

2ej 164

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



MECANISMOS DE REGULACION EN LA
PRODUCCION ERITROMICINA POR
Streptomyces erythreus

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A

JORGE ROMERO GARCIA

1 9 8 1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

PAG.

1.	INTRODUCCION	1
1.1	Generalidades	
1.1.1.	Definición y Características de los antibióticos.	
1.1.2.	Estructura química de los antibióticos.	
1.1.3.	Biosíntesis de los antibióticos.	
1.1.4.	Regulación genética de la biosíntesis de los anti-- bióticos.	
1.2.	Revisión bibliografica sobre la eritromicina	
1.2.1.	Generalidades.	
1.2.2.	Estructura química de las eritromicinas.	
1.2.3.	Propiedades fisicoquímicas de las eritromicinas	
1.2.4.	Biosíntesis de las eritromicinas	
1.2.5.	Factores que afectan la producción de eritromicina.	
1.2.5.1.	Fuente de carbono.	
1.2.5.2.	Fuente de Nitrógeno.	
1.2.5.3.	Efecto de los fosfatos.	
1.2.5.4.	Efecto de la concentración de oxígeno disuelto	
1.3.	Objetivos.	
2.	MATERIALES Y METODOS	44
2.1.	Organismo	
2.2.1.	Equipo	
2.2.2.	Reactivos y materias primas.	
2.3.	Medios y condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de eritromicina por <u>Streptomyces erythreus</u> .	
2.3.1.	Medios de cultivo.	
2.3.2.	Condiciones de crecimiento.	
2.4.	Determinación de los parámetros de la fermentación	
2.4.1.	Determinación de eritromicina.	
2.4.2.	Determinación de la concentración de azúcares totales	
2.4.3.	Determinación de biomasa	
2.4.4.	Determinación de pH.	
2.5.	Prueba de medios de cultivo para el crecimiento y pro ducción de eritromicina por <u>Streptomyces erythreus</u> .	
2.6.	Efecto del fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina por <u>Streptomyces erythreus</u> .	
2.7.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por <u>Streptomyces eryth- reus</u> .	

2.8	Determinacion de la evaporación del medio de cultivo fermentativo III, utilizado en el crecimiento y producción de eritromicina por <u>S. erythreus</u>	
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	53
3.1.	Prueba de medios de cultivo para el crecimiento y producción de eritromicina <u>S. erythreus</u> .	
3.2.	Efecto del fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina por <u>S. erythreus</u> .	
3.3.	Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de eritromicina por <u>S. erythreus</u> .	
3.4.	Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por <u>S. erythreus</u> .	
3.5.	Evaporación del medio de cultivo fermentativo III.	
4.	CONCLUSIONES	103
5.	APENDICE A	105
5.1.	Tratamiento de las muestras para la determinación de los parámetros de la fermentación.	
5.1.1.	Determinacion de eritromicina en el caldo de fermentación.	
5.1.2.	Determinación de azúcares totales en el caldo de fermentación.	
6.	BIBLIOGRAFIA.....	110

1. INTRODUCCION

1.1. Generalidades

1.1.1 Definición y características de los antibióticos.

La palabra antibiótico fue empleada por primera vez - en 1942, por Waksman, quién la definió de la siguiente manera:

"Un antibiótico es una sustancia químicamente definida producida por los microorganismos y que en soluciones diluídas tiene la propiedad de inhibir el crecimiento o aún de destruir las bacterias u otros microorganismos in vivo o in vitro"- (Simón y Meunier 1970). En esta definición no se contempla el origen metabólico ni la función del organismo productor. A los antibióticos se les puede definir con mayor precisión como productos del metabolismo secundario de los organismos vivos, con una acción indidental en concentraciones bajas, sobre el proceso de crecimiento de otros organismos (Zähner, H. 1978). Los antibióticos son típicamente el producto de vías metabólicas secundarias y poco extensas; generalmente son sintetizados y excretados por los organismos productores cuando el cultivo ha alcanzado la fase estacionaria (en cultivo batch), y en cantidades relativamente pequeñas. El rendimiento calculado en términos de fuente de carbono y energía es bajo, y esta influenciado por la naturaleza del medio y condiciones de cultivo. De aquí surge el problema de establecer las condiciones ambientales óptimas para

la producción de antibióticos.

La genética es una de las herramientas que con mayor frecuencia se emplea en la selección de cepas con altos rendimientos en la producción de antibióticos. El flujo de carbono a través de las rutas metabólicas para la producción de estos compuestos puede ser incrementada por medio de manipulación genética, sin embargo una combinación de la selección genética y la modificación de las condiciones de crecimiento, pueden llevar a incrementar varias veces el rendimiento inicial, obteniéndose en algunos casos, una fracción significativa de sustrato convertido a producto. Este hecho puede ejemplificarse en la producción de la penicilina por Penicillium chrysogenum; a partir de una cepa silvestre de este microorganismo con un rendimiento aproximado de 0.1 g/l de penicilina, se aisló un mutante con capacidad de producir 8 g/l del metabolito indicado (Stainer y Adelberg 1976).

