



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO Y GLICEROL SOBRE LA DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *STREPTOMYCES CLAVULIGERUS*.

Nathalia Gómez, Claudia Sánchez, Juan C. Quintero y Rigoberto Ríos.
Universidad de Antioquia (Departamento de Ingeniería Química), Medellín, Colombia, A.A. 1226.
natgogri@gmail.com.

Palabras clave: Producción de biomasa, fosfato, glicerol.

Introducción.

La bacteria filamentososa, *Streptomyces clavuligerus* (Sc), fue aislada por primera vez en muestras de suelos de sur América, por su gran interés comercial, ya que produce al menos 21 metabolitos secundarios [1], incluyendo diversos antibióticos betalactámicos [2, 3]. Entre sus metabolitos de interés se ha encontrado el ácido clavulánico (AC), un potente inhibidor de las enzimas betalactamasas que le confieren resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas [1, 4]. Dada su importancia a nivel industrial se han estudiado diversas estrategias para mejorar la producción de AC, entre los que se destacan la estandarización del inóculo [5], el control de la tasa de crecimiento, la prolongación de la fase estacionaria [6] y el efecto de la concentración de las fuentes de nitrógeno (FN), fósforo (FP) y carbono (FC), respectivamente, en un medio químicamente definido [7, 8, 9]. Estudios previos [8] han demostrado que la máxima producción de AC, es obtenido bajo la limitación de FP. La limitación en la concentración de FP en un intervalo de 0,3 a 300 mM (0,04 a 4 g/L) generalmente promueve el crecimiento celular; concentraciones menores de 10 mM muestran un incremento en la producción de AC [2].

Diversos estudios sobre la producción del AC muestran que el glicerol (con rendimientos de 12,5 g de X/L.h [10]) y algunos aceites vegetales (con rendimientos de 37,5 g de X/L.h son considerados como la mejor fuente de carbono [11, 12, 13]. En Colombia dada la ley 939/2004 se ha tenido que trabajar en obtención de combustibles alternativos como el biodiesel, proceso en el cual se obtiene como subproducto económico el glicerol en un 40% de la producción de biodiesel (cantidad aproximada de 5000 ton/año) [14], lo que hace interesante poder aprovechar el glicerol como sustrato.

Este trabajo tiene como objetivo el estudio del efecto de los nutrientes de fósforo y glicerol, en un medio de cultivo que permita favorecer la producción de biomasa, como etapa preliminar al establecimiento de las mejores condiciones de síntesis del AC.

Metodología. La cepa utilizada fue Sc ATCC 27064, suministrada por INBIOTEC (Universidad de León, España). El inóculo fue preparado a partir de una

suspensión micelar (almacenada a -80°C), la cual se activó en medio TSB a 220 rpm, 28°C por 48 h. Para todos los cultivos empleados en el estudio del efecto de las fuentes de fósforo y carbono, se usó un volumen de inóculo del 10%.

Posteriormente, se empleó el siguiente medio de cultivo (g/L): glicerol **A** (FC), NH_4Cl 7, KH_2PO_4 **B** (FP), MOPS 21 [10]. El pH del medio se ajustó a 6,8 antes de la fermentación y se autoclavó a 121°C por 15 min. Después de la esterilización, el medio se suplementó con una solución de sales, previamente esterilizada por filtración (10mL/L de medio) que contiene (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5; CuCl_2 0,053; CoCl_2 0,055; CaCl_2 1,042; ZnCl_2 1,04; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,98; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,035 [13]. Los niveles de FP fueron (B = 0,1; 0,6; 0,8 y 3,5; g/L según el caso), y de la FC fueron, (A= 20, 40 y 60 g/L).

La biomasa se determinó por peso seco [15]. El glicerol y el fosfato presentes en el filtrado, fueron determinados por métodos colorimétricos en un espectrofotómetro [3, 16, 17].

Resultados.

En la figura 1 se presentan los resultados del crecimiento microbiano y consumo de FP, bajo 60 g/L de FC a concentraciones de 0,1 y 3,5 g/L de la FP. Se observa que bajo condiciones de suficiencia de fosfato, la producción de biomasa es mucho mayor que a condiciones de limitación, alcanzándose más de 2 g/L. En estos ensayos no se observó producción de AC, debido posiblemente a una alta concentración de FC que tiene efecto inhibitorio.

