

El sustrato es vino tras la 1ª f. (en gral se usan una mezcla de vinos). Las pcpsales dificultades que se encontraran las levaduras será la ya alta graduación alcohólica del vino y que la fermentación se hace a baja Tª para no perder aroma.

El inóculo se prepara acondicionándolo a estas Tª esto lleva dos semanas, la cepa usada es *S. cereviciae*, pero una variedad denominada *ellipsoideus* y en una primera parte el inóculo se prepara en mosto diluido con agua y se suplementa con extracto de levadura y sulfato diamónico para aumentar la fuente de N y se le van dando distintos pases al medio, pero suplementado con vino cada vez de mayor graduación alcohólica y a medida que esta se sube se va bajando la Tª en cada paso (entre 3 y 4 pases). Así conseguimos un inóculo capaz de fermentar a % de etanol 10–11–12 y a Tª por debajo de 16°C y este inóculo es el usado para elaborar estos vinos. Hay 2 tecnologías para elaborarlos:

- Chapeunoise: para champán y cava
- Granvas: otros espumosos.

CHAMPEUNOISE:

La fermentación se lleva a cabo botella a botella en la cual a c/botella se le añade 20–25g de azúcar y un inóculo de 106 ©/ml y dura entre 4 y 7 semanas la nueva fermentación y el vino obtenido se deja envejecer unos 9 meses. Antes de ponerlo a la venta hay que retirar las levaduras que se usaron para la 2ª f. que debe ser levadura floculante para eso se voltea la botella así las levaduras quedan en el cuello y entonces se congela, se le da la vuelta a la botella, se descorcha y se sacan las levaduras (el hielo sale por la presión del CO2) a este proceso se le denomina Removido y degüelle, el espacio dejado se rellena con vino dulce o seco.

GRANVAS:

La fermentación es en un gran recipiente cerrado a presión, dura unos 20 días y luego se envasa en las botellas.

ALTERACIONES EN EL VINO:

Cuando los vinos se filtran no se producen alteraciones microbianas, pero sí químicas (precipitación de prot y oxidación), así que las que veremos se producen sólo en los no filtrados:

- Fermentación maloláctica: sólo deseable en algunos como ya vimos.
- Transformación en vinagre: hay dos nombres, según si se produce por levaduras o bacterias, en el primer caso se denomina picadura y en el segundo acidificación.
- Dentro de las levaduras que pueden producir esta acidificación están *Candida*, *Mycoderma aceti* y las bacterias suelen ser *Acetobacter*.
- Enfermedad de la grasa: por bacterias lácticas en la superficie del vino se forma una película fina como grasa que en realidad son polisacaridos extracelulares que producen algunas bacterias del género *Streptococcus* y *Leuconostoc*.
- Flores del vino: desarrollo en su superficie de especies del género *Mycoderma* en gral *M.vini*.
- Enfermedad azul: da tono azulado a tintos, se produce por el desarrollo del hongo *Penicilium*.

OTRAS BEBIDAS POR FERMENTACIÓN MICROBIANA:

SIDRA: glucosa, fructosa ----- etanol. Siempre se hace ferm maloláctica.

S. cereviciae

SHERRY, VINOS DE MADEIRA: fermentaciones de mosto pero llevadas a cabo por dos tipos distintos de

cepas de *S. cerevisiae* (algo parecido a cerveza), hay cepas que crecen en la superficie y otras sumergidas pero ambas se desarrollan paralelamente en la fermentación.

SAKE: fermentación del almidón del arroz, también por *S. cerevisiae*, la ferm alcohólica, pero se desarrolla paralelamente a una cepa de *Aspergillus oryzae* que libera amilasas que hidrolizan almidón y glucosa, la cual degrada *S. cerevisiae*. Tiene alta graduación (17–20%) soportada por estas cepas.

TEMA 10

PRODUCCIÓN DE VINAGRE

Vinagre significa vino agrio y antiguamente se usaba para denominar el producto obtenido por oxidación del etanol del vino por las bacterias acéticas. Hoy se le denomina así a cualquier producto que haya sido oxidado por bacterias acéticas aunque el sustrato no sea vino. Para ser vinagre debe tener >6% de ácido acético.

BACTERIAS ACÉTICAS:

Son bacilos Gmóviles (con flagelos que pueden ser peritricos o uno sólo polar). Su principal caract desde el pto de vista bioq. es que pueden oxidar a los alcoholes y cuando es etanol se obtiene ácido acético (es una oxidación aunque se denomina fermentación).

Otra característica es que se desarrolla bien a pH ácido (<5). Son capaces de sintetizar distintos polisacaridos extracel capaces de sint celulosa, aunque no forme parte de su pared sino que sale fuera dispuesta en forma de fibrillas alrededor de toda la © con lo que se forma una sp de red entre bacterias y cuando crecen en medio líquido sin agitación forman un velo en el que quedan incrustados así crecen e superficie esto se cree una estrategia para tener O₂ ya que son ambos estrictos.

Los géneros más usados para el vinagre son *Gluconobacter* y *Acetobacter*.

Sustratos empleados: Casi siempre son vinos de baja calidad o baja graduación alcohólica, cerveza, sidra o alcohol de arroz.

PROCESOS:

Los más antiguos dejaban el vino al aire hasta que se oxidase.

MÉTODO ORLEÁNS

Se puso a punto en el S XVII (1650) : se llenan $\frac{3}{4}$ partes de toneles de madera con el vino y se deja que comience a oxidarse el etanol, hasta que toda la superficie se cubre por el velo de bacterias acéticas y seguidamente se retiran las $\frac{2}{3}$ partes del producto elaborado por la parte inferior del tonel, con precaución de dejar una parte del velo. A continuación se rellena el tanque con más vino y lo que queda del velo es el inóculo. Hoy se sigue usando para los vinagres de gran calidad.

MÉTODO RÁPIDO O DE GOTEO (1732) :

En recipientes de madera pero rellenos con trocitos de madera de haya (virutas) que serán las superficies a las que se fijarán las bacterias acéticas. En este sistema el vino se echa por la superficie y pasa lentamente a través de las virutas de haya en las que se van fijando bacterias y van oxidando el etanol. El producto se recoge en un recipiente inferior en el que va goteando. Pero hay un bombeo de nuevo hacia la parte superior porque con una sola vez que baje el vino no llega, se hace 3 o 4 veces. Hoy en día se sigue utilizando en el 80–90 % de industrias. Oxidan el 80% de etanol, el resto se evapora.

CULTIVO POE INMERSIÓN:

Usa un fermentador que funciona de forma continua pero en él el aire entra por arriba y tiene un motor abajo que controla la aireación. El producto se obtiene bien si hay buena oxigenación continuamente. Muy imp para que funcione en continuo es dejar siempre una peq cantidad de etanol y de ácido acético dentro del fermentador para que no se pare el proceso.

El medio inicial debe tener un 7–10% ácido acético y 5% de etanol. Se inocula *Acetobacter* y se sigue la [] de etanol y cuando esta baja hasta 0,3–0,05% se retira del fermentador entre un 50 y 60% del producto elaborado y el fermentador se rellena a continuación con una solución con 0,2 de acético y 10–15% de etanol.

Las cepas utilizadas son las silvestres y nunca se emplean cultivos iniciadores porque se ha comprobado que las cepas de *Acetobacter* y *Gluconobacter* si se cultivan en lab pierden mucho su capacidad de oxidar el etanol.

Desde el pto de vista industrial, las cepas de *Gluconobacter* son más interesantes que *Acetobacter* porque las *Gluconobacter* hacen el paso ETANOL– ÁCIDO ACÉTICO y las otras si se acaba el etanol hacen el paso ÁCIDO ACÉTICO–CO₂, porque el etanol inhibe enzimas de ese paso.

Cuando se trata de vino, cerveza o sidra no tienen que ser suplementados esos medios, crecen bien en ellos, pero en alcohol de arroz se suplementa con fuentes de N como extracto de levadura y NH₂SO₄ (sulfato amónico).

TEMA 11

SCP (BIOMASA MICROBIANA QUE SE USA COMO ALIMENTO)

Término acuñado en 1966, se usa para referenciar a la masa microbiana utilizada como alimento. Siempre hay que recuperar © microbianas, se suministra como SCP las © enteras aunque con frec. se suministran rotas (se libera más proteína) A veces se suministra proteínas parcialmente purificadas SCP como suplemento de:

- Proteínas
- Vitaminas
- Lípidos (a veces se almacenan lípidos en los microorganismos)
- –caroteno, en microorganismos coloreados.

A la hora de optimizar este método hay que optimizar dos parámetros en los SCP que son:

- Biomasa (peso seco)
- Proteína (proteína/biomasa)

Para optimizar la biomasa para un det sustrato hay que combinar la prueba de distintos microorganismos para ese sustrato, y con diferentes condiciones de T^a y pH.

Después hay que optimizar la proteína y se seleccionan aquellas cepas que aporten más proteína/biomasa.

Los microorganismos pueden competir como aporte de prot frente a la carne, pescado, soja, pero el inconveniente es que contienen muchos ácido nucleicos que suben mucho el nivel de ácido úrico en sangre, por lo que pueden ser dañinos así la cantidad de ácido nucleicos también hay que controlarla.

Por ejemplo, las bacterias aportan siempre 10–16% de ácido nucleicos por gramo de peso seco, las levaduras 6–10%, los hongos filamentosos 2,5–6% y las microalgas entre un 4–6%.

También se podrían hidrolizar los ácido nucleicos pero esto encarecería mucho el proceso.

Para usar un microorganismo como SCP también hay que tener en cta que pueden haber microorganismos que produzcan sustancias tóxicas como los LPS de bacterias o las aflatoxinas (cancerígenos) de hongos filamentosos.

Las sust tóxicas pueden llegar a las SCP provenientes no sólo de los microorganismos sino también de los sustratos usados para hacer crecer a esos microorganismos.

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA PRODUCIR SCP:

Alcanos

Metano (metanol)

Sustancias ricas en azúcares(melazas, almidón, celulosa)

PRODUCCIÓN DE SCP A PARTIR DE ALCANOS DE CADENA LARGA:

Muchos microorganismos pueden usarlos como fuente de C, pero los más usados son los hongos del orden *Mucorales* y *Monidiales*, y las levaduras (*Candida tropicalis* la más usada y *Sacharomycopsis*).

Estos alcanos que suelen usarse en medios acuosos con fuente de N, no se mezclan con el medio, pero una vez inoculados los microorganismos se fijan a las gotas grandes de alcanos y las transforman en gotitas más pequeñas, los emulsionan.

La característica principal de los microorganismos que degradan los alcanos es:

alcohol DH aldehído DH –oxidación

alcano-----alcohol----- aldehído-----ácido----acetil CoA ciclo de Krebs

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CHO}$

Como fuente de N suele usarse amonio, incluso gaseoso. El principal de todos estos procesos a escala industrial es el llevado a cabo por *Candida tropicalis* usando como sustrato gasoil (10–20% de alcanos) pero el más rentable es el que usa alcanos separados del petróleo con filtros moleculares: De esta forma se producen 16000 T/año de *C. tropicalis* sobre todo usada para piensos.

PRODUCCIÓN A PARTIR DE METANO:

El metano es un excedente por lo que el proceso es más rentable. Los microorganismos a usar deben ser capaces de usar metano como fuente de C son los metanotrofos o metilotrofos (también pueden usar metanol) y hay 2 grandes grupos:

- Obligados o estrictos, sólo usan el metano o metanol como fuente de C son *Melyomonas* y *Melyococcus*.
- Facultativos: pueden utilizar también otras fuentes de C, el más importante entre los SCP es *Pseudomonas*.

Todos pueden transformar metano en metanol, por la metano oxidasa. Lo que ocurre es que es más fácil transportar a las industrias el metanol, mejor que el metano (gas) por lo que se hace Metano–metanol químicamente porque es barato y compensa.

Estos microorganismos hacen:

metanol DH formaldehído DH formato DH

Metanol-----formaldehído-----formato-----CO₂

CH₃OH (enzima inducible) HCHO HCOOH

La fuente de N en los medios suele ser amonio gaseoso.

Aquí el proceso más rentable es el que lleva a cabo *Pseudomonas metilotrofus*, su destino principal es también para piensos.

SCP A PARTIR DE SUSTANCIAS RICAS EN AZÚCARES:

Las melazas de caña y remolacha son el sustrato para obtener SCP basada en *S. cerevisiae* y basada también en *Fusarium graminearum* que se usa para alimentos humanos también, y *S. cerevisiae* para otros procesos como elaboración de cerveza, vino, pan. Ambos microorganismos pueden utilizar almidón previamente hidrolizado. *F. graminearum* crece bien en cualquiera de estos sustratos y si se sube la Tª al final del proceso a 62°C se inactivan proteasas (que así no degradan las proteínas que es lo interesante) y se activan RNAsas que dejan el contenido en ácidos nucleicos en menos de 1% por lo que es más interesante para consumo humano y no sólo se usa como aditivo sino también hay productos basados sólo en el micelio del hongo.

La utilización de la celulosa está aún en investigación y aún no están optimizados industrialmente, los microorganismos utilizados son *Cellulomonas* y *Trichoderma*

Desde hace algunos años se empiezan a usar también microalgas como productores de SCP, su producción es muy económica (crecen en medios basados sólo en sales) tienen proteína con todos los aa esenciales y aportan pocos ácidos nucleicos. Hoy en día los más usados son *Chlorella* (suplemento de dietas de aves de corral y en este caso suplementa también -caroteno (color de la yema del huevo) y *Scenedesmus* (piensos para ganado porcino).

Para alimentación humana se comercializa *Spirulina* en pastillas como suplemento de vitaminas y proteínas.

En acuicultura tienen interés *Dunaliella* y *Tetrasulmis* que se usan para alimentar moluscos y crustáceos.

TEMA 12

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS MICROBIANAS.

ENZIMAS DE INTERÉS:

En cuanto a cantidad, amilasas y proteasas son las más requeridas, pero las que se usan en clínica son las más caras.

AMILASAS: hidrolizan almidón, una de sus aplicaciones en alimentación es la obtención de edulcorantes (jarabe de lactosa o de glucosa y a veces fructosa por isomerización del anterior).

Otra industria en la que tienen interés es la textil porque el almidón se usa para proteger tejidos pero una vez elaborada la pieza debe eliminarse y para esto se sumerge en amilasas.

También se usan para suplementar masas panaderas.

Con respecto a la síntesis de estas enzimas son todos extracelulares lo que resulta ventajoso, son metabolitos secundarios típicos, no se producen en fase exponencial hasta el final y luego en fase estacionaria. La síntesis de amilasas se inhibe por glucosa en el medio (represión catabólica), son enzimas inducibles y se induce por moléculas de degradación del almidón producidas por una pequeña cantidad de estas enzimas que está siempre presente.

Las cepas que nos interesan son mutantes constitutivos y mutantes que no estén sometidos a represión catabólica.

Las amilasas industriales producidas son α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas.

Las α -amilasas hidrolizan los α -4 de cualquier pto del polímero generándose algo de glucosa y maltosa y sobre todo los oligosacáridos llamados dextrinas. Estas enzimas se pueden obtener de bacterias u hongos, las bacterias más usadas son *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*) y entre hongos *Aspergillus* (*A. niger* y *A. oryzae*). El proceso con *Bacillus* es más caro. La fuente de C usada es el almidón, que ya actúa como inductor.

Bacillus Aspergillus

5% almidón 8% almidón

peptona extracto de malta

extracto de levadura

27–30°C 27–30°C

Estas temperaturas requeridas son demasiado bajas para las condiciones de fermentadores industriales que entonces requieren métodos de refrigeración y entonces se buscan microorganismos que funcionen a más temperatura como *Thermomonospora* a más de 50°C, pero no funciona a pH menor de 7.

Las β -amilasas de microorganismos tienen poco interés lo más fácil es obtenerlas purificándolas de plantas que las producen en cantidad. Pero de microorganismos también se obtienen por ej *Bacillus* y *Streptomyces* y funcionan a mayor Tª que las de plantas.

Las glucoamilasas cortan la glucosa terminal del almidón (producto final: glucosa) se producen industrialmente de hongos: *Aspergillus*, *Rhizopus*. El almidón o, mejor, sus productos son inductores y también hay represión. Con *Aspergillus* se producen estas y las α a la vez lo cual es perjudicial si se requieren separados.

OBTENCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA:

Es su aplicación principal, el proceso se denomina licuefacción y sacarificación del almidón. Se usa en caramelos, bollería, conservas, dulces. En la primera fase, el almidón a partir de soluciones acuosas al 40% se transforma en una pasta, para ello estas soluciones se calientan a 65–90°C y se obtiene la pasta. Después se hace la hidrólisis:

* Química. pH 1,8–2 a 120–140°C

* Enzimática: α -amilasas, da mejor resultado.

Si las α -amilasas son de *Bacillus*, la hidrólisis se hace a 100°C y si son fúngicas a 55°C.

El proceso se deja transcurrir hasta que el almidón se haya transformado en maltosa y maltotriosa (a esto se le llama licuefacción del almidón). Ahora a esta mezcla se le añade las glucoamilasas, que hidrolizan los anteriores compuestos hasta glucosa, se hace a 55–60 °C y a esta 2ª parte se le denomina sacarificación del almidón y el producto (jarabe de glucosa) se obtiene cuando ya se hidroliza el 80% del almidón. Este producto puede usarse así o pasarlo a fructosa o jarabe de fructosa. Cuando se hace así, se puede hacer químicamente , pero entonces da productos como psicosa (no metabolizable por humanos) y no permitido por tanto este proceso en alimentos humanos, en procesos para humanos se utiliza la glucosa isomerasa. La fructosa es el doble de edulcorante que la glucosa.

La glucosa isomerasa se obtiene de *Bacillus* y *Streptomyces*, sin embargo el enzima que producen en realidad es la xilosa isomerasa (aunque también hacen el paso glucosafructosa) que lleva a un problema a los procesos industriales y es que al ser inducible, necesita xilosa como inductor, que es cara, entonces, en su lugar se usan xilano (polímeros de xilosa) más baratos y que funcionan.

También hay represión catabólica por glucosa. Para *Streptomyces* hay mutantes que no requieren inductor.

PECTINASAS:

Se añadían a la uva para obtener más mosto y filtrar mejor. Pero además de esto se usa para elaborar todos los zumos de frutas y verduras con la misma finalidad (eliminar pectina de paredes) y también se usan para macerar vegetales que van a ser sometidos a algún proceso de conservación. También tienen interés para extraer aceite de las aceitunas.

La pectina se forma de monómeros de ácido. galacturónico unidos por 1–4. Los enzimas que degradan son de dos tipos:

Depolimerizantes: Endopoligalacturonasas (actúan en el interior)

Exopoligalacturonasas (actúan en los extremos)

Esterasas: Pectinmetilesterasas (quitan los metilos que esterifican al polímero).

Estas enzimas se obtienen sobre todo del hongo *Aspergillus* y también de una bacteria patógena de plantas denominada *Erwinia carotovora* . La obtención es complicada, porque hay que usar de fuente de C sacarosa al 2% (cualquier otro azúcar inhibe la producción) y pectina al 2% como inductor.

L- ASPARAGINASA:

Enzima producido exclusivamente para industria farmacéutica (tratamiento de cáncer, leucemia, linfomas) porque las © tumorales requieren mucha L-asparagina. Este enzima lo producen *E. coli* , *Serratia*, *Erwinia* (algunas cepas). A nivel industrial se usa *E. coli* que crece mas rápido y hay mutantes superproductores. El problema del proceso es que el enzima es intracelular y al final hay que lisar las bacterias.

En gral el encarecimiento de procesos para obtener enzimas para industria farmacéutica se debe a que al final hay que realizar procesos de purificación del enzima, mientras que en la industria alimentaria se usan sobrenadantes, etc, menos purificados.

LIPASAS Y LACTASAS:

Las lipasas son sobre todo para industria farmacéutica como suplemento de lipasas pancreáticas y en la industria alimentaria, cuando cultivos iniciadores de industrias lácteas no tienen suficiente actividad lipolytica, se añaden estos enzimas. Se usan sobre todo hongos de *Aspergillus* y también *Candida*. El proceso es sencillo,

se puede usar cualquier medio ya visto para *Aspergillus* pero hay que añadir alguna grasa o aceite a baja concentración porque el enzima es inducible.

El glicerol inhibe producción de enzima así que hay que evitar que se forme en el medio.

LACTASAS O –GALACTOSIDASAS:

Hidrolizan lactosa en glucosa y galactosa y se produce en industria farmacéutica para intolerantes a lactosa. En menor medida es usado en industria láctea para fabricar leche con bajo contenido en lactosa. Se utiliza también *Aspergillus*, en el que estas enzimas son extracelulares. Hay que poner un poco de lactosa en el medio, porque es un enzima inducible.

PENICILINA ACILASA:

Enzimas que emplea la industria farmacéutica para fabricar las penicilinas semisintéticas (las cuales tienen una parte sintetizada de forma química y la otra biológica) La penicilina natural es la penicilina G, con anillo –lactámico y otro anillo tiazolidínico, el cjo de la molécula es el ácido 6–aminopenicilínico (6–APA) común en todas la penicilinas y las molécula delas distintas penicilinas se diferencian entre sí en el radical que lleva, que en el caso de la penicilina G es el ácido fenilacético.

Las penicilinas semisintéticas se producen eliminando este radical (ácido fenilacético) y sustituyéndolo por otros que le dan nuevas propiedades (mayor espectro, resistencia a ácido).

Una de las formas de obtener 6–APA es haciendo crecer *P. crisógenum* en medio sin ácido fenilacético, este microorganismo libera el 6–APA al medio. Pero este proceso es muy caro, el 6–APA se produce en baja cantidad entonces la industria farmaceutica produce penicilina G con *P. Crysogenum* y se separa con las penicilina acetilasas el ácido fenilacético y entonces se le añade otros radicales.

Para producir penicilina acetilasas se utiliza una cepa de *E. coli* y el medio de crecimiento lleva como fuente de N el líquido de maceración de maíz, como fuente de C, glucosa, pero el enzima se reprime catabólicamente por glucosa, entonces, al principio no se añade toda la glucosa necesaria para la fermentación , sino que se va añadiendo poco a poco, sin que se acumule en el medio y así no se reprime.

El ácido fenilacético es necesario para inducir estas enzimas y este inductor no se añade hasta que haya bastante crecimiento y se añade en solución esteril al 0,1 %.

El proceso dura de 13 a 15 horas.

CEFALOSPORINA ACILASAS:

Se emplean para producir cefalosporinas semisintéticas. *Cephalosporium acremonium* forma la penicilina C, formada por el ácido 7 aminocefalosporámico (7–ACA) y a este núcleo se le añaden distintos radicales para obtener las diferentes moléculas de cefalosporinas, que en el caso de la C, es el ácido L– –aminoadípico, la cefalosporina acilasas rompen el enlace entre ambos y luego se añaden otros radicales. La cepa utilizada es de *Pseudomonas* y el inductor el L– –aminoaditico.

PROTEASAS:

Se producen sobre todo con dos fines, por una parte, para la industria de los detergentes y por otra para la industria láctea, se clasifican en función de su pH óptimo, así, están las proteasas neutras con pH 7, que no tienen gran interés desde el pto de vista aplicado. Las proteasas alcalinas (superior a 7), se emplean como componentes de detergentes. Las proteasas ácidas (pH < 7) las emplea la industria láctea.

Las proteasas alcalinas, usadas ya desde mediados de los 70, al principio no funcionaban bien, no estaban bien seleccionadas y además al añadirse liofilizadas producían alergias. Hoy en día este problema no ocurre por que se encapsulan en PEG y así no causan alergias.

Características que debe tener una proteasa para añadirse a un detergente:

- Inespecíficas y muy activas
- T^a óptima elevada (65–70 °C)
- Alcalinas (pH 8–11)
- Ejercer su acción en presencia de agentes quelantes (EDTA), sin necesidad de iones metálicos
- Deben poder ejercer su acción en presencia de oxidantes como hipocloritos y perboratos (blanqueantes)

Algunas cepas de esporulados como *Bacillus* producen estas proteasas al principio y durante la esporulación (malas condiciones), la primera cepa hallada fue de *B. subtilis*, por eso se llaman subtilisinas a estas proteasas añadidas a detergentes. Hoy en día la cepa usada es *bacillus liqueniformis*, que produce una proteína poco específica y con T^a óptima a 65°C y pH 9.

El inconveniente es que la proteasa se oxida a alta temperatura porque los perboratos del detergente a alta temperatura (>60°C) se oxidan y liberan H₂O₂, que oxida uno de los aa del enzima met.222, en centro activo y pierde 15% de actividad. Esto se soluciona con un mutante que pierde este aa (met) lo malo es que esta proteasa tiene 40% menos de actividad.

Las proteasas acidas, producidas por hongos para industria lactea, tienen el mismo mecanismo de acción que la Quimosina o Renina. El interés por estas proteasas surgió cuando ya no se obtenia suficiente quimosina a partir de terneros lechales porque se sacrificaban pocos. Estas proteasas tienen acción similar a quimosina y deben tener las siguientes características:

- Cuajada con la misma consistencia
- No producir exceso de proteolisis
- No puede ser tóxico ni dar mal olor.

Se han seleccionado 3 hongos que producen proteasas similares a la Renina, *Mucor pusillus*, *Mucor mihei* (este casi no se utiliza porque además de la renina produce muchas proteasas y lipasas y habría que purificarla. Se prefieren las otras especies) y *Endotia parasítica*.

Las reninas de estos microorganismos tienen el inconveniente de que son muy estables, duran mucho y degradan demasiado la cuajada.

Hoy en día la quimosina animal se produce también recombinante y se clona en *E. coli*, *Pickia pastoris* (levadura), *Trichoderma resei* (hongo). En *E coli* no compensa porque aunque la produce, no la excreta, la acumula en cuerpos de inclusión y es muy caro sacarla de ahí. En los otros dos microorganismos al ser eucariotas, la liberan al medio, la primera produce 1 g/L (medio de cultivo) y *T.resei* hasta 20 g/L, pero *P.pastoris* se usa mucho porque es metilitrofo (medio barato).

–GALACTOSIDASA:

lactosa ----- glucosa+galactosa

La lactosa actúa como inductor para los microorganismos, si no hay lactosa, no se produce. Además, en presencia de lactosa también se produce lactósido permeasa.

En el operón lactosa hay genes estructurales (que codifican β -galactosidasa y lactósido permeasa) y además hay otro gen, el I que codifica una proteína represora, a continuación del gen I hay una región que se llama región operadora y al lado del operador está el promotor. La proteína represora se une al operador e impide la transcripción de genes estructurales. Cuando hay lactosa en el medio, esta se une al represor y lo inactiva de manera que no pueda fijarse a esta región operadora.

Las cepas que nos interesan son mutantes en el gen I, que dan represor no funcional o también mutantes en la región operadora para que no se una, estos mutantes se llaman <<constitutivos>> porque sintetizan el enzima esté o no el medio.

MECANISMO DE REPRESIÓN POR PRODUCTO FINAL:

El modelo se basa en la existencia de un gen inductor que codifica una proteína represora, pero en este caso, el represor es inactivo, entonces con este inactivo, se sintetizan los genes estructurales y el enzima ejerce su acción y forma un producto al cual se llama <<correpresor>> y puede unirse al represor activándolo en este caso.

Una vez activado el represor, se une a la región operadora e impide la transcripción de los genes estructurales.

Con este sistema las cepas que nos interesan para producir el enzima son las que mutan en la región operadora, así, el complejo represor–correpresor no se une a ella.

MECANISMOS DE REPRESIÓN CATABÓLICA:

Más complejo, difícil tener mutantes, los organismos que producen β -galactosidasa, mientras haya glucosa en el medio, no la producen.

La glucosa actúa por mecanismo complejo, aún no conocido, mediado por AMPc, esto se sabe porque en un medio con glucosa, baja la concentración de AMPc y si empleamos glucosa y AMPc en el medio, desaparece la represión por catabolito.

Mecanismo:

- supongamos primero que solo hay lactosa el represor se une a la lactosa y es inactivo.
- lactosa+glucosa la glucosa inhibe la adenilato ciclasa entonces el AMPc disminuye

La proteína CRP receptora de AMPc se une al AMPc formando un complejo que se fija en el operón al promotor y este complejo es imprescindible que esté en el promotor para que se una RNA pol y se transcriban los genes.

Entonces en el caso b) el AMPc no se une a la CRP, y el complejo no se puede unir al promotor y no hay transcripción.

En este caso, como ya dijimos, es mejor añadir glucosa poco a poco para que no se acumule otra opción es sustituir glucosa por otra fuente de C que no reprima.

Todo lo anterior se hace por que es mas complicado recurrir a mutantes. (Otra alternativa mas cara es suplementar con AMPc)

Para conseguir cepas superproductoras se clonó el gen que codifica la enzima y se expresa en los microorganismos, ejemplo con la penicilina acilasa en *E.coli*:

Este gen se clonó en un plásmido (bajo el control de un promotor constitutivo muy fuerte) que se introdujo en *E.coli* y como es un vector multicopia se aumenta el número de copias del plásmido, así se consiguió una cepa que produce 20 veces más que la silvestre (en este caso también se consiguió una cepa mutante que también producía la misma cantidad).

TEMA 13

PRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS

INTERÉS INDUSTRIAL DE LOS AA:

Se usan principalmente como potenciadores del sabor, sobre todo el ácido glutámico.

También se usan como suplemento de piensos y dietas.

En medicina tienen interés porque forman parte de sueros y otras cosas.

Se usan como edulcorantes (aspartamo obtenido de Phe y Asp) .

Para la industria química, para la obtención de fibras de polialanina.

Se pueden producir por microorganismos, hidrólisis de proteínas o síntesis química.

Si nos interesa un solo aa, hay que purificar la mezcla de hidrólisis y es costosa. La producción química tiene el inconveniente de que se mezclan dos isómeros, la forma D y la L.

La producción de aa por cepas de microorganismos es complicada por los mecanismos de regulación, cuando se intentó utilizar cepas de *E.coli*, primero se estudió su regulación, por ejemplo, la síntesis de Pro está inhibida por la propia Pro en el primer enzima de la ruta. Este enzima es alostérico y se regula por una sustancia distinta a su sustrato. Todas estas enzimas tienen una región catalítica para unirse al sustrato y otra reguladora que inhibe su función (retroinhibición).

Es difícil obtener mutantes de este tipo de regulación, porque la mutación debe afectar sólo a la región reguladora (algunos se han obtenido).

Investigando otros aa, se vio que hay mas mecanismos de regulación: regulación mediante represión (en aa Arg), en este caso, los genes que codifican los enzimas están agrupados en un operón y para controlar la síntesis de estos enzimas las cepas de *E.coli* producen también un represor que es por sí mismo inactivo, hasta que se produce mucha Arg y esta se une al represor y lo activa, el represor activo se une al promotor impidiendo la acción de la RNA polimerasa.

Muchas veces un mismo aa está sometido a ambos tipos de regulación. Ante una situación de este tipo se planteó otra estrategia que es obtener otro intermediario de la ruta que no sea el aa y sea posible transformarlo en aa de manera fácil por un procedimiento químico. Esto se basa en la obtención de mutantes auxótrofos que no producen un aa determinado que ha de añadirse al medio para que crezcan, entonces hay que obtener auxótrofos que a ser posible tengan mutado el último paso de la ruta, así será fácil transformar este producto en el aa deseado.

OBTENCIÓN DE MUTANTES AUXÓTROFOS:

Se pueden obtener y seleccionar en presencia de penicilina porque en su presencia, los auxótrofos tienen ventajas.

Imaginemos que queremos obtener un auxótrofo para la Arg. Entonces lo cultivamos con fuente de C, N y con un mutágeno. Tras la acción de este, en el cultivo habrá cepas silvestres y cepas mutantes auxótrofas para Arg. Ahora debemos sembrar este cultivo en medio con la misma fuente de C, N y con Arg, para recuperar viabilidad. Luego este cultivo se inocula en medio como el de antes pero sin Arg y con penicilina, q matará a las cel q crecen (al sintetizar nuevo peptidoglucano), pero no afectará a las cel q no se dividen (son los auxótrofos para Arg). Si a partir de este cultivo sembramos en placa sin penicilina y con Arg, las colonias q crezcan serán mutantes auxótrofas para Arg.