Los organismos utilizados en la producción industrial son aerobios, por lo cual deben ser desarrollados en presencia de aire. El proceso de producción es frecuentemente referido en la literatura técnica como "fermentación", de aquí que sea de gran importancia una aireación adecuada para el crecimiento y producción del antibiótico deseado. Entre los principales grupos de organismos conocidos que presentan capacidad de producir antibióticos se encuentran los hongos, los actinomicetes, las

bacterias y de estas últimas principalmente las bacterias que--
forman esporas; en la actualidad se han encontrado otros grupos
de organismos que tienen la propiedad de producir antibióticos,
entre los que se encuentran algunos de ambientes marinos (tabla
1.1.1.1. (Faulkner, D.J. 1978).

1.1.2 Estructura química de los antibióticos.

En cuanto a su estructura química se refiere, los anti-
bióticos son un grupo muy heterógeno, están constituidos por
una amplia variedad de compuestos orgánicos; tales como anillos
aromáticos, lactonas, aminoácidos, oligopéptidos, etc. La figu-
ra 1.1.2.1., ejemplifica la estructura de algunos antibióticos-
comúnmente usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas.
En ella se ilustra la gran diversidad de clases químicas presen-
tes en este grupo de metabolitos secundarios.

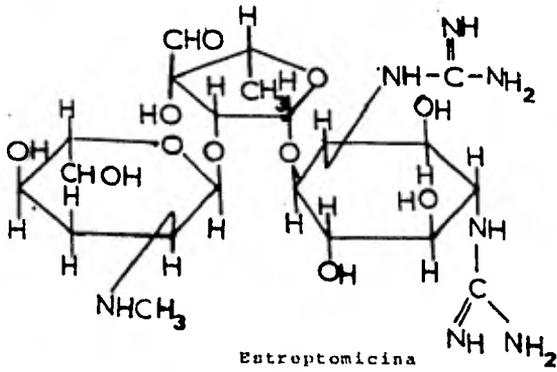
1.1.3. Biosíntesis de los antibióticos.

La biosíntesis de los antibióticos, para algunos ca--
sos poco conocida en detalle, se inicia con la asimilación de -
los nutrientes del medio de cultivo por el organismo productor-
y termina con la formación y excreción del producto elaborado.-
En la figura 1.1.3.1., se representa en forma esquemática algu-
nas de las principales rutas metabólicas que participan en la -
formación de un antibiótico. En ella se observa la siguiente se

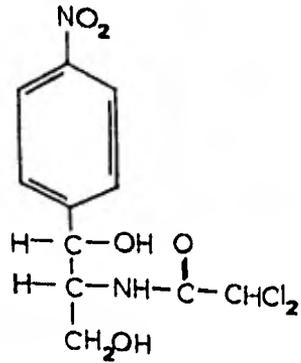
TABLA 1.1.1.1. PRINCIPALES ORGANISMOS CONOCIDOS COMO PRODUCTORES DE ANTIBIÓTICOS.

Grupo taxonómico	Organismo	Antibiótico
Fungi	<u>Penicillium notatum</u>	penicilina
	<u>Penicillium griseofulvum</u>	griseofulvina
	<u>Aspergillus fumigatus</u>	fumagilina
	<u>Fusidium sp.</u>	ácido fusídico
	<u>Cephalosporium sp.</u>	cefalosporina C
Actinomycetales	<u>Streptomyces</u>	actinomicina
		anfotericina
		bleomicina
		carcinofilina
		cloramfenicol
		cromomicina
		eritromicina
		Kanamicina
		mitomicina
		neomicina
		novobiocina
		nistatina
	(diferentes especies)	paromicina
	rifamicina	
	sarcomicina	
	espiramicina	
	estreptomina	
	tetraciclinas	
	tricomicina	
	viomicina	
	<u>Micromonosporas</u>	gentamicina
	<u>Nocardia</u>	ristocetina
		vancomicina.
Eubacteriales	<u>Bacillus brevis</u>	gramicidina
	<u>Bacillus clauseni</u>	colistina
	<u>Bacillus linchiformis</u>	bacitracina
	<u>Bacillus polymixa</u>	polimicina
Porifera	<u>Verongia archeri</u>	3,5-Dibromo- 4-Hidroxi fenilace tamida.
	<u>Dysidea herbacea</u>	2-(2,4-Dibromofeno xi)-3,4, 5-Tribro- mofenol y 2- (4-Bro mofenoxil)-3 -Bromofenol.
Coelenterata	<u>Pseudoplexaura porosa</u>	acetato de crasni na.
	<u>Pseudoplexaura flagellata</u>	
	<u>Pseudoplexaura wagonari</u>	

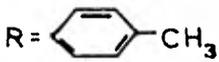
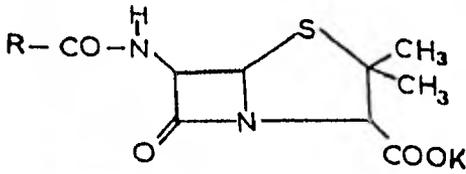
Figura 1.1.2.1. Estructura de alguns antibióticos.