Para eliminar el efecto inhibitorio de la alta concentración de la FC se evaluó en tres diferentes concentraciones, manteniendo fija en 3,5 g/L la concentración de la FP; sus resultados se muestran en la Figura 2 y la tabla 1. Se observa que a una concentración de 20 g/L de FC, la velocidad de producción de biomasa durante las primeras 50 horas es mayor, aunque la máxima producción de biomasa obtenida a esta concentración, es menor que la obtenida a una concentración de 60 g/L de FC.



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

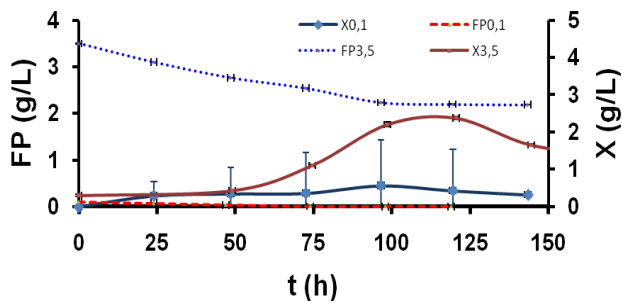


Fig. 1 Efecto de la concentración de fosfato sobre el crecimiento de *Sc* (X0,1: Biomasa a 0,1 g/L de FP; X3,5: Biomasa a 3,5 g/L de FP), en cultivo en lote y FC (glicerol) 60 g/L.

En estos ensayos no se encontró producción de AC, posiblemente porque está se da a una mayor limitación de FP.

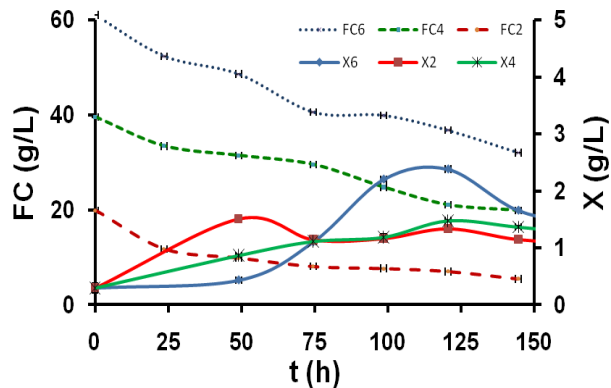


Fig. 2 Efecto de la concentración de glicerol sobre el crecimiento de *Sc*, en cultivo en lote: FP (KH_2PO_4) 3,5 g/L y glicerol 20 (FC2), 40 (FC4), 60 (FC6) g/L. (X6: Biomasa a FC6; X4: Biomasa a FC4; X2: Biomasa a FC2)

Tabla 1. Influencia de la concentración inicial de glicerol en cultivo de *Streptomyces clavuligerus*.

Concentración inicial de gly (g/L)	Producción de biomasa (g/L)	Velocidad de crecimiento, μ (h^{-1})*
60	2,5	0,009
40	1,5	0,017
20	1,5	0,030

*La velocidad de crecimiento específica fue medida durante las primeras 50 horas de cultivo.

Eliminando el posible efecto inhibitorio por una alta concentración de la FC y aprovechando la velocidad de producción de biomasa a una concentración de 20 g/L en FC, se evaluó disminuir estequiométricamente la concentración de la FP (1,17 g/L) y la FN (2,33 g/L) de manera que la FC se mantiene fija en 20 g/L; a esta concentración de nutrientes en el medio se evaluó adicionalmente 2 diferentes concentraciones de la FP (0,6 y 0,8 g/L). Los resultados se presentan en la figura 3 y en la tabla 2.

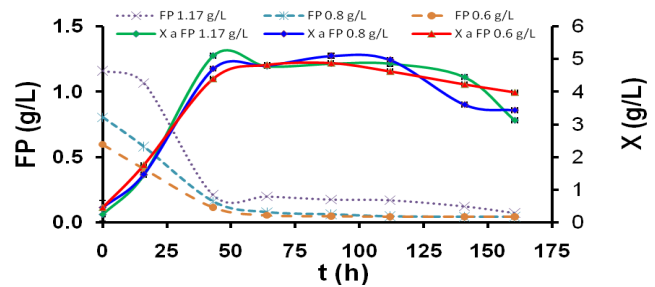


Fig. 3 Efecto de la concentración de fosfato sobre el crecimiento de *Sc*, en cultivo en lote: FC (glicerol) 20 g/L; FP (KH_2PO_4) 1,17, 0,8 y 0,6 g/L.