CÓMO SE PUEDEN SELECCIONAR LOS MUTANTES DE LOS ÚLTIMOS PASOS:

L–ornitina L–citrulina L–Arg

Nos interesan mutantes afectados en este penúltimo o último paso. Para esto hacemos crecer a estos en medios suplementados con los precursores de la ruta, p. ej. medio con:

Fuente de C + fuente de N inorg.+ Arg (control +)

Fuente de C + fuente de N inorg.+ ornitina

Fuente de C + fuente de N inorg.+ citrulina

Un mutante en ornitina citrulina tendrá un perfil así: +

–

+

Un mutante en citrulina Arg tendrá un perfil: +

–

–

Desde el punto de vista de la producción industrial tienen un inconveniente, y es q deben crecer en presencia de aa para el q sean auxótrofos, pero este aa no se puede añadir al principio del proceso en gran cantidad, si no, inhibe. Así q debe añadirse poco a poco.

Tb se pueden obtener cepas mutantes desreguladas, pudiendo haber 2 casos:

– **AA producidos por rutas no ramificadas:** Glu Pro.

E. coli tenía sus rutas muy reguladas (vive en intestino, con mucha [aa] y demás), entonces se buscaron en medios pobres (suelo) microorg con esta ruta menos regulada. Se encontró a una tal *Serratia marcescens*, cuya única regulación es la retroinhibición, con lo q es fácil buscar mutantes buscando cepas resistentes a análogos tóxicos del producto final. Entonces lo q se hace es mutagenizar el cultivo para encontrar una cepa q crezca con el análogo tóxico. Las cepas resistentes al análogo tóxico tienen el enzima encargado de la regulación mutado en su centro alostérico.

– **AA producidos mediante rutas ramificadas:** aa derivados de Asp. Son Met, The y Lys, y estos 3 aa son los inhibidores de la aspartato quinasa (1ª enz de la ruta), así q su regulación es por retroinhibición.

E. coli tiene 3 isoenz de la aspartato quinasa, cada una inhibida por cada uno de los aa. Así sería difícil

obtener mutantes, así q se han buscado (tb en suelo) otros microorg. Se utilizan *Brevibacterium* y *Corynebacterium*, y se usan para producir Lys. Para la producción de Glu se usa *Corynebacterium glutamicum*, en el q el Glu se produce a partir del alfa-cetoglutarato del TAC, y esta cepa tiene la enz q cataliza Isocitrato alfa-cetoglutarato muy activa, y en cambio, la alfa-cetoglut. DH (q pasa el anterior a succinato) es muy poco activa. Así se acumula mucho alfa cetoglutarato, q es transformado x la glutamato DH a Glu. El producto final ejerce retroinhibición, pero no es un problema siempre q la cepa pueda excretar el producto y no se acumule. Que lo pueda excretar o no depende de la [biotina]. Si esta es baja producen poco Glu pero lo excretan de manera eficiente, pero si [biotina] es alta crecen bien pero mantienen el aa intracelularmente. Esto ocurre xq la biotina es un coenz esencial en la síntesis de ác grasos, y cuando aumenta su [] aumenta mucho [ác oleico], apareciendo muchos fosfolípidos de mb, con lo q no pueden excretar el Glu. Entonces debe añadirse al medio algún compuesto q permeabilice la mb, y se ha comprobado q con penicilina funciona.

C. glutamicum usa cualquier azúcar como fuente de C, pero lo + frecuente es usar azúcares no refinados (melazas de remolacha o de caña), ya que tienen suficiente biotina. Como fuente de N: sulfato de amonio, urea (porque producen ureasa).

El rendimiento es alto: 100–95 g/L

(con glucosa) (con melazas)

El otro aa que se produce industrialmente sólo con microorg es la **Lys**, sobre todo para suplementar piensos y dietas elaboradas con semillas vegetales deficientes en este aa. Como antes, en *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, la regulación es + sencilla. Producen una Asp quinasa q para ser inhibida por completo necesita la presencia de los 3 aa, si sólo hay uno, sólo se reduce su actividad un 10–20%, con 2 un 90%. Lo q se ha conseguido son mutantes resistentes a análogos tóxicos de la Lys. Tb se han buscado cepas auxotrofas para Met y The. Tb se usan melazas y sales de amonio y urea.

TEMA

VITAMINAS

Pocas veces se usan para esto, en general las vitaminas se producen químicamente.

Las que se suelen usar de microorganismos son:

Tiamina

Riboflavina

Ácido fólico

Ácido pantoténico

Vitamina B 12

Biotina

Provitaminas –caroteno, ergosterol.

Combinación química/microorganismo :

ácido ascórbico

tocoferol

Las mas importantes obtenidas por fermentación:

Cianocobalamina (B 12)

Riboflavina

Ácido ascórbico

VITAMINA B 12:

Síntesis química muy cara (70 pasos con 70 enzimas) por eso sólo se produce por síntesis microbiana.

Es un anillo tetrapirrólico unido a una base heterocíclica (benzimidazol)y con grupos Co. Hay análogos con la base cambiada, pero no suelen servir.

La B12 se usa en farmacéutica y alimentación animal. Hoy se utilizan piensos vegetales suplementados con B 12, que son mejores. Como fuente de C se usa la glucosa.

Microorganismos que la producen:

- *Propionibacter* (era el más importante)
- *Protaminobacter ruber*
- *Pseudomonas denitrificans*

A partir de los dos últimos (P.r y P.n) se obtuvo un superproductor que produce 135 mg/L.

RIBOFLAVINA:

Vitamina B2, su carencia provoca un tipo de dermatitis. Se puede producir mediante síntesis química (para farmacéutica), por combinación

glucosaD–ribosa, D–ribosa Riboflavina

(*Bacillus pumilus*) o con fermentación directa (bacterias, levaduras, hongos, el más usado es ascomycetes *Ashbya gossypii*, obteniéndose superproducción de 7g/L) como fuente de C glucosa y de N, líquido de maceración del maíz y triptona y aceite de soja y añadiendo lípidos se aumenta mucho la producción. La riboflavina se encuentra en el medio de cultivo y en micelio (del que se para por calor).

Otras cepas que la producen: *Pychia miso* (51 g/L) para su fermentación necesita como fuente de C hexadecanos y fuente de N, líquido de maceración del maíz y urea. Otro microorganismo de interés es *Hansenula polymorfa* que como fuente de C usa metanol.

–CAROTENOS:

Se producen sólo por plantas y microorganismos da:

provitamina AvitaminaA

y se acumula en hígado, su deficiencia genera ceguera y daños en piel y mucosas. Hasta ahora se obtiene siempre químicamente, pero hay algas que los producen con buen resultado: *Dunatiella salina*, *Blakeslea trispona*, son superproductoras

NUCLEÓTIDOS:

Son producidos como potenciadores del sabor, y junto con el glutamato monosódico son los más importantes, si se juntan tienen efecto sinérgico. Los usados como potenciadores son ribonucleótidos de purina porque los desoxirribonucleótidos y los de pirimidina no tienen este efecto.

Los mejores potenciadores son, por este orden:

5' PMG (ácido guanidílico)

5' IMP (ácido inosílico)

5' XMP (ácido Xantílico)

Esto se utiliza en industria alimentaria y en medicina (antibióticos, quimioterápicos y enfermedades de corazón e hígado).

La síntesis parte del 5 fosforribosil pirofosfato que proviene de fosforribosa+ATP.

El primer precursor común a todos es el ác. Inosínico, que dará al ác. Xantílico y este por una GMP sintetasa, al guanidílico.

Por otro lado, puede producir AMP por la adenil succinato sintetasa. Tanto GMP como ac. xantílico pueden ir hacia atrás y formar ác. Inosínico (IMP).

La afinidad de la IMP DH por su sustrato es 10– 30 veces mayor que el de la adenil succinato sintetasa, así que la mayoría de IMP forma GMP.

Los nucleótidos más interesantes (5'PMG y 5'IMP) se pueden producir por dos vías, por una rotura química o enzimática de ác. nucleicos, formando nucleósidos y luego fosforilación química.

La otra vía es por fermentación directa, obteniendo nucleósidos y luego fosforilarlos.

Su obtención por rotura de ác. nucleicos es con *Candida utilis* y *S. cerevisiae*, que tienen mucho RNA.

Para que crezca hace falta glucosa, Zn y fosfato. Un 2º paso es extraer RNA de la levadura seca y se hace con una solución alcalina a 100 °C después el precipitado de RNA añadiendo HCl y etanol. El 3er paso sería la producción de los enzimas para obtener RNA, y para esto se usan estas dos cepas: *Penicilium citricum* y *Streptomyces aureus*, que producen muchos de estos enzimas, y hay que obtenerlos purificados. ahora, con los enzimas, cortamos el RNA. El último paso es aislar y purificar 5'IMP y 5'PMG, por cromatografía de intercambio aniónico.

Dentro de la fermentación directa usamos cepas mutadas, las más usada es *B. Subtilis*. La membrana de los microorganismos no es permeable a nucleótidos, así que se acumulan nucleósidos en el medio que sí pueden secretarlos y luego se fosforilan químicamente.

También podemos producir directamente los 5' nucleótidos por fermentación, utilizando cepas mutadas, que producen AMP y lo secretan y al no acumularlo no se inhibe la ruta. La IMP DH y GMP sintetasa están

atenuadas para que todo el IMP no pase a GMP .

Estas cepas tienen mutada la permeabilidad de membrana a nucleótidos, así obtenemos los 5'IMP directamente. Estas características se consiguieron con *Brevibacterium amoniagenes*, como fuente de C:

glucosa,

fructosa,

fosforribosa,

sacarosa,

hidrolizado de almidón

OTROS PRODUCTOS ORGÁNICOS PRODUCIDOS POR FERMENTACIÓN:

Todos estos productos son utilizados en la industria química como materia prima para producir compuestos sintéticos, como el etanol, que puede fabricarse química o microbianamente.

ETANOL:

en química se puede utilizar como combustible, la materia prima para obtenerlo pueden ser almidón, celulosa, inulina (polímero de fructosa) y suero de leche (cuando sea excedente). Para producirlo se suelen utilizar *S.cereviciae* (el principal), *S.carlsbergiensis*, *Kluyveromyces frágilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Zymomonas mobilis*, *Clostridium*. El etanol debe destilarse a partir del medio líquido, tras la preparación de sustrato y fermentación. Si el sustrato es almidón hay que hidrolizarlo, por que *S.cereviciae* no puede, y se hidroliza o bien químicamente o con cultivo mixto de *S.cereviciae* y *Kluyveromyces*, *Hansenula* y *Candida*, que sí que lo hidrolizan. Lo mismo ocurre con otros sustratos (celulosas etc)

La fermentación ocurre por este proceso, desde glucosa:

Glucosa ----- Piruvato ----- acetaldehído ----- Etanol

Glicólisis – CO₂ aldehído DH

Sacharomyces se puede utilizar en sistemas continuos o discontinuos.

El proceso comienza en anaerobiosis (crec mas rápido) y a altas [] de glucosa, y una vez formada toda la biomasa de levadura, se pasa a anaerobiosis, y se produce el etanol. El rendimiento máximo es 1g glucosa 0,5g etanol. Altas [] de etanol retroinhiben la ruta, y el crecimiento cesa a partir de una [] de etanol 5%, pero aún se produce etanol. Pero al llegar a 6–10 %, deja de producirse etanol. El etanol además de inhibir, causa alteraciones en la membrana.

Ph = 4,5, T^a= 35°C

En el proceso continuo se obtiene 6–8 % de etanol a las 10 h y en el discontinuo 10% de etanol a las 12 h.

Una vez que acaba el proceso, la levadura se vuelve a usar como inóculo.

CARACTERÍSTICAS QUE DEBE TENER LA CEPA PRODUCTORA DE ETANOL:

- * Alta capacidad fermentativa
- * Alta tolerancia al etanol
- * Capacidad de transformar sustratos económicos
- * Carácter floculante

Para tener todas estas características se utiliza la técnica de fusión de protoplastos.

También se probó la utilización de una bacteria, *Zymomonas mobilis*. Se utiliza esta bacteria porque presenta una serie de ventajas sobre *S.cerevisiae*:

- * Tolera hasta 400g/L de azúcar (*S.cerevisiae* sólo hasta 250g/L)
- * Tolera hasta un 13% de etanol
- * Crece de 3 a 4 veces más deprisa.
- * Es anaerobia (no hay que hacer el paso previo aerobio para aumentar su biomasa)
- * Crece a Tª elevada (38–40°C)
- * Casi toda la glucosa que utiliza es para producir etanol.
- ** La desventaja es que como fuente de C utiliza sólo glucosa, fructosa y sacarosa, que son caros.

FERMENTACIÓN DE ACETONA Y BUTANOL:

Estos dos y el ác.butírico e isoprenol se obtienen de almidón, melazas, sacarosa e hidrolizados de madera y pentosas. El microorganismo es *Clostridium acetobutylicum*. Todos estos productos se obtienen a partir del Acetil-CoA. La fuente de carbono son melazas, la de N líquido de maceración del maíz, y a Tª de 34°C. La recuperación de acetona y butanol es por destilación, y el residuo de fermentación se usa como pienso.

En este proceso, la esterilidad es importante (peligro de fagos y *Lactobacillus*)

El *Clostridium* se inocula como esporas, y hay que tener cuidado al inocularlo por la contaminación.

GICEROL:

Las levaduras que lo hacen son:

S. rouxii

Torulopsis magnoliae

Pichia farinosa

Dunaliella salina (alga) Lo produce intracelularmente ante altas concentraciones de sal y luego lo al ponerla en medio sin sal lo expulsa, así podemos obtenerlo fácilmente.

ÁCIDOS ORGÁNICOS (se producen también químicamente):

ÁC. CÍTRICO:

Sobre todo para la industria alimentara, para preservar bebidas, alimentos, en medicina como conservante de la sangre, como antiespumante en química (en fermentaciones que producen bebidas), para potenciar el sabor y para el tratamiento de telas.

Las cepas más interesantes son mutantes de *Aspergillus niger*. La biosíntesis es por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a partir de:

PEP-----Piruvato -----Acetil-CoA -----Citrato
-CO₂

En la idiofase, la actividad de la citrato sintetasa aumenta 10 veces, y las enzimas que degradan el citrato reducen su actividad. Además hay dos rutas, una de ellas mediada por la piruvato carboxilasa:

Piruvato + CO₂ + ATP ----- Oxalacetato

Y la otra :

PEP + CO₂ ----- Oxalacetato + ATP

Así que son rutas anacleróticas, así lo que consume una, lo produce la otra.

Los sustratos usados son:

* almidón

* melaza de caña

* melaza de remolacha

* jarabe de glucosa

* jarabe de fructosa

** como elementos traza Cu, Mg, Mn, Fe (este debe de estar en menor [] que la óptima, el pH debe pasar de 5 a 3, 5 en fase de crecimiento y 3 en fase de producción.

El pH 3 evita la producción de ác. oxálico y melóptico. Los elementos traza, en exceso son tóxicos.

Candida lipolytica produce ac. cítrico a partir de hidrocarburos.

ÁCIDO GLUCÓNICO, GLUCONOLACTONA Y GLUCOSA ÁCIDA:

El ácido glucónico se usa para fabricar metales, cuero y en alimentación. Como gluconato Na se usa como antidetergentes, y en forma de D-gluconolactona se usa como aditivo para levaduras de panadería. La glucosa oxidasa se usa en clínica.

La fermentación la hace *A. niger* y *Acetobacter*:

Glucosa-----D-gluconolactona-----ac glucónico

Se produce H_2O_2 que pasa a $H_2O + O_2$ por una catalasa.

Dependiendo de lo que queramos producir añadiremos más o menos agua al medio. Con un 28–30 % producimos gluconato Na pero con 13–15 % producimos gluconato Ca, y es que si hay mucha concentración se forman cristales difíciles de purificar.

ÁCIDO ACÉTICO (YA LO VIMOS)

ÁCIDO LÁCTICO:

También se obtiene por síntesis química. La producen bacterias:

* Heterofermentativas: no interesan por que dan etanol y otros.

* Homofermentativas: sólo producen ác. láctico. Son las que nos interesan.