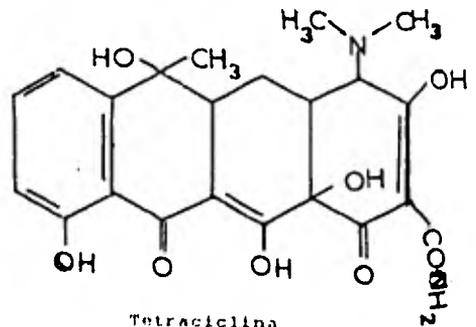
Estreptomicina



Cloramfenicol



Bencilpenicilina potássica



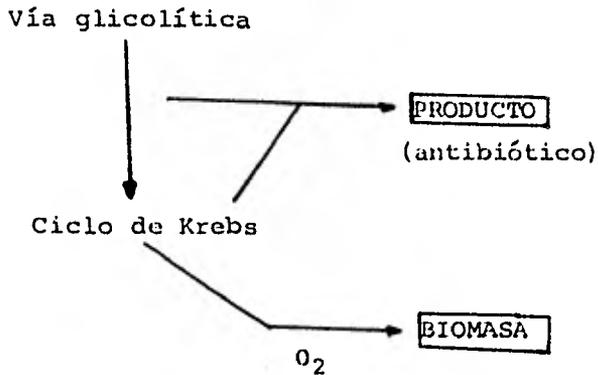
Tetraciclina

cuencia: asimilación de los nutrientes por la célula, conversión a metabolitos de las rutas centrales del metabolismo (por ejemplo vía glicolítica, ciclo de Krebs, ruta de las hexosas, etc.)- y ramificaciones en una vía peculiar al antibiótico después de - cierto número de pasos del metabolismo primario.

Figura 1.1.3.1. Representación esquemática del proceso de la -- biosíntesis de antibióticos.

TOMA DE NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

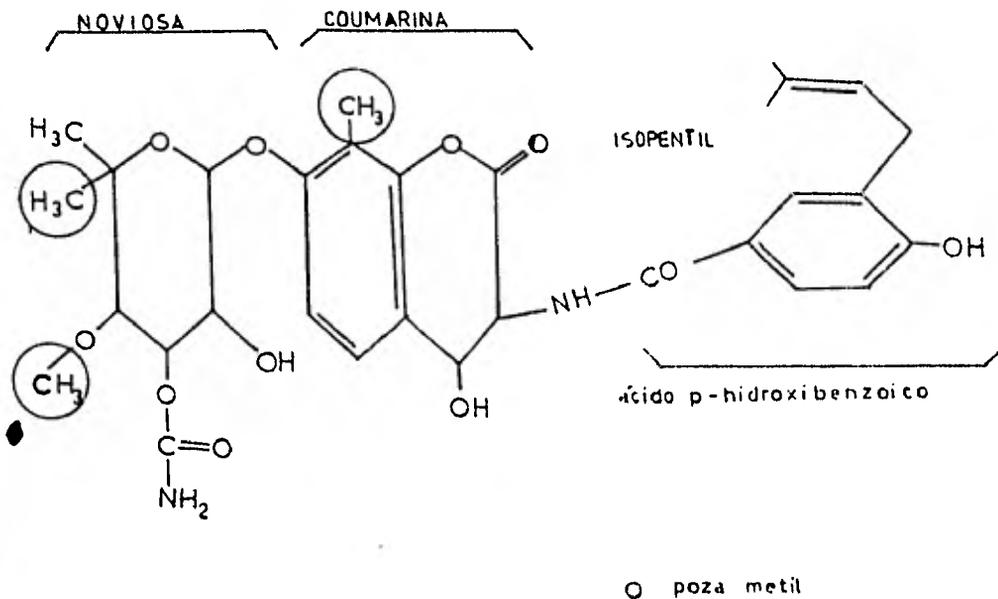
(Fuente de nitrógeno, carbono, fósforo, sales minerales).



En la biosíntesis de algunos antibióticos participan más de una ruta del metabolismo primario; tal es el caso de la novobiocina (Figura 1.1.3.2.), en la síntesis de este antibióti

co participa: la poza CH_3 , metabolismo del nitrógeno, de los C_5H_8 hidratos, de los aminoácidos aromáticos, del isopentil y del ácido shikímico (poza CH_3 , grupos metil proveniente de diferente origen metabólico).

Figura 1.1.3.2. Estructura química de la novobiocina. Se indican las fuentes del metabolismo primario.