Tabla 2. Influencia de la concentración inicial de fosfato en cultivo de *Sc*.

Concentración inicial de PO_4^- (g/L)	Producción de biomasa (g/L)	Velocidad de crecimiento, μ (h^{-1})
1,17	5,1	0,055
0,8	5,1	0,057
0,6	4,9	0,055

En este caso, no hay mucha diferencia entre estos tres últimos ensayos; se obtuvo una mayor producción de biomasa y la velocidad de producción de las primeras 50 horas, es mucho mayor que la que se presenta en el medio a las condiciones de 60 g/L de FC, 7 g/L de FN y 3,5 g/L de FP. En la figura 3, el consumo de fosfato se mantiene muy limitado en la idiofase, lo cual es interesante para la producción de AC. La cinética con una concentración inicial de fosfato entre 1,17 a 0,6 g/L, puede ofrecer como ventajas, una corta fase de adaptación, buena producción de biomasa y un tiempo corto de experimentación.

El medio con el que se logró una mayor producción de biomasa, con una concentración baja de FP es en g/L: glicerol 20, NH_4Cl 2,33 y KH_2PO_4 0,6-1,17 (limitado en fuente de fósforo-FP).

Conclusiones.

En un medio limitado en FP (1,17 a 0,6 g/L), se observó una producción de biomasa de 4,9 g/L, logrando disminuir el tiempo de la fase de adaptación del microorganismo, el tiempo de experimentación y una velocidad específica de crecimiento de $0,055 \text{ h}^{-1}$, lo cual favorece la producción de AC.

Agradecimiento.

Agradecimientos al Departamento Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación por su apoyo al proyecto 1115-452-21185 "Modelado metabólico de la producción de ácido clavulánico por fermentación de *Streptomyces clavuligerus*" y a la Corporación Académica Ambiental de la Universidad de Antioquia.



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



Bibliografía.

1. Reading C. y Cole M. 1977. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*. Vol. 11:852-857.
2. Hopwood D.A. 1981. *Cambridge University Press*, Vol. 31: 187-218.
3. Saudagar Parag S. y Singhal Rekha S. 2007 *Bioresource Technology*. Vol. 98: 2010-2017.
4. Reading C. y Cole M. 1977. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*. Vol. 11:852-857.
5. Swartz M.N. 1997. *The new England Journal of Medicine*. No. 7. Vol. 337:491-492.
6. Neves A.,Vieira, L. y Menezes J. 2001. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 72: 628-633.
7. Bushell M. E. 1988. *Biotechnology of the Actinomycetales*. Pág: 185-215.
8. Ives Paul R. y Bushell Michael E. 1997. *Microbiology. - Great Britain*, Vol. 143:3573-3579.
9. Kirk Samantha, Avignone-Rossa Claudio A. y Bushell Michael E. 2000. *Biotechnology Letters*. Vol. 22: 1803-1809.
10. Bushell Michael E. et Al. 2006. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 39: 149-157.
11. Chen Kuo-Cheng et Al. 2003. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 32: 152-156.
12. Townsend C.A. y Ho M. F. 1985. *Journal American Chemical Society*. Vol. 107: 1066-1068.
13. Stirling I. y Elson S. W. 1979. *Journal Antibiotics*. Vol. 32: 1125-1129.
14. Efthimiou G., Thumser A.E. y Avognone-Rossa Claudio A. 2008. *Journal of applied Microbiology*. Vol. 105: 2058-2064.
15. Cardenas, D. P. et Al. 2006. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*. Vol. 35: 120-137
16. Lynch, H.C. y Yang, Y. 2004. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 34: 48-54.
17. Hae Bok Song y Demain Arnold L. 1977 *Analytical biochemistry*. Vol. 81:18-20.
18. Chen P.S., Toribara T.Y. y Warner Huber. 1956 *Analytical Chemistry*. Vol. 28: 1756-1758.