Las más importantes son *L. Del brueckii* (glucosa como fuente de C) y *L.bulgaricus* (f. de C lactosa)

Síntesis:

Glucosa-----1,3 DPG -----Piruvato -----lactato

GAP3 DH lactato DH

La [] de glucosa es 12% como fuente de N sulfato amónico al 0,25%, y además vitaminas como factores de crec. Necesita 72 h para fermentar y 40–45 °C para mantener el pH entre 5,5 – 6,5 se le hecha exceso de $CaCO_3$.

ÁCIDO ITACÓNICO:

Se utiliza en la industria del papel, fabricación de adhesivos y plásticos. Cepas mutantes de *Aspergillus itaconicus* y *A.terreus*. Su biosíntesis es a través del ciclo de los ácidos carboxílicos por descarboxilación del ác. cis-aconítico, por la ac. cis-aconílico descarboxilasa.

El itacónico formara ác. itatartárico por la ac. itacónico oxidasa. El calcio inhibe a esta enzima, por lo que se le añade al medio en exceso.

TEMA

BIOSÍNTESIS DE POLISACARIDOS EXTRACELULARES

Los polisacaridos se utilizan para la obtención de geles y espesar o gelatinizar alimentos.

Los de origen vegetal son los más importantes: Almidón, Agar y Celulosa pero también se usan mucho los formados por microorganismos.

XANTANO:

El microorganismo utilizado es *Xanthomonas campestris* (patógeno de plantas), su estructura es un polímero de glucosa 1–4. En algunas unidades alternativas presenta una posición 3 en el disacárido con 2 residuos de manosa con un ác. glucorónico intercalado. La manosa unida a la cadena central tiene un grupo acetilo y otro piruvato. La cantidad total de piruvato de la molécula varía en función del medio de cultivo, y esta cantidad

determina la viscosidad del polímero.

Fuente de C: Fuente de N: Sales:

Glucosa Extracto de levadura Fosfato de Mg

Sacarosa Peptona Sulfato de K

Hidrolizado de almidón Urea

Nitrato amónico

pH en torno a 7, puede hacerse en cultivos continuos y discontinuos. En los discontinuos al cabo de días hay excesiva viscosidad del medio (por eso es mejor el continuo). Los polisacáridos se recuperan por precipitación con metanol e isopropanol.

DEXTRANO:

Polímeros de glucosa con enlaces 1-6 glicosídicos y algunos 1-2, 1-3 y 1-4 glicosídicos.

Este polisacárido se produce por la enzima Dextranucrasa que polimeriza sacarosa en polímeros de glucosa y fructosa. La produce el género *Leuconostoc* y *L.mesenteroides* es el más usado. Debemos obtener este enzima aislándola del microorganismo, y luego este enzima pasa la sacarosa a dextrano. El pH es entre 5-5,2 y T^a 25-30°C. Además de obtener el dextrano, se puede obtener también la fructosa.

ESCLEROGLUCANO:

Polisacárido de glucosa unidas por 1-3, pero en ocasiones 1-6. Es producido por *Esclerotium glucaricum* y otras de su género. Crece sobre lignocelulosas hidrolizadas.

PULULANO:

Glucosas unidas por 1-4 y algunas 1-6, lo produce *Aurubasiidium pullulans*.

PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS POR FERMENTACIÓN

ANTIBIÓTICO:

Producto 2º del metabolismo de un org, inhibe el crec de otros org.

Son ampliamente usados, son rentables económicamente por que pequeñas cantidades son suficientes.

Se conocen hoy día más de 8000 antibióticos, cada día aparecen más pero la mayor parte son fracciones o metabolitos de los ab conocidos.

Tb pueden producirse químicamente.

La mayor parte de productores de ab son hongos (*actinomycetes...*) y bacterias.

Las + importantes son las Tetraciclinas, Cefalosporinas y griseofulvina.

Se usan en bioquímica para suplementar piensos animales. Tb se usan como antitumorales en bajas [] por que

pueden llegar a ser tóxicos, también en patologías de plantas se vió que podían usarse en < [] que las sust. químicas en plagas, ad+ los microorganismos del suelo son capaces de metabolizar estos ab (no contaminan).

Se usan también en alimentos, tirolisina, anisina, se usan contra *Bacillus* y *Clostridium* en cervezas.

El uso de los antibióticos ha de ser controlado ya que pueden dar lugar a la aparición de cepas resistentes a patógenos.

CLASIFICACIÓN ATENDIENDO A DISTINTOS CRITERIOS:

1- Origen: biológico: lo producen los microorganismos.

sintético: producido por síntesis química.

semisintético: el núcleo lo forman los microorganismos y una sust química añade los radicales.

2- Espectro de acción: los -lactámicos de amplio espectro (alto nº de microorganismos) de bajo espectro se encuentran pocos microorganismos.

3- * Efecto bacteriostático: inhiben el crecimiento bacteriano la síntesis o acción de un metabolito (no matan al microorganismo), cuando el antibiótico desaparece el microorganismo crece.

*** Efecto bactericida:** produce la lisis y muerte de los microorganismos.

4- Mecanismo de acción: puede ser sobre la pared celular, membrana plasmática, síntesis de proteínas, de DNA, etc.

5-Estructura química: carbohidratos

lactonas

quinonas

aa, etc.

Una clasificación no excluye a otra.

PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS:

REQUISITOS:

- Posible producción a gran escala (no muy importante, la síntesis en bajas cantidades también puede ser rentable).
- Ser rentable frente a la síntesis química.
- Ser fácil de recuperar.
- En la purificación puede ocurrir dos cosas:

Ab solubles en compuestos orgánicos, inmiscibles en agua, son fáciles de extraer.

Ab insolubles en componentes orgánicos, se extraen por adsorción, precipitación química o intercambio iónico.

CEPAS PRODUCTORAS DE ANTIBIÓTICOS:

- Que produzcan sola/ el ab que nos interesa.
- Por distintos métodos poder obtener cepas superproductoras que producen grandes cantidades de ab.

CLORANFENICOL:

Producidos por sist químicos normalmente. Se aisló por 1ª vez de *Streptomyces venezuelae*, Ab de amplio espectro contra bacterias gram – y contra *Salmonella typhi* y *Bordetella pertusis*, también es producido por *Bacillus subtilis* (contra un gran nº de microorganismos entre ellos *Rickettsias* y algunos virus).

Su síntesis es a partir de la ruta de a.a. aromáticos (Tyr, Phe, Trp). Los precursores son D-eritrosa 4 Fosfato (que proviene de la ruta de las pentosas fosfato), fosfoenolpiruvato (que viene de la glicólisis). D-eritrosa 4P y fosfoenolpiruvato se condensan por una sintetasa y se produce una serie de intermediarios que dan ácido corísmico (que da ácido prefénico que da Tyr y Phe) además del cloranfenicol.

Si el microorganismo que lo produce es *B. subtilis* " retroinhibición por producto final, Trp, Phe y Tyr inhiben la ruta anterior (acumulación de ácido prefénico). Acumulación de ácido prefénico y acumulo de ácido corísmico inhiben la condensación de la D-eritrosa 4 P y del fosfoenolpiruvato (1º paso de la ruta).

La acumulación de ácido prefénico desvía la ruta hacia la producción de cloranfenicol que también se inhibe por retroalimentación.

Fermentación de cloranfenicol por *S. venezuelae* es multivalente, la regulación depende de los demás componentes del medio.

CONDICIONES DE FERMENTACIÓN:

- La adición de aa aromáticos estimula la producción de cloranfenicol.
- Si la síntesis es directa sólo se producen 100 mg/ml por inhibición por el propio cloranfenicol ya que los microorganismos que lo producen resisten hasta 100mg/ml.
- Es interesante producir cepas mas resistentes al cloranfenicol.
- El cloranfenicol es de fácil extracción, solamente hay que condensar y cristalizar tras la fermentación.

ANTIBIÓTICOS POLIPEPTÍDICOS

Son ab cuya molécula es un polipéptido:

Gramicidina-S, polimixina-D, bacitracina-A.

La tirotricina fue el primero aislado, a partir del cual se obtuvieron la gramicidina y la tirotrina. *B. subtilis* fue de quien se aislaron, son de amplio espectro (contra G⁺ y G⁻) pero son muy tóxicas (la polimixina es nefrotóxica, la D y E las menos). Se utilizan por vía subyótica, difieren de proteínas es: que su PM <3 KDa

Presentan aa poco frecuentes (D-aa, N-metil aa, ets).

Tienden a ciclarse o hiperciclarse.

La biosíntesis es por acción de un complejo multienzimático específico en función del ab. que se va a formar. Este complejo presenta una afinidad por los aa del medio, según la afinidad que presente se irán colocando los distintos aa, por tanto no tiene nada que ver con el mecanismo de traducción.

Las etapas para la biosíntesis comienzan con añadir ATP formándose los aminoaciladenilatos. El siguiente paso sería el enlace entre un aa y el siguiente por enlace peptídico, con la energía de un enlace tioéster. El tioéster que queda al final de cada aa activado es el que usa. Por último hay que hacer modificaciones en los aa ya formada la cadena (metilación, cambio de D a L).

CARACTERÍSTICAS DE ESTOS ANTIBIÓTICOS:

- Tienen menos de 15 a.a.
- se producen familias de ab. basados en pequeños cambios en a.a.

Activación de aa:

aa + ATP ----- aminoacil-AMP-----aa activado definitivo

grupo tiol del enzima

GRAMICIDINAS:

Decapéptido de 2 pentapeptidos idénticos, que se unen y ciclan cabeza-cola. Los produce *Bacillus brevis* que necesita, para formarlas: enzima ligero, enzima pesado, ATP, aa e iones Mg^{++} .

BIOSÍNTESIS: activación de la D-Phe por el enzima ligero (L), al mismo tiempo, el enzima pesado (H) activa estos aa: Pro, Val, Ornitina y Leu por este orden y entonces se encuentra L con su aa activado y H con sus 4 aa act y comienza la polimerización con un cofactor: fosfopanteteína (por eso se añade panteteína al medio). Una vez formada la cadena, se produce la unión cabeza-cola (ciclación).

La regulación de esta polimerización viene dada por Pro (primero activado por H), cuya activación induce a que se sigan uniendo aa. El acúmulo de los precursores, también estimula la formación del ab.

POLIMIXINA:

Activa contra G⁻, es muy básica. La produce *B. polymixa*, existen cepas resistentes en el género *Proteus*. Es muy importante clínicamente, por ser efectiva contra *Pseudomonas aeruginosa*, es altamente nefrotóxico, suelen usarse las formas E y B que son menos tóxicas. La fermentación se hace en medios aeróbicos y el medio con glucosa, extracto de levadura y sales. Tras la fermentación las bacterias se retienen por filtración (el ab. lo llevan dentro) para retirar el ab. se utiliza carbón activo, se le añade ácido hidrocórico metanólico para que debido a la abundancia de ácido diaminobutírico se produzca un cloruro que precipita en acetona, luego hay una segunda purificación por cromatografía.

BACITRACINA:

Polipéptidos cíclicos. Se utilizan en tratamientos tópicos y como suplemento de piensos.

La A la produce *B. subtilis* y *B. licheniformis*, en un proceso aerobio a 37°C con fuente de C harina de soja, carbonato Ca y sulfato de Mg, La purificación es por filtración.

ANTIBIÓTICOS -LACTÁMICOS I (PENICILINAS):

Todos los que posean el anillo -lactámico se denomina así. Todos se caracterizan por inhibir la biosíntesis de los componentes de la pared celular. Se clasifican en 6 grupos en función de su estructura:

- Penicilinas

- Cefalosporinas
- Cefaminas
- Ácido clavulánico
- Tienamicinas y ácido oliválicos
- Nocardicinas y monobactamas

Las **penicilinas** se forman de un núcleo β -lactámico de 4 miembros, unido a un anillo de tiazolidina con 5 miembros.

Las **cefalosporinas** tienen un núcleo de anillo β -lactámico unido a un anillo insaturado de dihidrotiazina.

Las **cefaminas** son un tipo especial de las anteriores, con un grupo metoxilo ligado al C-7.

El **ácido clavulánico** es muy similar a penicilinas, pero tiene anillo de oxazolidina y no tiene la cadena lateral del C-7, tiene un hidroxietilideno en C-2. (38 preg)

Tienamicinas y ácido oliválico tienen un β -lactámico unido a un anillo pirrólico de 5 C.

Las **nocardicinas y monobactamas** tienen un único β -lactámico monocíclico y un único grupo acilo ligado al núcleo en su amino.

PENICILINAS:

Son muy utilizadas en clínica, son efectiva contra G⁺ y G⁻ (las naturales sólo contra G⁺ por eso se usan más las semisintéticas, a las cuales además no afectan β -lactamasas)

SU PRODUCCIÓN INDUSTRIAL SE DEBE A 3 FACTORES:

- búsqueda de nuevas cepas. La primera aislada por Fleming de *Penicillium rotatum*, pero produce poco, hoy, industrialmente se usa *Penicillium chrysogenum*.
- Perfeccionamiento de las cepas, una vez aisladas, para ello se utilizan agentes mutagénicos (gas mostaza, UV, rayos X), los mutantes se seleccionan por su productividad, se pueden llegar a obtener 20g/L.
- Optimización del medio, debemos variar las características de la fermentación y componentes del medio, porque los precursores del medio influyen.

Con los medios usados antes, se obtenía penicilina F, pero añadiendo líquido de maceración de maíz aumenta la producción de penicilina G.

ESTRUCTURA QUÍMICA: 3 PARTES

- Anillo de tiazolidina, que protege el β -lactámico.
- Anillo β -lactámico, muy reactivo, responsable de la capacidad antibiótica (se degrada fácilmente a pH ácido o básico).
- Cadena lateral variables, la que distingue a los tipos de penicilinas.

Las 2 primeras juntas forman el ácido 6-amino- β -penicilámico (6-APA), esto ocurre por la unión de la L-Cys y la L-Val (esta al unirse revierte el isómero a D) y es la parte común a todas las penicilinas.

BIOSÍNTESIS DE LAS PENICILINAS:

Hay 3 a.a. esenciales, el ácido L- β -aminoadipico (L-AAA), L-Cys y L-Val.

La condensación del L-AAA con L-Cys da lugar ácido aminoadipil-L-Cys, una vez que están unidos, se une la D-Val, formándose el γ -(L-aminoadipil)-L-cistenil-D valina, llamado ACV, es un tripéptido. Este sufre una ciclación, formándose la isopenicilina N, la 1ª natural que se forma. Ahora con una penicilin acil transferasa se unen las cadenas laterales, cualquiera porque el enzima es inespecífica, esta cadena ha de estar activada por un CoA. Una vez actúe la p. acil-transferasa, se forma la correspondiente penicilina y se libera el L-AAA.

Los tres aa precursores se sintetizan por vías independientes: el L-AAA es del ciclo de Krebs, a partir de cetoglutarato. La Val por la glucólisis, de Pyr, y la Cys del fosfoenolpiruvato, también de glucólisis. El que dona los amino para la transaminación es la Gln.

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS:

Además de los mecanismos indirectos, hay 4 directos, la primera es la regulación por Lys, que se forma así:

AcCoA + γ -cetog ----- Homocitrato L-AAA Penicilina Lys

homocitrato sintetasa -----!

La lys tiene retroinhibición por producto final, inhibiendo la homocitrato sintetasa, evitando que se forme L-AAA, inhibiendo también la síntesis de penicilina.

Otro tipo de regulación es la retroregulación por penicilina, cuanto más productora sea la cepa, menos sensible es a esta regulación. Otro mecanismo de regulación es la represión catabólica por C. La adición al medio de glucosa también inhibe los ab, igual que pasa con la fructosa, sacarosa y galactosa. La glucosa sólo inhibe si se añade antes de formarse la biomasa, después ya no, así que inhibe la síntesis de enzimas, no la actividad en enzimas.

El 4º mecanismo es el N, cuando las © crecen en medios con N fácilmente asimilable, se inhibe la síntesis. Si la [] de NH_4 es baja, [glutamina sintetasa] es alta, entonces aumenta la [aa precursores](porque Gln daba aminos por transaminación) y la [antibiótico] es alta, pero si la [] de N es alta, ocurre lo contrario.