Se ha encontrado que las vías metabólicas que conducen a la síntesis de los antibióticos están interconectadas con las vías metabólicas que llevan a la formación de metabolitos primarios; como es el caso del cloramfenicol y la penicilina (Zähner y Mass 1972). Una gran mayoría de antibióticos son producto del metabolismo secundario, el cual se define teóricamente bajo los criterios que a continuación se presentan:

a).- Se encuentran en un grupo sistemáticamente definido de organismos (familia, género, especie).

b).- Se puede observar una extensa variedad de compuestos pertenecientes a diferentes grupos químicos.

c).- Estrictamente hablando ninguna función biológica se ha reconocido en los metabolitos secundarios, aunque se han propuesto distintas hipótesis para explicar su papel en la naturaleza (Zahner, et al. 1978).

Las siguientes vías del metabolismo primario se han -- identificado como precursoras de la biosíntesis de metabolitos-- secundarios.

Metabolismo de ácidos grasos (acetato y propioato).

Metabolismo de aminoácidos

Metabolismo de carbohidratos

Metabolismo de purinas y pirimidinas

Biosíntesis aromática (ácido shikímico)

Grupos metilo provenientes de la poza CH_3

La participación de ácidos grasos de cadena corta como precursores de la biosíntesis de ciertos antibióticos, ocurre -- por condensaciones sucesivas de unidades activadas de acetato, - malonato o propionato (como ésteres de la CoA). Esto conduce a - la formación de cadenas β -policétónicas; se ha demostrado que-- dicha formación acontece por condensaciones cabeza-cola, en don-- de la reacción se inicia con una molécula de acetil-CoA (en al-- gunos casos propionil-CoA) al condensarse con una molécula de ma-- lonil-CoA, perdiéndose una molécula de CO_2 . Las sustancias que - son biosintéticamente derivados de policetonas se les conoce co-- mo policétidos (figura 1.1.3.3.). Los intermediarios β -policetó-- nicos sufren una serie de modificaciones. Por ejemplo, cuando és-- tos son reducidos se forman los ácidos grasos; dicha reacción es poco frecuente en las síntesis de antibióticos, en otra reacción la introducción de dobles y triples enlaces trae consigo la for-- mación de polienos y poliacetilenos. Las lactonas cuyo peso mole-- cular varía entre 400 y 500 se forman mediante una sola cicliza-- ción de un intermediario β -policetónico, en tanto que los com-- puestos poliaromáticos se sintetizan mediante sucesivas cicliza-- ciones.

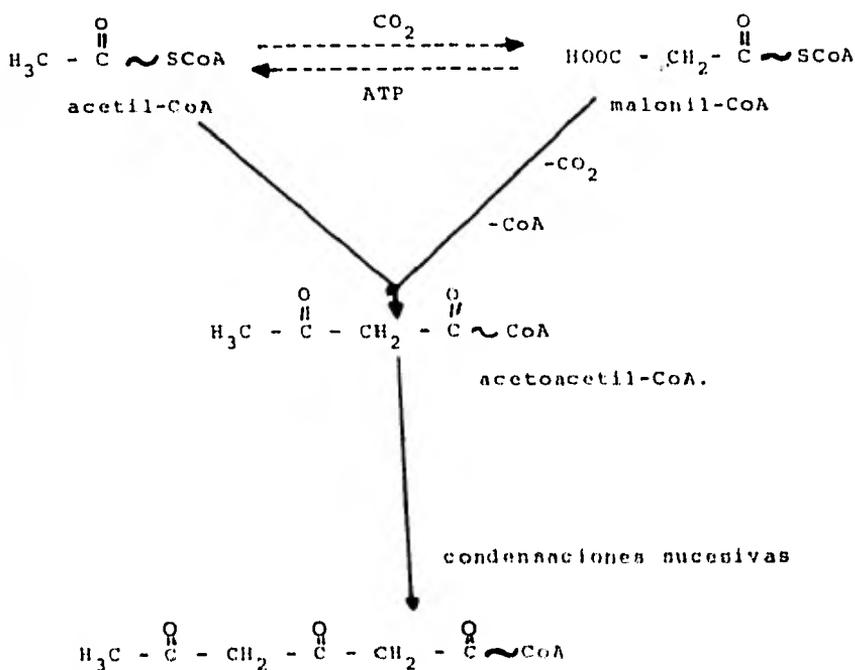
El metabolismo de los aminoácidos participa en la forma-- ción de los antibióticos peptídicos, siendo en algunos casos los-- únicos constituyentes, mientras que en otros los aminoácidos es-- tan unidos a metabolitos tales como los azúcares y ácidos grasos.

Los aminoácidos que forman a los antibióticos peptídicos pueden ser aminoácidos N, β -aminoácidos, iminoácidos y precursores de aminoácidos como la ornitina y el ácido α -aminoadípico.

Los azúcares son otros de los constituyentes comúnmente encontrados en los antibióticos, algunos de estos azúcares son aminados y al parecer el esqueleto de carbono proviene del metabolismo de la glucosa.

Se conoce que gran número de antibióticos son análogos de los ribósidos de purinas como es el caso de la psicofuránina nebularina, tubercidina y toyocamicina (Zähner y Mass 1972).

Figura 1.1.3.3. Esquema de la síntesis de policétidos.



1.1.4. Regulación genética de la biosíntesis de los antibióticos.

La información genética para la biosíntesis de los antibióticos en los organismos productores, está codificada en la molécula de DNA y solo se manifiesta bajo ciertas condiciones ambientales que permiten su expresión.

En el esquema mas general de transferencia de información genética, se establece que el DNA es transcrito a mRNA, el cual a su vez es traducido en los ribosomas donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Sin embargo los mecanismos de control y regulación, así como las señales que llevan a la expresión selectiva de las capacidades genéticas son poco conocidos-especialmente en organismos eucariontes. La información genética contenida en el DNA que codifica para la síntesis de los antibióticos puede ser controlada a tres diferentes niveles: Transcripción, traducción y postraducción, por una serie de efectores intracelulares que ejercen señales regulatorias en respuesta a condiciones fisicoquímicas y ambientales como se indica en la figura 1.1.3.4.

La regulación de las vías metabólicas que llevan a la síntesis de antibióticos, puede darse en alguno de los siguientes niveles.

i).- Mecanismos involucrados en las vías biosintéti-

cas específicas para la formación de metabolitos secundarios.

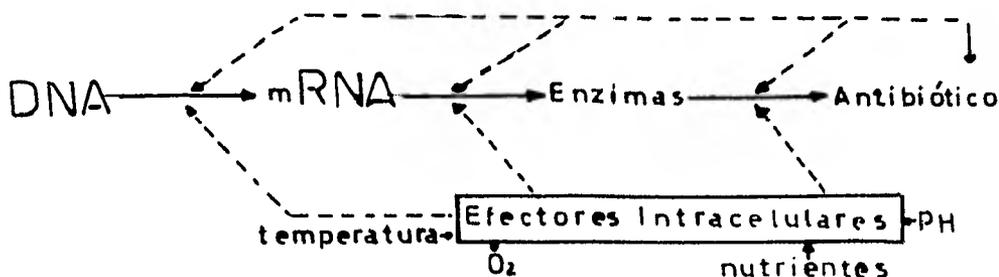
ii).- Mecanismos que controlan la formación de precursores intermediarios de los antibióticos.

iii).- Mecanismos que regulan el metabolismo energético de la célula.

Dentro del primer tipo de mecanismo, la regulación -- por producto final es un control bastante conocido en la biosíntesis de metabolitos primarios. El papel que juega este control en la regulación de metabolitos secundarios no es aún lo suficientemente claro, debido a que en muchos casos no son conocidos los intermediarios, ni las enzimas que participan en la formación del antibiótico; sin embargo en los ejemplos conocidos -- en donde ha sido posible establecer una ruta metabólica, se hace evidente la participación de este control, tal es el caso -- del cloramfenicol (citado por Martín, J.F. 1978), en el cual la arilamina sintetasa, primera enzima en la ruta biosintética de este antibiótico y que cataliza la conversión del ácido corísmico a p-aminofenilalanina, es reprimida por el cloramfenicol -- mismo.

La regulación por retroalimentación de la síntesis de antibióticos por metabolitos primarios, es uno de los mecanismos que controlan la formación de precursores intermediarios de los antibióticos. Un ejemplo de este mecanismo se encuentra representado

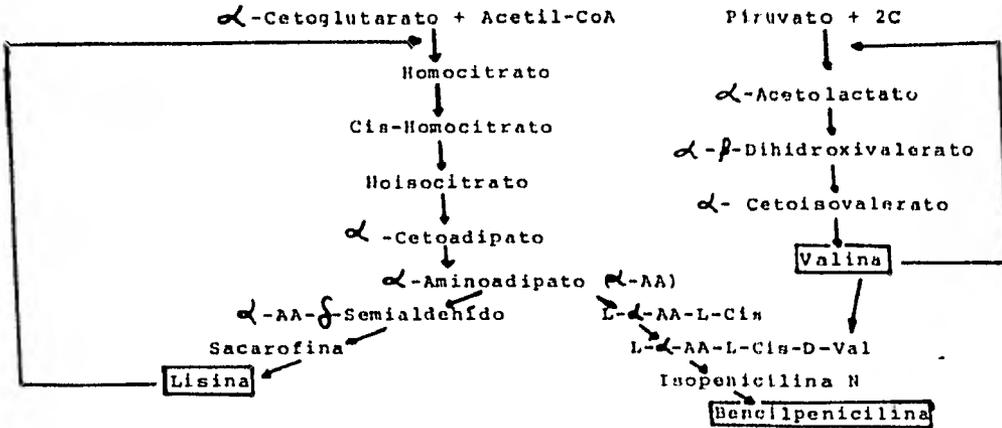
Figura 1.1.3.4. Factores que afectan el control y expresión de la información genética codificada en el DNA - para la síntesis de antibióticos.



tado en la figura 1.1.3.5., en donde se observa la biosíntesis de la penicilina. La valina precursor de la bencilpenicilina, -- inhibe a la acetohidroxiácido sintetasa, primera enzima en la -- vía biosintética de este aminoácido (Goulden y Chattaway. 1969). En esta figura se muestra también que la lisina inhibe a la pri-- mera enzima de la ruta metabólica que lleva a la formación del- α -Aminoadipato (α -AA), punto de ramificación para la sínte-- sis de lisina y L- α -AA-L-Cistina, precursor intermediario de- la bencilpenicilina (citado por Martín, J.F. 1978).