SELECCIÓN DE CEPAS SUPERPRODUCTORAS:

Obtención de mutantes auxótrofos para la Lys, bloqueados después del paso del L-AAA. Para obtener estos mutantes se añade Lys al medio en condiciones subóptimas, porque en exceso inhibe la ruta como ya vimos, en la homocitrato sintetasa.

Otro tipo de cepas serían las mutadas para la homocitrato sintetasa, que ad^+ del lugar de unión al sustrato, tiene un centro alostérico y este centro es el que se busca que esté mutado.

- el 3º tipo de mutantes son mutantes resistentes a análogos tóxicos de Lys, que actúan como falsos inhibidores por producto final. 5-aminoetil-L-Cys, inhibe el crecimiento de *Penicillium* por ser homólogo de las Lys. Estos mutantes serán resistentes tanto a Lys como al pseudo inhibidor. Para obtenerlo, se añade al caldo alta [] de estos análogos las cepas que crezcan serán resistentes.
- Mutantes resistentes a la inhibición catabólica por glucosa: se añaden altas [] de glucosa al medio, y así se ven los mutantes que producen más ab.
- Mutantes resistentes al propio ab: se pretende buscar cepas que soporten altas [] de ab en el medio.
- Mutantes por tratamiento con agentes mutagénicos (UV, gas mostaza, rayos X)
- Mutantes resistentes a análogos tóxicos de los precursores.

CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA OBTENER EL ANTIBIÓTICO:

Fuente de C: glucosa y lactosa. El ab se produce al acabarse la glucosa, la glucosa se añade poco a poco para evitar su efecto regulador .

Fuente de N: sales amónicas, líquido de maceración del maíz que tiene ácido fenilacético (factor de crecimiento) que ha de ser añadido en mayor cantidad.

Fuente de S: sulfato inorgánico.

pH: 7

Tª: 30°C en crecimiento y 25°C para producir el antibiótico.

Para obtener el antibiótico se separa el micelio por filtración. La metil-isobutilcetona es un solvente añadido al caldo para obtener el antibiótico. La 2ª extracción es con Ca_2CO_3 aq , y se forma una sal sódica de bencilpenicilina, que se recupera por desecación.

PENICILINAS SINTÉTICAS O BIOSINTÉTICAS:

Las naturales tienen 3 inconvenientes:

- Son sensibles a ácido gástricos, no se pueden ingerir.
- Sensibles a penicilinasas.
- Espectro sólo en G+, las G son impermeables a ellas.

Las biosintéticas se basan en la inespecificidad del enzima (penicilina-acil transferasa) que añade la cadena lateral, si tenemos el núcleo 6-APA aislado, podemos añadirle las cadenas laterales que queramos que deben tener siempre un carboxilo terminal, no ser tóxicas para el hongo y resistir la oxidación del caldo.

En el caso de la penicilina V se usa el ácido fenoxiacético, muy estable en medio ácido (puede ingerirse).

En las semisintéticas se hace crecer al hongo en medios sin precursores para las cadenas laterales, así obtenemos el núcleo 6-APA, pero esto no es rentable, entonces lo que se hace es obtener la penicilina G y con una penicilin-acilasa se le quita la cadena lateral.

Ahora que tenemos el núcleo, le añadimos la cadena que queramos. Así se ha obtenido 5000 diferentes. La diferencia con las biosintéticas es que estas se forman por el mismo hongo, que coge las diferentes cadenas laterales que le damos en el medio.

CEFALOSPORINAS:

Son β -lactámicos, se diferencian de penicilinas por poseer un anillo de dihidrotiazina, en vez de β -tiazolidina. El anillo formado es el 7-amino cefalosporámico (7-ACA). El precursor es D-AAA, no como en las penicilinas que era el isómero L.

También inhiben síntesis de pared, pero su espectro es mayor, resisten más a la destrucción de β -lactámicos. Y en general, la gente no es alérgica a ellas, aunque si lo sean a otras β -lactámicos.

Las primeras se aislaron de *Cephalosporium*, para la producción industrial se usa *Cephalosporium acremonium*.

BIOSÍNTESIS: El precursor común de todas es la isopenicilina-N y la ciclación de este péptido se estimula por Fe. La formación de la cadena lateral se estimula por la acilasa.

La primera reacción que se produce es la inversión de la cadena lateral, dando lugar a la penicilina-N por medio de una epimerasa. A partir de la penicilina-N por medio de una expandasa, se transforma en D-acetoxicefalosporina E. En este caso ocurre una expansión del anillo que pasa de tener 5 miembros a 6 (al enzima expandasa se le denomina también D-acetoxicefalosporina sintetasa). Esta reacción es estimulada por Fe, Ascorbato y ATP. Luego ocurre, una oxidación del medio por una dioxigenasa, la formación de la diacetil cefalosporina C. Esta reacción es estimulada por el Fe, ascorbato y α -cetoglutarato. En el último paso una acetil transferasa se transmite al acetilo de un acetil-CoA. Formando la cefalosporina C.

REGULACIÓN: simulan también a penicilinas. Pueden ser por regulación catabólica por C en la expandasa, que forma acetoxicefalosporina C. Si en el medio hay sacarosa y glucosa produce la penicilina-N, y cuando la glucosa se acaba produce la C y es que se ha observado que la expandasa no empieza a sintetizarse hasta que no haya glucosa.

Otra regulación es la regulación por nitrógeno, en este caso se centra en la gluconato DH que si no es inhibido, aumenta la asimilación de N y producción de cefalosporina C. También se regula por producto final. Otra es la regulación por Lys, pero la añadida al medio no inhibe (el hongo es impermeable a ella), pero si se produce un acumulo intracelular, si se inhibe, sobre la homocitrato sintetasa como las penicilinas.

Otro tipo de regulación es para la Met y el metabolismo del S, no ocurre en penicilinas. La síntesis óptima del antibiótico depende de que exista en el medio una [] adecuada de S, por que esto se relaciona con la formación del aa Cys. En el caso de *Penicillium*, este obtiene el S por dos vías, una de ellas es a partir del sulfato inorgánico (reducción asimiladora del sulfato), en este caso a partir del sulfuro y la Ser, por la Cys-sintetasa se obtiene la Cys. El mismo hongo obtiene la Met por la transulfuración inversa, siendo esta la 2ª vía de que hablábamos *Cephalosporium* obtiene la Cys sólo por esta 2ª vía de transulfuración inversa.

En fase de crecimiento vegetativo, si añadimos Met se favorece la producción de la cefalosporina.

SELECCIÓN DE CEPAS: Lo que queremos es obtener el núcleo 7-ACA para esto debemos hidrolizar la cefalosporina C. Para esta hidrólisis se pueden usar enzimas bacterianos, *E. coli* produce la cefalosporina-E-acilasa. También se pueden obtener el 7-ACA por hidrólisis química, los radicales se añaden después.

También se puede obtener a partir del anillo de las penicilinas, utilizando un enzima que produzca la expansión del anillo, así obtenemos el anillo de cefalosporina.

Las 2 primeras cefalosp sintéticas obtenidas fueron: Cefalotina y Cefaloridina, que fueron efectivas frente a *Staphylococcus* (que son resistentes a las penicilinas). El inconveniente que presentaban es que oralmente no eran asimilables por el organismo. Por eso el descubrimiento de la cefalosporina fue importante, por que sí que se podía administrar oralmente.

CEFAMICINAS:

También llamadas 7-metoxicefalosporinas, el microorganismo productor es *Streptomyces*, su síntesis es similar a las cefalosporinas, pero el hongo no obtiene el L-AAA de la misma manera, sino que lo obtiene a partir de la Lys, así que la Lys estimula, al contrario que antes la síntesis.

La regulación es igual que en los β -lactámicos, existiendo regulación por C y por N. La adición de cloruro amónico y ácido glutámico reduce la síntesis de Cefamicinas.

OTROS β -LACTÁMICOS:

Se siguen buscando nuevos por la aparición de resistencia por medio de β -lactamasas codificadas en

plásmidos, fácilmente transmisibles, por eso se buscan otros que resistan a lactamasas.

- Tienamicinas
- Ácido clavulánico
- Ácido olivánico
- Nocardicinas.

TIENAMICINAS:

Las producen *Streptomyces*, activo contra G⁺ y G⁻, y pueden inactivar las β -lactamasas.

El ácido clavulánico y los olivánicos, aunque no sean de buenas propiedades antibióticas inhiben las β -lactamasas y se usan combinadas con antibióticos β -lactámicos.

AMINOGLUCÓSIDOS:

Se aislaron todos a partir de *Streptomyces* y algunos *Actinomycetes*. A partir de pocas estructuras se obtuvieron muchos.

Son aminoazúcares unidos entre sí por O-glicosídicos:

La streptomicina, *S. griseus*

Neomicina, *S. gradiæ*

Kanamycinas, *S. kanamyceticus*

Gentamicinas, *Minomonospora purpura*

Tobramicinas

Todas se usan contra G⁻, la streptomicina es la más conocida. Su interés radicó en ser el primer antibiótico efectivo contra la tuberculosis. Hoy se deja de utilizar por sus graves efectos 2º y que aparecen en seguida resistencias.

Su modo de acción (el de todos) es interferir en los ribosomas obstruyendo la síntesis proteica.

Son CH con 3 o 4 subunidades de azúcar por lo que son oligómeros. Contienen en su molécula en aminoaciclitol. El proceso de biosíntesis ocurre en 2 etapas, la 1ª consiste en la formación de las unidades glucosídicas a partir de glucosa, y la 2ª etapa, la formación de los enlaces.

STREPTOMICINA:

3 subunidades: Streptosa, streptidina y N-metil-glucosamina.

Al mismo tiempo que se forma es el aldo de fermentación paralela a la otra se debe a que los enzimas son inespecíficos.

La D-manosa se une al C-4 de la N-metil glucosamina (en esta strpt-B)

BIOSÍNTESIS: por un lado se forma una streptidina-p que se desfosforila al unirse a las otras subunidades. Por otro lado se forma la 5 streptosa, para la cual se produce una esterificación con desoxitimidina-5-P, luego

una contracción del anillo por formarse en enlace entre C-2 y C-4, el C-3 revierte en un grupo acetilo. Todo esto forma la Dihidrostrptosa.

La N-metilglucosamina se une a la molécula y después se produce la metilación de esta glucosamina, y luego ocurre la desfosforilación de la streotidina.

La enzima que desfosforila es la streptomycin-6-P fosfotransferasa.

REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS: Se produce a varios niveles, uno de ellos es la inducción por factor A, represión catabólica por N y regulación por fosfato.

El factor A no es precursor, pero es imprescindible para la síntesis, observando en mutantes y repercute en que no se sintetiza la enzima aminotransferasa. El mecanismo por el que actúa el factor A no se conoce bien, es en el metabolismo de la glucosa 6-P la actividad del enzima que la transforma en ácido. fosfogluconico es alta en cepas que no lo producen y baja en las que sí producen el antibiótico: El factor A no inhibe al enzima, sino que se cree que actúa sobre un factor que sí la inhibe.

Represión catabólica por N: si la fuente que le añadimos es fácilmente asimilable, la producirá en crecimiento primario, por lo que habrá poca formación de antibiótico. Pero si la fuente de N se asimila lentamente el N no interferirá en las enzimas que producen el antibiótico.

Fuentes de N lentamente asimilables: harina de soja y prolina.

Fuentes de N rápidamente asimilables: sales amónicas.

Regulación por fosfato: un exceso de fosfato inorgánico produce incremento del metabolismo ^{1º} activando la ruta del G3P, esto igual que antes activaría el crecimiento © pero sin antibiótico. Ad+ el exceso de P orgánico inhibe la formación de glucosa 6-P, por lo que no hay precursor.

También hay regulación a nivel de la carga energética: la PFK se inhibe por citrato y ATP porque la carga energética alta favorece la formación del antibiótico porque así se hace que la glucosa no vaya a la glucólisis que está inhibida.

El P inorgánico también afecta a las fosfatasas (la última enzima que actuaba en biosíntesis era una de estas) por tanto se haría que la streptomycin 6-P se acumulase en medio.

FERMENTACIÓN: medio con baja [] P y fuente de N lentamente asimilable: glucosa al 4% (porque es precursor hace falta alta []), harina de soja 4% esto provocará crecimiento lento. Productos de destilería al 0,3% (fuente de mananos y factor de crecimiento) NaCl al 0,25% pH 7-8 Tª 27-29 °C, [] P siempre controlada. Es un crecimiento fuertemente aerobio.

El micelio se retira por filtración y el filtrado se pasa por una columna de carbón activo, para que ocurra adsorción al carbón. Una vez hecho esto se eluye con ácido de carbón y purificamos.

OTROS ANTIBIÓTICOS DE INTERÉS:

GRISEOFULVINA:

Penicillium griseofulvum, único metabolito antifúngico en clínica, fungistático, contra dermatitis, sobre todo fúngicas. No es muy potente pero no es tóxico y se puede ingerir preventivamente.

Se sintetiza a partir de 7 unidades de acetato, como fuente de C la lactosa, en su regulación hay represión

catabólica por CH entonces se usa lactosa (se hecha toda al pcpio) por que se asimila lentamente, la glucosa para usarla habría que añadirla lentamente.

El N ejerce inhibición también , se usan fuentes de N que se asimilen lentamente (harina de soja, extracto de levadura) el antibiótico se extrae por solventes y se cristaliza.

TETRACICLINAS:

Amplio espectro (G+ y G) inhiben la acción de la subunidad 30 s. Las produce *Streptomyces* diferentes sp. La clorotetraciclina es de las más imp , la sintetiza *S.aurofaciens*, que también hace la tetraciclina. Tienen un anillo de naptofeno al que se unen otros radicales.

Obteniendo el anillo, podemos fabricar las semisintéticas. Hay regulación por CH, la glucosa no se usa como fuente de C. Como fuente de N líquido de maceración del maíz. El P inorgánico es otro inhibidor, una vez finalizada la fermentación las tetraciclinas se recuperan añadiendo cal al medio, esto provoca precipitación, luego se filtra el caldo y al componente que tenemos se le añade sulfhidro, luego sulfatos insolubles y entonces se produce la precipitación del antibiótico.

ERITROMICINA:

Pertenece a los macrólidos, que poseen grandes anillos, un anillo lactónido y la parte glucídica. Se aisló de *S.erythraeus* y *S.raaijmakersii*. Inhibe síntesis de prot a nivel de ribosomas, se usa como sustituto de penicilinas. Se usó siempre contra *legionella*. También existe represión catabólica por glucosa, para la fermentación utilizamos sacarosa de fuente de C y líquido de maceración del maíz como fuente de N, o extracto de levadura. Estas fuentes de N, deben ser poco asimilables. El pH debe ajustarse a 9 para extraerlo luego se añade amiloacetato, y entonces cristaliza.

NISTALINA, ANFOTERICINA B, CANDICIDINA:

Forman parte de los macrólidos, se llaman antibióticos poliénicos. Se forman de una cadena de C cerrados con un anillo de lactona. Son activos contra levaduras y hongos como *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus*.

La nistatina la fabrica *S. noursei*, la Anfotericina B *S. nodosus* y la candicina *S. griseus*.

Para la fermentación como fuente de C glucosa, pero evitando la repr catabólica.

Fuentes de N lentamente asimilables para evitar represión: liq de maceración del maíz, harina de soja, extracto de levadura.

Para extraerlos: metanol, butanol saturado en agua. Después purificarlos es difícil, son poco solubles, inestables a la luz, inestables en medio ácido o básico.

OBTENCIÓN DE SUPERPRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS:

- Mutación de cepas iniciales y siembra en medios para ver si producen antibióticos, si lo producen ver si es más o menos que antes.
- Si las mutaciones son espontáneas, costará más encontrarlos, pero lo más fácil es inducir mutaciones con UV, gas mostaza, rayos X, etc.
- La mayoría de mutantes producen menos, que los parentales, por lo que no suelen usarse estos métodos.

Para obtener superproductores se usa más la recombinación génica, para esto existen transformación,

transducción y conjugación.

En la transformación se transmite DNA libre en el medio.

En la transducción los virus son mediadores, por infección de virus con DNA de otras bacterias infectadas antes.

La conjugación es por contacto © a ©, y se transmiten plásmidos conjugativos.