En la regulación del metabolismo energético total de- la célula, la represión catabólica juega un papel muy importan- te. Está puede efectuarse por la fuente de carbono, nitrógeno u- otros componentes presentes en el medio de cultivo. La repre- -

Figura 1.1.3.5. Inhibición de la biosíntesis de la penicilina por valina y lisina.



ción catabólica por fuente de carbono es un fenómeno que ha sido estudiado con cierto detalle en el metabolismo primario. La presencia de este mecanismo se ha demostrado en la biosíntesis de muchos antibióticos, los cuales son inhibidos o reprimidos por fuentes de carbono que son fácilmente asimilables, tales como la glucosa o el citrato. En la tabla 1.1.3.1., se indican algunos antibióticos que son inhibidos por glucosa. La regulación catabólica por fuente de nitrógeno es un mecanismo muy similar a la regulación por carbono, ya que controla la utilización de las fuentes de nitrógeno por la célula. No existen estudios específicos sobre la regulación por nitrógeno en la síntesis de antibióticos, sin embargo un reporte interesante hecho por Martín y McDaniel sugiere la presencia de este mecanismo. En este estudio

encontraron que la adición de harina de soya produce un incremento instantáneo en la respiración y un decremento en la velocidad de síntesis de candicidina y candihexina (citado por Martín, J.F. 1978).

1.2 Revisión bibliografica sobre la eritromicina.

1.2. Generalidades.

Las eritromicinas son un grupo de antibióticos, producidos industrialmente a través de procesos de fermentación. Su descubrimiento fue reportado por McGuire et al., en 1952. Junto con las metilmicinas, carbomicinas y otros, forman parte del grupo antibióticos conocidos como macrólidos, grupo heterógeno cu-

Tabla 1.1.3.1. Ejemplos de inhibición por glucosa en la biosíntesis de algunos antibióticos.

ANTIBIOTICO	REFERENCIA
Actinomicina	Gallo y Katz (1972)
Bacitracina	Haavik (1974)
Cloramfenicol	Smith y Hinman (1963)
Kanamicina	Basak y Majumdar (1973)
Puromicina	Sankaran y Pogell (1975)
Candacidina	Martín y McDaniel (1974)

ya característica en común es la presencia de un anillo lactona-macrocíclico (Grisebach, H. 1978).

La eritromicina es uno de los antibióticos que con mayor seguridad con prescritos debido a la rara presencia de casos de alergia a nivel hepático (Glasby, S.J. 1978). Estos antibióticos son altamente efectivos contra muchos organismos Gram-positivos y algunos Gram-negativos. Una sensibilidad moderada es presentada por Memophilus sp. Los bacilos coliformes Gram-negativos bacilos entéricos, micobacterias y hongos patógenos, así como -- las levaduras, protozoarios y células de animales superiores son altamente resistentes a este antibiótico. Se usa principalmente en el tratamiento de infecciones ocasionadas por estreptococos -- (grupo A-beta hemolítico), pneumococos y estafilococos. En la -- tabla 1.2.1., se ilustran ejemplos representativos del espectro-antimicrobiano junto con las concentraciones inhibitorias de eritromicina (Oleinick, N.J. 1975).

La eritromicina actúa generalmente como bacteriostático sin embargo a concentraciones de 25 - 1000 veces mayor puede ser bactericida (Lutz, et al., 1957).

La acción bacteriostática de la eritromicina es el resultado de la capacidad de inhibir selectivamente la síntesis de las proteínas de las bacterias sensibles, no actuando así en los tejidos de las células de los mamíferos. La inhibición de síntesis de proteínas se efectúa mediante el enlace de la molécula de

Tabla 1.2.1. Sensibilidad que por la eritromicina presentan algunas bacterias.