La fusión de protoplastos se hace en sp que no tienen conjugación génica. Lo que se hace es eliminar la pared con lisozimas, después las membranas de similar composición se fusionan con PEG en el medio. Al unirse las © los ADN entran en contacto y recombinan, una vez que tenemos las cepas recombinantes las introducimos en un medio que permita regenerar la pared.

La clonación es otra técnica, es muy difícil con antibióticos requieren de 10 a 30 genes pero suelen estar juntos, lo que facilita la técnica.

TEMA

BIOCONVERSIONES O BIOTRANSFORMACIONES:

Estos procesos son de uso amplio en microbiología industrial. Se trata de usar microorganismos para transformar un sustrato en un producto esta capacidad se llama biotransformación o bioconversión.

En grandes tanques añadimos el microorganismo y el sustrato, luego se obtiene el producto.

Se pueden usar procesos químicos o biológicos, los Biológicos tienen ventajas:

- especificidad por sustrato
- estereoespecificidad: se puede producir isómeros concretos.
- regioespecificidad: un enzima diferencia entre grupos funcionales de un compuesto, aunque tenga varios, sólo actuará sobre uno.
- condiciones de reacción: más suaves en procesos biológicos. Los procesos químicos son más fuertes y, a parte de producir el producto deseado, se afecta mucho a otros componentes del medio, por lo que se producen residuos más contaminantes en medioambiente.
- Se pueden hacer reacciones combinadas(un solo microorganismo posee el grupo adecuado de enzimas para hacer todo el proceso) o escalados (hacen falta más tipos de microorganismos).

DIFERENTES TIPOS DE REACCIONES DE BIOCONVERSIÓN:

- oxidaciones
- reducciones
- hidroxilación
- condensación
- isomerización
- formación de nuevos enlaces C-C

Oxidaciones:

Dentro de estas pueden haber hidroxilaciones:

Trp----- 5-hidroxi Trp

B. subtilis

Oxidación de cadenas laterales alifáticas para hacer aldehídos, cetonas o carboxilos:

dodecil benceno ----- ác. fenitacético

Nocardia sp

Degradación oxidativa de cadenas laterales (fotocopia)

Reducciones:

Reducción de funciones carboxilo

Hidratación de dobles enlace C=C

Hidroxilación:

Hidratación de dobles enlaces C=C

Hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos

Hidrólisis de N-derivados

Condensaciones:

Fosforilación

DENTRO DE LOS PROCESOS DE BIOTRANSFORMACIÓN, SE PUEDEN USAR VARIOS TIPOS DE CULTIVOS:

- cultivos con esporas
- con cultivos en crecimiento
- con cultivos en reposo
- sistemas enzimáticos inmovilizados
- cultivos celulares inmovilizados

CON CULTIVOS EN CRECIMIENTO:

Hay que obtener su biomasa, entonces hay que hacer crecer el microorganismo hasta obtener la biomasa formada (6–24h en bacterias), y entonces añadimos solución concentrada de lo que queremos transformar. Hay una variante: añadir el sustrato a la vez que el inóculo, si usamos ya un inóculo muy grande.

Si la sustancia a transformar tiene poca solubilidad se le añade emulsionantes, como el tween 80 y disolventes como etanol, acetona, dimetilformamida, DMSO, todos con baja toxicidad. Si se utilizan esteroides para transformar como tienen baja solubilidad, limitan la cantidad de sustrato que se puede añadir al medio esto se soluciona por que el tween aumenta la cantidad que se puede añadir.

Pero si la solubilidad es extremadamente baja, se puede cristalizar la sustancia y luego se añade al medio. Así aumenta aún mucho más la capacidad de ser transformados.

Otra posibilidad es utilizar sistemas polifásicos para sustancias lipofílicas, en estos casos, en tanques grandes

tenemos en fase acuosa el material ©, le añadimos el sustrato, que irá siendo transformado poco a poco, a medida que pasa a la fase acuosa, ocurriendo la transformación, en muchos casos en la interfase. El tiempo depende del microorganismo, tipo de sustrato y reacción. Las bacterias tienen crecimiento más rápido que hongos y levaduras por tanto son más rápidas.

Las oxidaciones y deshidrataciones con bacterias tardan horas, con levaduras y hongos días. Todas las transformaciones ocurren en condiciones de esterilidad, todas las fermentaciones se producen con aireación.

Con espectrofotometría y cromatografía sabemos si se están formando los productos deseados.

CON CULTIVOS EN REPOSO:

Esta técnica se usa cuando no es necesaria la inducción del enzima por el sustrato, sino que el enzima es constitutivo.

Este método tiene varias ventajas:

- evitan inhibición de crecimiento por producto
- se pueden utilizar altas densidades de sustratos
- se pueden utilizar altas densidades celulares
- disminuyen riesgos de contaminación
- como estas reacciones se realizan en sistemas tampón, la recuperación del producto es muy fácil

SISTEMAS ENZIMÁTICOS INMOVILIZADOS:

Presentan la ventaja de que se pueden utilizar muchas veces los cultivos. Se usan para obtener ácido aspártico, L-alanina, ácido málico.

CULTIVOS CELULARES INMOVILIZADOS:

Cuando se quiere evitar degradación de productos finales y reacciones que interfieren y cuando la velocidad del proceso está condicionada por la velocidad de penetración del sustrato.

Los productos finales de las reacciones suelen ser extracelulares y están en disolución. Pero si usamos un hongo, hay que filtrar (por el micelio), pero con levaduras y bacterias una vez terminada la reacción tenemos que lavar las © también.

Para recuperar el producto final:

- precipitación con sales cálcicas
- absorción en columnas de intercambio
- extracción con solventes
- destilación directa (solo con compuestos volátiles).

APLICACIONES DE INTERÉS INDUSTRIAL:

Sólo se ha encontrado utilidad para algunos procesos porque algunos procesos tienen rendimiento bajo, y otros aunque alto no tienen mercado.

El rendimiento se aumenta con superproductores y cambiando condiciones del cultivo.

La utilización de biotransformaciones para obtener productos de interés se lleva a cabo de diferentes formas.

- obtención de esteroides (a partir de esteroides)
- obtención de no esteroides: alcanos, terpenos, alcaloides, ácido ascórbico, dihidroxiacetona a partir de glicerol, prostaglandinas a partir de ácido araquidónico.
- transformación de antibióticos se pretende modificarlos para obtener mejor toxicidad, mayor efectividad, etc
- transformaciones de pesticidas, en compuestos no tóxicos por que su acúmulo en el subsuelo crea una serie de problemas.

OBTENCIÓN DE ESTEROIDES:

Como ejemplo: glucocorticoides (cortisona, cortisol, corticosterona), mineralocorticoides (aldosterona) Cderivados ambos de la corteza adrenal), andrógenos (testosterona), getágenos(progesterona), estrógenos (estradiol, estriol, estrona). Progesterona, estrógenos y andrógenos tienen uso terapéutico.

Los derivados de progesterona y andrógenos se usan como sedantes y en terapia antitumoral.

Los glucocorticoides (cortisona el que más) son antiinflamatorios (contra artritis reumatoide y enfermedades de la piel), un simple cambio estructural, produce la prednisolona o prednisona (a partir del cortisol o cortisona) cuyo efecto es aún mayor como antiinflamatorio.

El interés radica en la optimización de los nuevos sistemas para que el proceso sea rentable, hay que optimizar el proceso, para eso se usan sistemas de © inmovilizadas o sis enzimáticos. Otra forma de aumentar el rendimiento es variar los procesos de la reacción (cambiar el sustrato, utilizar cepas superproductoras), se intenta en investigación actualmente, mejorar esta producción, no buscar nuevos esteroides, que no hacen falta.

Todos los esteroides tienen un ciclo ciclopentanoperhidrofenantreno. La síntesis de estos esteroides puede ser por vía química o por organismos. La química es complicada, no es rentable, por lo que se usan microorganismos para ciertos pasos, por lo menos uno por ejemplo: formación de cortisona a partir de progesterona, la 1ª etapa es una hidroxilación:

progesterona-----11, -hidroxiprogesterona-----hidrocortisona -----cortisona

1 2 3

1, lo hace *Rizhopus nigricans*(11, -hidrolasa, actúa sobre el C11 de la molécula)

2 y 3, se hacen químicamente.

La mayoría de las bioconversiones conllevan hidroxilaciones, pero también oxidaciones, reducciones, hidrólisis y producción de ésteres. La producción industrial de esteroides se basa en producción de hidrocortisona, cortisona, predmisona y prednisolona, porque son los más interesantes económicamente.

Estos 4 se sintetizan por síntesis química y microbiana a partir de la dioxigenina.

dioxigenina-----sustancia S de Reichstein

otros productos los 4 esteroides mencionados

Curvularia lunata produce desde la sustancia S el cortisol, por -hidroxilación, después, de cortisol se pasa a *prednisolona* y esto lo hace *Corynebacterium simplex*, por una deshidratación, el paso de cortisol a cortisona es oxidación, hecha químicamente y el paso de cortisona a prednisona es deshidratación por *C. simplex*.

Otro ejemplo de reacciones interesantes son las hidroxilaciones de *Streptomyces* por ej:

9- fluorocortisol ----- 9- fluor 16 -hidrocortisol

otro ej por *Artobacter simplex* (a parte de *C. simplex*):

cortisol-----predmisolona

CONDICIONES DE REACCIÓN:

Varían según el microorganismo utilizado, normalmente para esteroides se usan fermentaciones discontinúas, pero también sistemas © inmóvil y sistema de enzimas inmóvil, que tienen ventajas: menor riesgo de contaminación, mejor recuperación del producto, concentraciones de sustrato mayores, tiempos de conversión más cortos, ad+ de estos sistemas también se usan sistemas de esporas.

También se pueden obtener esteroides desde esteroides, por degradación microbiana del esteroide, dejando núcleo intacto y luego lo modificamos, un ej:

Hidrólisis de cadenas laterales de colesterolnúcleo de esteroide--androstenodiona/androstadendina

Un microorganismo que puede hacer esto es del género *Micobacterium*.

Para no romper el anillo, debemos usar cepas mutadas y otros métodos para que ataquen específicamente los radicales del anillo.

TRANSFORMACIONES NO ESTEROIDEAS:

Glicerol-- dihidroxiacético: bacterias acéticas, con extracto de levadura (0,5%), fosfato potásico(0,5%), carbonato cálcico al (0,2%), glicerol (10%), Tª a 28°C, pH 6, t de conversión 72-76h.

Las bacterias suelen ser *Acetobacter suboxidans* (rendimiento de 97%) con *Acetobacter xilinum* el rendimiento es del 100%.

Si en lugar de ellas usamos *Gluconobacte melanógenus* (láctica) el t se reduce a 32h, necesita un medio enriquecido con O2, que aumenta la producción de 12,2 a 35 g/g biomasa.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO:

Principal/ para industria farmacéutica, vitamina C y para ind. de alimentos como antioxidante.

Es un proceso mixto porque algunos de los pasos son químicos y otros con uso de microorganismos. 2 procesos a nivel industrial y que usan glucosa como sustrato:

- Reducción de la glucosa a D-sorbitol (químico).

D-sorbitol a L-sorbosa (único paso llevado a cabo por microorganismos), los microorganismos que lo llevan a cabo son del gro *Acetobacter*. En fermentadores 20% de sorbitol y fuente de N extracto de levadura o líquido de maceración del maíz a 30-35°C de Temp. y en agitación (aerobiosis).

Es rentable ya que a partir de 2 Kg de glucosa obtengo 1 Kg de ácido. ascórbico.

D-sorbitol----- L-sorbosa

DH

- Otro proceso implica 2 microorganismos:

D-glucosa-----ác 2,5 diceto D-glucónico-----ác. 2 ceto L-gulónico----- vitamina C

Erwinia Corinebacterium químico

Para este paso se usa una bact recombinante de *Erwinia herbícola* aquí el enzima que pasa el ácido D-glucónico a ácido L-gulónico fue utilizado para crear una recombinante que lleva el proceso completo hasta L.gulónico.

PROCESOS DE LIXIVIACIÓN (no es un proceso orgánico)

Lixiviación es el proceso mediante el cual utilizando microorganismos se extraen

metales a partir de las rocas que los contiene (técnica alternativa a la extracción química de metales), se utiliza fundamentalmente para extraer de rocas con pequeña cantidad de metal. Sobre todo para extracción de Fe y Cu.

Los microorganismos utilizados pertenece al gro *Thiobacillus*, " varias sp por ej *T.ferrooxidans* (al más utilizado) y *T.thiooxidans*, son G porque obtiene C fijando CO₂ y energía por oxidac de metales.

Ejemplo con el Fe: Las bacterias lo que hacen es llevar a cabo la transformación de un compuesto insoluble (Fe) en una sal soluble. El metal se recupera luego a partir de la fase acuosa

$2\text{FeS}_2 + 7\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \text{-----} 2\text{FeSO}_4 + 2\text{H}_2\text{SO}_4$

insoluble soluble

" 3 procesos utilizados:

- Lixiviación en pendiente
- Lixiviación en pilas
- Lixiviación in situ

LIXIVIACIÓN EN PENDIENTE: el proceso comienza con el triturado fino de la roca en cuestión, se deja caer por la pendiente de una montaña a continuación se bombea agua a la superficie con © de *Thiobacillus ferrooxidans* a altas [], luego se recoge el H₂O que tendrá el metal disuelto.

LIXIVIACIÓN EN PILAS: muy similar, las rocas se pulverizan y se amontonan en pilas, se añade agua con alta [] de © sobre las pilas y luego se recoge el agua.

LIXIVIACIÓN IN SITU: se lleva a cabo directa/ sobre la roca que contiene el mineral (sin pulverizar) se perfora la roca (permeabilizandola) para que pase el agua, es el + barato pero de menor rendimiento.

TEMA

INSECTICIDAS MICROBIANOS

Sustancias producidas por microorg. que son letales para los insectos. A veces son los propios microorganismos los letales (virus). Se usan como control biológico de las plagas, alternativa a insecticidas

químicos, más antiguos. El problema es que los insectos se van haciendo resistentes a estos compuestos quim. Además los insecticidas químicos no son selectivos y matan tanto a plagas como a insectos beneficiosos, y tb son tóxicos para el hombre y otros animales. Ad+ son moléculas muy estables, permaneciendo largo tiempo en el medio.

HAY 2 TIPOS DE MICROORG USADOS EN INSECTICIDAS:

- **Bacterias del género *Bacillus*.**
- **Virus de la familia *Baculoviridae*.**

Dentro del género *Bacillus*, la sp ***B. Thuriensis*** es la + utilizada. Las primeras cepas utilizadas eran infectivas frente a lepidópteros, y luego aparecieron frente a coleópteros y dípteros.

Son específicos de hospedador y no son tóxicos para el hombre.

Una de las primeras cepas utilizadas se le llamó variedad *israelensis*, y se usó para el control de la malaria, ya que mata al mosquito vector. La 2ª cepa de utilidad que apareció fue la variedad *tenebrionis*, efectiva contra el escarabajo de la patata. La aparición de estas cepas dio pie a que se pudieran aislar diferentes tipos de cepas con diferente rango de hospedador. Así aparecieron muchas cepas diferenciadas como variedades de la misma especie:

Variedad *berlines*, efectiva contra lepidópteros.

israelensis, contra dípteros.

tenebrionis., contra coleópteros.

ceizawai, contra lepidópteros y dípteros.

Dakota no es tóxica para insectos, pero se usó para descubrir el mecanismo de acción de la toxina, comparándola con las otras.

Cuando se observó que **las cél. vegetativas de *B. thuriensis* no eran tóxicas para insectos pero sí lo eran las esporas**, se intentó buscar la causa de la acción tóxica de la espora, y durante la esporulación se observó que a la 7ª hora del comienzo de la esporulación la espora está en un extremo de la cél., y a partir de la 8ª h, en la cél. Aparecen **estructuras cristalinas** que crecen hasta ocupar el resto de la cél. Purificando y estudiando estas estructuras cristalinas se vio que eran la toxina, llamada **endotoxina**, y que en esos cuerpos cristalinos está en forma inactiva (protoxina). Cuando los insectos ingieren las estruct. cristalinas, estas se disuelven en el intestino medio y se libera la protoxina (inactiva). Después una proteasa la corta en trozos más pequeños (toxina).