Microorganismo	Concentración inhibitoria (mg/ml)
Gram-positivos	
<u>Streptococcus</u> grupo A	0.01 - 0.1
<u>Streptococcus</u> grupo B	0.2
<u>Streptococcus</u> grupo D	0.2 - 6.3
<u>Pneumococcus</u> Sp.	0.02 - 0.05
<u>Staphylococcus</u> <u>albus</u>	1.6
<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	0.4
<u>Sarcina</u> <u>lutea</u>	0.02
<u>Bacillus</u> <u>cereus</u>	0.4
<u>Bacillus</u> <u>subtilis</u>	0.1 - 2.0
<u>Clostridium</u> <u>sp</u>	0.1 - 2.0
<u>Corynebacterium</u> <u>diphtherae</u>	0.01 - 0.1
<u>Actinomyces</u> <u>israeli</u>	0.1
<u>Mycobacterium</u> <u>kansasii</u>	0.5 - 2.0
Gram-negativos	
<u>Neisseria</u> <u>meningitides</u>	0.1 - 0.4
<u>Hemophilus</u> <u>influenzae</u>	0.8 - 12.5
<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	100
<u>Aerobacter</u> <u>aerogenes</u>	100 - 200
<u>Klebsiella</u> <u>pneumoniae</u>	200
<u>Salmonella</u> <u>salinatis</u>	200
<u>Pseudomonas</u> <u>aureginosa</u>	200

eritromicina a la subunidad 50 S de los ribosomas de las bacterias sensibles. El análisis de enlace ribosómico de la eritromicina muestra que una molécula de eritromicina se une a una subunidad 50 S hasta llegar a la saturación; se ha encontrado que otras moléculas adicionales se pueden enlazar superficialmente a altas concentraciones del antibiótico pero indudablemente no tienen ninguna relación con la acción biológica. En condiciones de equilibrio, el enlazamiento del complejo ribosoma-eritromicina no sigue un comportamiento lineal, lo cual sugiere una interacción compleja (Oleinick, NL. 1975). Para algunos microorganismos se han encontrado las constantes de afinidad del antibiótico hacia los ribosomas: para B. subtilis es de 2.8×10^{-7} M --- (Oleinick y Corcoran. 1969). y $2.8 - 4.7 \times 10^{-5}$ M para S. aureus (Mao y Putterman 1969). La inhibición ejercida por la eritromicina a nivel de ribosomas, ocurre posterior a los siguientes pasos: activación de los aminoácidos y transferencia de éstos al tRNA. Sin embargo no se sabe con certeza cual de las reacciones enzimáticas es bloqueada a nivel de elongación de la cadena polipeptídica. Algunas evidencias sugieren que la reacción catalizada por la peptidil transferasa es el blanco primario, - mientras otras favorecen la reacción de translocación que promueve la transferencia del peptidil-tRNA del sitio ribosómico - aceptor al sitio donador en la unidad 50 S del ribosoma (citado por Tanaka, S. et al., 1973). La eritromicina y otros antibió-

ticos del grupo de los macrólidos interfieren con el enlazamiento del cloramfenicol a los ribosomas de B. megaterium y E. coli; sugiriendo un sitio común de enlazamiento. En presencia de cloramfenicol el enlace de la eritromicina a los ribosomas, no es evitado (Oleinick, N.L. et al 1968). Las partes funcionales de la molécula de eritromicina involucradas en la interacción con los ribosomas han sido determinadas por estudios en los cuales, varios macrólidos y análogos interfieren con el enlace de la eritromicina marcada radiactivamente. En estos estudios se ha encontrado que ambos azúcares son indispensables para el funcionamiento del antibiótico. Cuando la molécula de eritromicina posee los dos azúcares, tiene mayor facilidad de enlace; sin embargo se observa cierta capacidad de enlazarse cuando contiene únicamente un azúcar. Otros grupos funcionales importantes para la formación de complejos son los grupos hidroxil 11, 12 y 9; los grupos 2-hidroxil y 3-dimetilamino sobre la desosamina y el grupo 3-metoxi en la cladinosa (Oleinick N.L. 1975).

1.2.2. Estructura química de las eritromicinas.

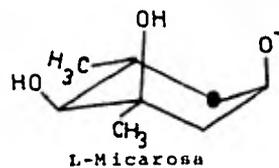
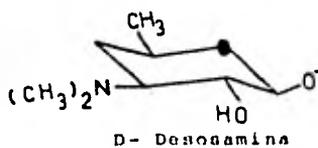
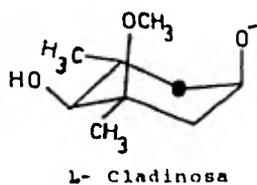
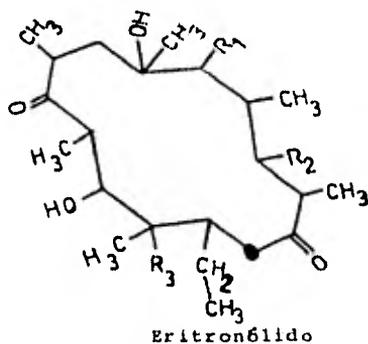
Las eritromicinas son un grupo de antibióticos elaborados por cepas de Streptomyces erythreus; estructuralmente este grupo de antibióticos se encuentran relacionados, presentando como característica en común, la parte aglicona (eritronólido) de la molécula; el cual es un anillo lactónico macrocíclico de-