La estructura cristalina se llama **cuerpo paraesporal**.

La toxina se une a recep. específicos de la mb., y se disponen varias moléculas de la toxina juntas, creando un **poro conductor de iones**, que hace entrar gran cantidad de iones y agua, que lisan la cél. y producen parálisis digestiva y muerte.

Estas toxinas son codificadas por los llamados **genes cry**, de los que hay hasta 4 tipos conocidos (I, II, III y IV), cada uno específico para un tipo de insecto:

- Tipo I contra lepidopteros.
- II y dípteros.

- III coleópteros.
- IV dípteros.

Cada cepa suele producir una toxina, pero hay otras + complejas que pueden sintetizar dos o más.

Hay cepas que tienen en las esporas un cristal piramidal formado por 2 prot. diferentes de distinto P.M. Son efectivas contra lepidópteros. Otras cepas tienen un cristal cúbico.

Los genes cry están en plásmidos y se pueden expresar, clonados, en otros organismos, por ejemplo vectores multicopia de *E. coli*. Cuando un gen de estos procede de una cepa que expresa una sólo toxina, por ej. Cry I, se puede expresar bien en *E. coli*, y en esta, forma inclusiones cristalinas, por tanto la capacidad de formarlas reside de por sí en los genes cry.

El caso de *B. thurigiensis* es diferente, **produce 4 toxinas**:

65 Kda (genes cry)

2 x (130 Kda)

27 Kda no relacionados con genes cry.

Si estas toxinas se clonan en *E. coli* producen una toxina menos activa, así que se piensa que todas las moléculas activas tienen efecto aditivo entre ellas. Esta variedad tiene – interés desde el punto de vista aplicado porque, a parte de esto, la toxina de 27 Kda es hemolítica, y tb contra humanos.

Se han seleccionado las cepas que producen una sólo toxina, y se usan cél. esporuladas y lisadas. Ya hay insectos resistentes, y su mecanismo de resistencia es por un cambio en el receptor.

Las cepas de *B. thurigiensis* han sido mejoradas en laboratorio mediante varias técnicas:

- **Curación? de los plásmidos:** se ha visto que las cepas contra lepidópteros y dípteros son + efectivas contra lepidópteros que las que son sólo contra lepidópteros. Entonces nos interesa que la cepa efectiva contra ambos lo sea sólo contra lepidópteros, consiguiendo + especificidad con alta efectividad. Lo que se hace es eliminar el plásmido que codifica la toxina contra dípteros, y a esto se le llama curación?, y se usa naranja de acridina y bromuro de etidio, que interfieren en la replicación de los plásmidos. Se seleccionan las cepas que han perdido los plásmidos. El problema es que estos compuestos hacen mutar tb al genoma, e interfieren en ambos plásmidos. Entonces se usa otra técnica. Se parte de una cepa con ambos plásmidos y se le dan varios pases en medio de cultivo. Al irse dividiendo las cél., ocurre que alguno de los 2 plásmidos hijos no pasa a las cél. hijas, entonces estas bacterias se pueden seleccionar. Hacen falta varios pases porque en general hay varias copias de los plásmidos por célula.
- **Técnicas de conjugación bacteriana:** se trata de conseguir cepas efectivas contra varios tipos de insecto (al revés que antes). Se usó contra plagas de la patata. Para llevar a cabo la conjugación nos interesan los plásmidos menores, más fácilmente transferibles.
- **Expresión de genes cry en hospedador distinto:** se ha seleccionado *E. coli* como hosp., y tb se ha conseguido en cianobacterias, que viven en amb. Acuáticos, y se podrían utilizar para controlar insectos cuyas larvas están en estos ambientes.

Además de *B. thurigiensis* (la + importante), tb *Bacillus sphaericus* y *B. popilliae* producen toxinas. La 1ª no cubre todas las especificidades, pero es una bact. interesante por vivir bien en medios acuáticos muy

contaminados, usándose para controlar poblaciones de insectos en estas aguas.

B. sphaericus se ha comprobado que produce 2 toxinas diferentes, ambas necesarias para ejercer función tóxica. Se le llama **toxina binaria**.

B. popilliae no produce toxinas, la acción insecticida es por la infección que sufre el insecto al ingerir la bact., la cual invade su sistema vascular. Una vez muertos pasan a esporas y son muy efectivos. Pero no se puede cultivar para producir las esporas como insecticida en fermentadores porque son patógenos obligados. (Aunque en Japón son muy guais y las cultivan en insectos para plantas ornamentales).

Familia *Baculoviridae* (baculovirus)

De los 1600 virus conocidos como insecticidas, el 60% son baculovirus. Son menos interesantes que *B. thuringiensis*.

Ventajas sobre los insecticidas químicos:

- Especificidad.
- No patógenos para vertebrados y plantas.

Morfológicamente se clasifican en 3 tipos:

- **NPV (poliédricos)**
- **GV (granulosos)**
- **Oryctes**

1 y 2 se diferencian de 3 porque sintetizan una proteína llamada poliedrina utilizada para formar agregados de viriones (ADN + cápsula + mb ext). Estos agregados son poliédricos en NPV y elipsoidales en GV.

NPV y GV infectan sólo a larvas, y los *Oryctes* tb a adultos.

La acción insecticida es consecuencia directa del ciclo infectivo del virus, que comienza con la ingestión por el insecto de los agregados (si son 1 y 2) o de los viriones (si es 3). Cuando estos llegan al intestino del insecto, si son agregados la poliedrina es disuelta por los jugos, liberando así las partículas víricas, que infectan 1º las cél. del epitelio intest. El genoma del virus es ADNbc, que comienza a replicarse en el núcleo de la cél. seis horas después de la infección. En este tiempo es posible ver ya nuevas partículas víricas, que después pasan a la hemolinfa, que las distribuye por distintos tej. El ciclo completo dura 4-6 días, y acaba con la muerte. Otro insecto se infecta por ingestión de los tej. muertos.

Estos insecticidas se usan contra plagas de las coles, del pino y los cocoteros.

Un problema es que son lentos matando al insecto, y otro, que los viriones libres se inactivan con luz UV (la poliedrina los protege), con lo que hay que fumigar siempre varias veces.

En laborat. se pueden hacer virus recombinantes, + rápidos matando.

En el ADNbc se ha conseguido insertar por ingeniería genética un gen de escorpión que codifica un neuropéptido muy potente capaz de paralizar al insecto, con lo que el insecto no muere tampoco a los 6 días, pero durante ese tiempo no come.

TEMA

VACUNAS

Junto con la producción de los antibióticos, es de las + importantes, sobre todo para países desarrollados. Tb se producen vacunas para animales.

- **Vacunas tradicionales:**

Se usan los microorg. patógenos atenuados. Dentro de estas vacunas podemos establecer 2 grandes grupos:

- **Con microorg. vivos (atenuados).**
- **muertos.**

También se pueden usar toxinas inactivadas (toxoides) del microorg.

Con microorg. vivos atenuados: si aislamos el microorg. del medio y lo cultivamos en laboratorio durante largo tiempo, frecuentemente pierde su virulencia y se atenúa, entonces puede usarse para fabricar vacunas. También se puede conseguir haciéndolos crecer en medios pobres, en los que se desarrollen mal.

Una vez que tenemos el microorg. atenuado, el proceso de obtención de vacunas varía según sean virus o bact.:

Si son bact. se crecen en fermentadores y se recogen para hacer la vacuna.

Si son virus, la multiplicación se hace en tejidos o en líneas celulares, y luego usamos las partículas víricas para hacer la vacuna.

Con microorg. muertos: simplemente hay que matarlos para hacer la vacuna.

- **Vacunas sintéticas:**

Se basan en obtener por tecnología del DNA recombinante moléculas que funcionen como Ag específicos de los patógenos.

A la hora de diseñarlas hay 2 pasos fundamentales:

- Buscar la molécula que pueda funcionar como Ag específico.
- Producir esa molécula en gran cantidad, generalmente expresándola en algún microorg. En general se prueba con *E. coli* y *S. Cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

Tb. Se le llaman vacunas subunidad por basarse en una sola moléc. del patógeno. La 1ª lograda fue la de la hepatitis B. Para obtener esta vacuna 1º se estudiaron todas las proteínas codificadas por el ADN viral, y se encontraron 4 proteínas:

P (polimerasa)

X (función desconocida. Se sintetiza en poca cantidad).

C (cápside)

S (mb externa que rodea a la cápside).

La seleccionada como Ag específico fue la **S**, y se trató de expresar en *E. coli* o en *S. Cerevisiae*. Se utilizó

Saccharomyces porque la prot. S está glicosilada, y *E. coli* no puede glicosilarlas. El sistema para expresarla consistía en clonarla en un plásmido, que se introdujo por transformación. Aun así se vio que no se glucosilaban correctamente, pero formaban entre sí agregados que eran como la envuelta del virus, y tras purificarlos se vio que funcionaban como vacuna de manera efectiva.

Otras vacunas fabricadas así no funcionaban tan bien. Puede ser por varias razones:

- La molécula usada como Ag no se expresaba bien en los microorg. usados.
- Aunque se expresen bien, no se pliegan bien, o no se glicosilan, etc. bien.

Cuando aparecen estos problemas lo que se hace es utilizar todos los hosp. posibles. En muchos casos, aun siendo capaz de expresar la prot. Ag, esta induce inmunidad muy débil y poco duradera. Esto ocurre porque el S.I. para generar respuesta fuerte necesita que el Ag vaya asociado a otra partícula (**adyuvante**). La vacuna de la hepatitis B funciona bien porque la prot. S funciona como Ag y al mismo tiempo se desensambla formando un soporte para el Ag.

La solución a este problema es utilizar un **vehículo transportador del Ag**. Los + utilizados son las propias partic. víricas. Algunos de estos vehículos son:

- Virus endógeno de *S. Cerevisiae*.
- *Poxvirus* (virus de la vacuna).

Los virus de *S. cerevisiae* se pueden llamar con diferentes nombres: Transposón Ty (saltan de un sitio a otro dentro del genoma), VLP (partículas similares a virus, y familia Totiviridae. Estos virus son fragmentos de ADN de 5,7 Kb, que contienen 2 genes: Ty A y Ty B, que integrados en el genoma de la levadura, se transcriben a mRNA, de los cuales algunos serán utilizados para obtener las partículas víricas, y otras moléculas de mRNA van a ser encapsidadas para formar el ác nucleico del virus. El Ty A forma la proteína P1, que forma la cápside, y Ty B da la prot. P3, de mayor tamaño, que se escinde dando 3 enz. (proteasa, T.I. y una integrasa). Todas estas prot. y algunos mRNA no traducidos, son encapsidados por P1, constituyendo la partícula inmadura del virus, que después sufre un proceso de maduración durante el cual la proteasa corta un trocito de cada uno de los monómeros de P1. Al mismo tiempo, la T.I. sintetiza un DNA a partir del mRNA. A continuación, las partículas se rompen y la integrasa inserta el DNA en alguna otra parte del genoma de la levadura.

Se pensó en utilizar la partícula vírica completa, y tb en expresar sólo el TyA, así se conseguirán partículas completas pero vacías. Para esto último se tomó el gen TyA y se expresó en *S. cerevisiae* por medio de un plásmido, en una cepa q no tenga ningún Ty en su genoma. Así se comprobó q, efectivamente, se podía usar sólo TyA como transportador. Ahora, para producir una vacuna recombinante, hay q fusionar el gen TyA y el gen q codifica la prot antigénica. Esto se clona en un plásmido q se introduce en *S. cerevisiae*. La fusión se expresa como una prot sólo, pero en cada monómero de los que forman la envuelta aparece insertada una prot antigénica..

El proceso es + complicado de lo q parece, xq debemos insetar el **Ag** en la fusión de forma q en las partículas **quede expuesto hacia fuera**.

Se triunfó al conocer la estructura 3ª de P1, xq conociéndola, se supo q había q insertar el Ag en las regiones D y P de la prot, q se sabe q son espículas q se expresan hacia el exterior.

Los Poxvirus se usaron mucho como vacuna de la viruela. Es un virus muy seguro, no perjudicial para humanos. Otra ventaja es su gran tamaño, como el de su genoma. Debemos partir el gen de la prot antigénica (entera o sólo el epítipo). El gen se clona en un plásmido de *E. coli* insertado en medio de un trozo de ácido nucleico del virus de la vacuna. El plásmido se replica en *E. coli* generando muchas copias.

Con el plásmido así construido, se inserta en una línea celular de mamíferos, q al mismo tiempo se infectan con el virus de la vacuna. A continuación ocurre la recombinación homóloga entre el ácido nucleico del virus de la vacuna y las regiones del plásmido q flanquean al Ag, q era del virus (vaya lío). Ahora tenemos integrado en el ácido nucleico del virus el gen de la prot antigénica. Ahora el virus se replica en las células y se encapsida, y las partículas completas salen del virus por lisis. Estas partículas son las que se usan como vacuna.

TEMA XY

APLICACIONES DE LA INTERACCIÓN MICROORGANISMOS – PLANTAS.

Pseudomonas syringae vive en la superficie de muchas plantas. Aunque no es patógena, debe invadir la planta para conseguir muchos de los nutrientes que necesita. **Muchas de sus cepas producen una proteína en su mb q hace que las plantas se congelen a mayor T de la normal.** Esto les beneficia xq así, en el proceso congelar–descongelar, se ablandan y las bacterias penetran mejor.

Esta prot es producida por un gen que se clonó en *E. coli*. **Se hicieron mutaciones en ese gen para que diera una prot inactiva.** Una vez modificado el gen de *E. coli*, se sustituyó el gen silvestre por el modificado en una cepa, y se le llamó ice – a esta cepa modificada (que no produce la prot de superficie). Cuando esta cepa se disemina en cultivos de fresas, las coloniza e incluso puede eliminar a la cepa silvestre, entonces **las plantas colonizadas son + resistentes a las heladas!!**

Especies del género *Rhizobium* son capaces de fijar N₂ gaseoso si viven en simbiosis con leguminosas. El N hay q añadirlo en fertilizantes siempre, xq por lo general no pueden fijarlo las plantas, y esto encarece el proceso (además de contaminar si se añade en exceso). Sólo las leguminosas pueden fijarlo. Se forman unos nódulos radicales, donde se produce la fijación del nitrógeno.

N₂ NITROGENASA NH₃

Este proceso debe ocurrir en anaerobiosis, xq la enz se inactiva en presencia de O₂. Esto tb le ocurre a *Clostridium*, q tb fija nitrógeno. Las cianobacterias tb fijan N, y viven en cadenas, en las cuales sólo algunas cel. (heterocistes) fijan N, y estas se rodean de amb. anóxico. No hacen por tanto, fotosíntesis.

Cómo se las arregla *Rhizobium* para proteger a su nitrogenasa del O₂: una vez q las bact forman esos nódulos, la bact da orden a las cel del nódulo para q sintetizen una prot llamada **leghemoglobina**, q se une al O₂ controlando los niveles de este elemento en el nódulo.

Las diferentes cepas de *Rhizobium* son muy específicas de cada planta. Esta especificidad depende de un grupo de genes (**genes nod**) q están en el **plásmido sym**. En función de esta especificidad clasificamos a las cepas de *Rhizobium* en 2 grupos: cepas específicas o efectivas y cepas no específicas o no efectivas.

No siempre q la bact infecta la leguminosa se produce fijación. A veces se forma un nódulo pequeño blanquecino, donde no hay fijación (cepa no efectiva para esa planta).

Pasos del proceso:

Reconocimiento de la planta y adhesión a pelos radicales: las células de *Rhizobium* son sensibles a compuestos flavonoides q la planta libera por la raíz, así detectan a la planta. Serían los compuestos inductores del proceso. El siguiente paso es la adhesión a los pelos radicales por prot de superficie q sintetizan tanto la bact como la planta. Una de estas proteínas se llama ricadesina (la produce la bact), y otras son las selectinas, capaces de unirse a carbohidratos.

Después de la adhesión, la bact comienza a producir factores nod y comienzan a rizarse los pelos radicales, atrapando a las bact en su interior. El siguiente paso es la invasión del pelo radical y las células adyacentes por parte de la bact. Después la planta, siguiendo órdenes de la bact, produce tubos de celulosa para q penetre la bact, q comienza a infestar células adyacentes.

Entonces las cél de la planta en esa zona se esa zona se multiplican activamente. Lo mismo las bact. Al final las bact se diferencian en unas estructuras llamadas bacterioides, q son varias bact rodeadas por una mb producida por la planta. Hasta q no se formen bacterioides, no comienza la fijación. El N es transformado en amoníaco, q pasa a N orgánico en las cél de las plantas.

El ciclo se cierra cuando la planta se muere, entonces los bacterioides pierden su capacidad de reproducirse, pero quedan otras bact q sí permanecen, nutriéndose de restos de la planta hasta q no encuentren otra.

El proceso de fijación depende de los genes NIF, q en algunas especies están en el plásmido Sym y en otras están en el cromosoma. Los genes NIF están todos juntos formando una agrupación de genes. Estos genes se consiguieron transferir a plantas no leguminosas, pero el proceso no funcionó, xq hacen falta tb los genes NOD, y ad⁺ xq el proceso consume mucho ATP y las pl no leguminosas no están adaptadas a esto.

En la actualidad lo q se busca es mejorar las cepas de *Rhizobium* para aumentar la tasa de fijación y cambiar la capacidad de infectar a un hospedador.

Los genes NIF están agrupados y su expresión se regula por una sólo proteína, y cambiando sus niveles de expresión, aumenta la tasa de fijación del N por una determinada bact.

Dentro de los genes NOD hay uno, el NOD D, q es el sensible a los flavonoides liberados por la planta. Los detecta y activa la transcripción del resto de genes nod para q comience la fijación. Este gen nod D se estudió, se secuenció y se descubrió q cambios puntuales en él pueden hacer q se cambie el hosp. Estas cepas obtenidas, sin embargo, no son capaces de colonizar cultivos en los q haya cepas salvajes.

***Agrobacterium tumefaciens*, patógeno de plantas, puede ser utilizado para crear plantas transgénicas.**

Es difícil introducir ADN en las pl, hay q sacarles la pared, y si se consigue introducir, es difícil q se integre. Las primeras transformaciones de plantas no fueron posibles hasta q se descubrió q esta bact era capaz de insertar un fragmento de ADN en alguno de los CR de la pl, originando un tumor vegetal. El tumor es irreversible aunque eliminenos la bact. *A. Tumefaciens* crea los tumores en el tallo, y *A. Rhizogenes* en la raíz.

Características de las cepas de *A. tumefaciens* q infectan las plantas:

- Poseen un plásmido (plásmido Ti) muy grande con 2 regiones muy importantes: región T-DNA, q es el frag de DNA q se insertará en alguna zona del CR; genes vir (de virulencia), responsable de la inserción en el CR.

En *A. rhizogenes* hay otro plásmido llamado Ri q es parecido.

Las cél de *A. tumefaciens* deben entrar en contacto con la pl en alguna zona del tallo en q haya una herida. Ahora las bacterias deben detectar alguna señal de q pueden infectar esas células, y una de esas señales son compuestos fenólicos, producidos por la pl, desencadenantes de la infección. Ahora se comienzan a transcribir los genes vir, como el vir A (prot de mb que se activa en contacto con comp fenólicos). Esta prot es una quinasa, q a continuación fosforila el producto del gen vir G, q está en el citoplasma, y así se activa. Esta prot activada funciona como activador de transcripción y es responsable de que comiencen a transcribirse el resto de genes vir. El siguiente gen q actúa es el vir G, q es una ER q va a cortar el plásmido Ti en 2 puntos, cortando la cadena de T-DNA, quedando libre en el citopl de la cél una cadena de DNA monocat. Al mismo

tiempo se vuelve a sintetizar una cadena complementaria en el plásmido Ti, para rellenarlo otra vez.

Después interviene la prot codif por vir E, q es una prot de unión a ácnucleicos, y varias moléculas de estas se unen a la hebra de T-DNA monocat de citopl., para mantenerla estirada y q pueda ser así transferida sin plegamientos a la cél.

Luego se activa vir B, q es un operón de 11 genes conocidos, q se encargan de transferir el T-DNA. Algunas prot de vir B atraviesan la mb de la bact formando un poro entre esta y la cél. vegetal, por el q penetra el T-DNA, y después forman una cad complementaria a él, y luego es llevado al núcleo, donde se integra al azar. Cuando se transcriben los genes del CR en los q está el T-DNA se forman los tumores. Alguno de estos genes son conocidos, y son responsables de la aparición de opinas (aa deriv de la Arg), y serán utilizadas por las cél de *A. tumefaciens* como fuente de C y N. Ad+, los genes de T-DNA codif enzs para la síntesis de hormonas de crecim veg., responsables de la formación del tumor.

Basándose en esta capacidad de *A. tumefaciens*, se han diseñado 2 tipos de técnicas q permiten introducir genes foráneos:

Método de los vectores híbridos:

Tenemos un gen de interés q queremos introducir en una pl. Este gen se clona inicial/ en un vector bacteriano de los q son capaces de replicarse en *E. coli*. Se usa el famoso vector pBR 322, q lleva este gen de interés y un ori C para *E. coli*, pero no para *A. tumefaciens*, y tb lleva un gen para resist a AB. Por otro lado tenemos q tener el plásmido Ti de *A. tumef.* modificado. La 1ª modificación consiste en alterar los oncogenes, y mantenemos intacta la región q lleva los genes vir. En este vector Ti, se corta en esta región del T-DNA e insertas en medio del T-DNA un trozo de DNA ed pBR 322. Entonces en este Ti modificado tendríamos:

(dibujito)

El plásmido vir así, lo tendríamos en una cél de *A. tumefaciens*, y en esta cél introducimos por transformación el vector de *E. coli* con el gen de interés, y a esas cél de *A. tumefaciens* las hacemos crecer en un medio de cultivo q lleve el AB para el cual lleva el gen de resistencia (como pBR 322 no se replica, sólo daría resistencia a la 1ª cél, no a su descendencia). En esta situación, tiene lugar una recombinación entre pBR 322 y la secuencia del plásmido Ti de pBR 322, y entonces tendremos un plásmido o vector híbrido entre los 2 anteriores, con los genes vir y el pBR 322 con el gen de interés flanqueado por el T-DNA. Entonces, en presencia del AB, sólo crecerán las cél q tengan el vector híbrido.

Ahora debemos hacer crecer las cél en medio con AB, y con ellas se infecta a la pl, y en este proceso, los genes vir q lleva el vector híbrido introducirán en algún CR de la pl el T-DNA con toda la sec del pBR 322, q lleva el gen de interés. Este método es el + utilizado.

Método binario:

Utiliza 2 plásmidos separados. La 1ª parte del proceso consiste en clonar la región T-DNA del plásmido Ti en un vector de *E. coli*, y además es un vector de los q llamamos bifuncionales, y lleva 2 orígenes de replicación, uno para *E. coli* y otro para *A. tumefaciens*, y además lleva un gen de resist a AB. Una vez q tenemos este plásmido, el siguiente paso consiste en insertar el gen dentro de este plásmido pero en medio de la región T-DNA.

Por otro lado, hay q manipular el otro vector, el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, eliminando por completo la región T-DNA y conservando los genes vir, y este vector Ti modificado lo tenemos dentro de *A. tumefaciens*. A continuación, mediante transformación, introducimos tb el vector con el gen de interés en las cel de *A. tumef.* Ahora seleccionamos las cel q tengan el gen de interés en un medio de cultivo con este AB.

Los genes vir q están en el plásmido Ti modificado van a ser capaces de transferir la región T-DNA del otro plásmido a alguno de los CR de la pl., integrándose también el gen de interés. (Esto es una versión simplificada, en realidad no se inserta sólo el gen de interés, sino q además en la parte anterior lleva un promotor fuerte q se expresa bien en pl. Uno de los + usados es el 35s, promotor del virus del mosaico de la coliflor. Ad+ del promotor, al final del gen debe ir una secuencia terminadora para asegurar q el mRNA se procese y poliadenile correctamente).

Estos sistemas con *A. tumefaciens* funcionan bien con dicotiledóneas, pero no con monocotiledóneas.

Para transformar monocotiledóneas se usan protoplastos y se incuban con PEG en presencia del ADN que queremos introducir en la pl., el cual se integrará en pl aún con menor eficiencia. Además, los protoplastos obtenidos hay q conseguir q regeneren la pared.

Reciente/ surgieron otros métodos en los q no se necesitan protoplastos, y se basan en la utilización de pistolas de genes, q disparan bolitas metálicas q han sido incubadas con el ADN q se quiere introducir en la pl. Aunque parezca mentira, a veces funciona y el ADN se integra.

Ejemplos de plantas transgénicas obtenidas:

La mayoría de experimentos son para obtener pl resistentes a microorg o a pesticidas y fungicidas. Una de los primeros experimentos fue introducir la luciferasa de la luciérnaga en la pl del tabaco (y la planta brillaba).

Otro ejemplo son las pl que expresan los genes cry, y se ha conseguido que se exprese bien en tomate y en tabaco. En algodón no se consiguió.

Plantas q expresan genes de resistencia a herbicidas, por ejemplo, el glifosato? inhibe una enzima de la ruta de los aa aromáticos, afectando a cualquier pl., pero se han encontrado bacterias cuyo enzima era resistente a glifosato. Introdujeron el gen en soja y algodón y estas pl se hacían resistentes.

Tb se han conseguido pl resistentes a virus cuando se consigue q las pl expresen prot de la cápside del virus. Se cree q es xq con la presencia de estas prot, los virus no se decapsidan en las cel., por lo q no pueden liberar su ADN. Se protegieron así calabazas contra el virus del mosaico de las calabazas.

En otros casos la transferencia se ha utilizado para mejorar las características de los frutos o de la pl. Así se han conseguido pl de tomate cuyo fruto no se reblandece tan pronto después de la maduración. Se hizo inhibiendo un gen de poligalacturonasa del tomate, q degrada la pared de pectina. Se hizo introduciendo el mismo gen de la galacturonasa pero invertido, así q cuando se transcribe, forma un mRNA antisentido, con sec complementaria a la del mRNA normal, entonces forman dúplex entre sí y no se pueden traducir, disminuyendo mucho los niveles de enz en las células.

TEMA

TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

AGUAS RESIDUALES:

Hay dos tipos fundamentales

- Alcantarillado doméstico: conocidas también como aguas negras.
- Efluentes de industrias.

Estas aguas deben de ser depuradas antes de ser vertidas, el tratamiento es en parte físico-químico y en parte

microbiológico.

Estos tratamientos se llevan a cabo siempre en plantas de tratamiento.

La composición de estos tipos de agua es principalmente gran cantidad de materia orgánica, que será eliminada por los microorganismos. La composición mas en particular dependerá de donde venga.

Cuando son efluentes de industria es frecuente que contengan compuestos tóxicos (de cianuro, metales pesados, etc.) que deben de ser eliminados del efluente antes de someter al efluente a depuración.

También contienen en ocasiones microorganismos patógenos , el tratamiento se lleva a cabo en 3 pasos:

- Tratamiento inicial
- Tratamiento secundario
- Tratamiento terciario

TRATAMIENTO INICIAL:

Es físico, se hace pasar a las aguas por rejillas o cribas para eliminar trozos sólidos de gran tamaño. A continuación estas aguas se dejan sedimentar varias horas obteniéndose una fase sólida (cieno) y otra líquida. En estas condiciones, las aguas se someten a tratamiento 2ª que es fundamentalmente biológico. A veces termina aquí. En plantas más completas se hace tratamiento 3ª para eliminar nutrientes inorgánicos (nitratos y fosfatos) que son físico-químicos (precipitación y filtración de las aguas.

TRATAMIENTO SECUNDARIO:

CIENO: proceso anóxico de reacciones de digestión y fermentación llevadas a cabo por diferentes especies de bacterias que ya están en el cieno (tienen marcado carácter fermentativo y de producción de enzimas extracelulares como proteasas y lipasas que degradan la materia orgánica a los monómeros más simples), se llevan a cabo en recipientes cerrados de grandes dimensiones llamados digestores de cieno, en ellos, los microorganismos de las aguas comienzan a degradar las macromoléculas a monómeros y a continuación estos monómeros serán transformados en acetato, H₂ y CO₂ y seguidamente las bacterias metanógenas (mas importantes *Methanococcus*, *Methanosarcina* y *Methanobacterium*) transforman acetato, H₂ y CO₂ en metano y CO₂ dejando así las aguas libres de materia orgánica. Este metano se puede quemar o reciclarse como fuente de energía.

SOBRENADANTE: recibirá tratamientos aerobios y puede ser de varias formas:

- Filtración por goteo.
- Activación del cieno

Filtración por goteo: Consiste en hacer pasar el sobrenadante a través de columnas de 2 m de diámetro y que se rellenan con roca pulverizada y a medida que pasa por esas columnas, los microorganismos que hay en el sobrenadante se van fijando a los fragmentos de roca a los que se fija también la materia orgánica la cual van a ir oxidando. Los microorganismos que aparecen en estas columnas serán oxidativos de varios géneros: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Zooglea*, son todos gram negativos. En menos proporción pueden aparecer bacterias gram positivas como *Corynebacterias* y también algunos géneros de hongos como el género *Trichosporum* y *Geotrichum*. También pueden estar presentes algunos protozoos, que se alimentan de esas bacterias y hongos, esto es importante por que así impide que se vaya acumulando la materia orgánica.

Como productos de este proceso habrá: CO₂, NH₃, sulfatos, nitratos y fosfatos, considerándose ya así el agua apta para verter al medio, aunque sería mejor un tratamiento 3ª por su cantidad de compuestos inorgánicos.

Activación del cieno: la más frecuente, el sobrenadante se transfiere primero a un tanque de aireación, en el que se introduce O₂ por la parte inferior y al mismo tiempo se agita el agua. En estas condiciones se mantiene 15 h. Durante este tiempo se desarrollan los microorganismos antes mencionados. Va a ser muy importante aquí Zooglea ramígera, que produce polisacaridos extracelulares, haciendo que las células de microorganismos queden agrupadas por el polisacárido y además también quedan agrupados con otros microorganismos y gran parte de la materia orgánica del sobrenadante. Así se forman agregados de gran tamaño que sedimentan por peso. A continuación todo el contenido del tanque es transferido a un 2º tanque llamado tanque de sedimentación, en el cual todos los agregados llamados <<flóculos>> o <<zoogreas>> sedimentarán. Entonces, el sobrenadante que quede estará prácticamente libre de materia orgánica, pero no por que toda haya sido degradada sino por que gran parte ha quedado atrapada en los flóculos. Ahora el sobrenadante puede ser vertido al medio y con los flóculos se hacen dos cosas: Una parte se devuelve al tanque de aireación, en el cual entrará nueva agua a tratar. El resto de sedimento va a ser transferido al digestor de cieno, donde acaba de degradarse la materia orgánica hasta metano y CO₂.

Las aguas podían ser vertidas o sufrir trat 3ª, pero si van a ser para consumo humano, además sufrirán un tratamiento de potabilización (porque puede haber microorganismos patógenos y aun queda algo de materia orgánica) que va destinado a eliminar los microorganismos, la turbidez del agua, los olores y los sabores.

El primer paso de la potabilización consiste también en dejarla sedimentar para evitar la presencia de arcillas, etc. por el bombeo entre tanques. El siguiente es la coagulación, tratamiento químico en el que se añaden compuestos de Fe o Al, que son floculantes y en los flóculos que se forman quedan atrapados microorganismos y restos de materia orgánica.

Después se hace pasar el agua a través de filtros de arena, de manera que una vez filtrada, habremos eliminado más del 99% de los microorganismos del agua.

El último paso es la cloración del agua, para convertirla en agua potable, en la cual el cloro, en cantidad suficiente y en 30 min. puede eliminar los microorganismos que queden. El cloro también puede oxidar restos de materia orgánica eliminando así olores y sabores. El cloro suele añadirse como hipoclorito sódico o cálcico y a veces como gas. La cantidad de cloro que hay que añadir será variable según el tipo de agua y los restos de materia orgánica que lleve el agua, esto se hace de forma empírica y lo que se hace es analizar cuanto cloro residual queda después del tratamiento, sólo deben quedar 0,2–0,6 g/ml.