14 átomos, altamente sustituido. En la naturaleza se presentan cuatro tipos de eritromicinas: A, B, C y D. (Figura 1.2.2.1). - La eritromicina A es la forma más común y ampliamente usada tanto en la investigación como en la práctica clínica por presentar mayor actividad antimicrobiana (Martín, J.R. et al 1970).- La eritromicina A presenta un grupo hidroxil en el carbono 12 del anillo eritronólido, la eritromicina B carece de este grupo, la eritromicina C tiene la misma aglicona que la eritromicina A, - pero tiene como glicosido la L-micarosa (sin grupo metil en - - C-3') en lugar de cladinosa. La eritromicina D Poseé la lactona de la eritromicina B y los azúcares de la eritromicina C. Los - azúcares que forman parte de la molécula son de dos tipos: un a minoazúcar que es la desosamina y un azúcar neutral que puede - ser la cladinosa o la micarosa. Estos azúcares se encuentran -- unidos al eritronólido (anillo lactónico de la eritromicina) por medio de enlaces glicosídicos (Grisebach, H. 1978 y Corcoran, - J.W. 1974).

1.2.3 Propiedades fisicoquímicas de las eritromicinas.

La eritromicina es una sustancia básica ligeramente so luble en agua y lábil en medio ácido, con un pKa de 8.6 proporcionado por el grupo amino de la desosamina. En clínica cuando se aplica en forma oral se administra como ésteres capaces de - resistir la acidez estomacal. (Oleinick, N.L. 1975).

Figura 1.2.2.1. Estructura química de las eritromicinas.



	R ₁	R ₂	R ₃
Eritromicina A	desosamina	cladinosa	OH
Eritromicina B	desosamina	cladinosa	H
Eritromicina C	desosamina	micarosa	OH
Eritromicina D	desosamina	micarosa	H

La eritromicina es un compuesto que forma cristales incoloros en CHCl_3 o $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$. La eritromicina A es un compuesto que tiene una rotación específica de $[\alpha]_D^{25} -73.5^\circ$ (CH_3OH) y $[\alpha]_D^{25} -78^\circ$ (61.99, EtOH) los cristales funden a 136 - 140 °C. Para las otras eritromicinas el punto de fusión varía como se ve en la tabla 1.2.2.1. (Glasby, S.J. 1978).

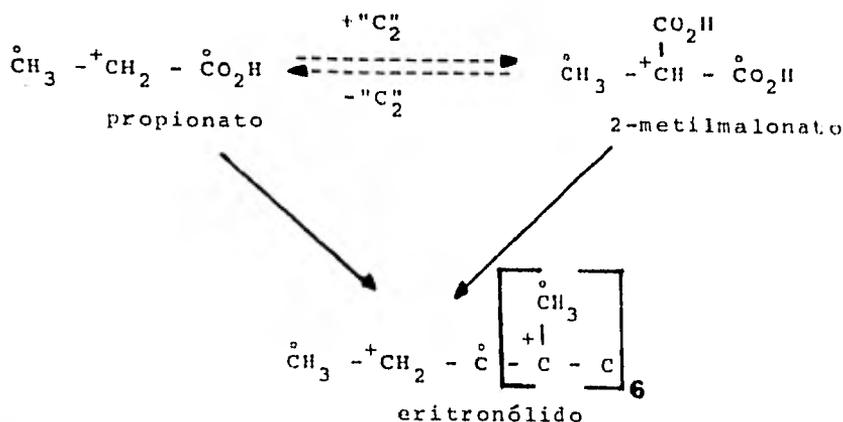
Tabla 1.2.2.1 Puntos de fusión y fórmula condensada de las eritromicinas.

Eritromicina	Puntos de fusión	Fórmula condensada
A	136-140 °C	$\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{O}_{13}\text{N}$
B	191-195 °C (202-203 °C)	$\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{O}_{12}\text{N}$
C	121-125 °C	$\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{O}_{13}\text{N}$

1.2.4. Biosíntesis de las eritromicinas.

Como se discutió anteriormente la molécula de las eritromicinas están constituidas por dos partes; el eritronólido (anillo lactónico) y los azúcares (neutral y aminoazúcar). Los estudios bioquímicos sobre la biosíntesis de azúcares de macrólidos son escasos. Por otro lado se sabe que la biosíntesis de los antibióticos macrólidos se inicia con la formación del anillo lactona seguido de la adición de secuencias de los azúcares --

Figura 1.2.4.2. Modelo de incorporación al eritronólido de --- propionato y 2-metilmalonato, marcados radiactivamente.



lulas de Streptomyces erythreus como lo indica Friedman et al., 1964). La formación del eritronólido por S. erythreus no se conoce muy bien, pero se cree que ocurre de una manera similar a la formación de ácidos grasos, no obstante que se presentan marcadas diferencias entre los ácidos grasos (por ejemplo ácido -- palmítico) y el anillo lactona de las eritromicinas (Corcoran, J.W. 1974). Para poder entender el mecanismo hipotético de la formación del eritronólido, antes describiremos brevemente lo que se conoce acerca de la biosíntesis de los ácidos grasos.

La biosíntesis de los ácidos grasos se inicia con la activación del acetato y malonato por la coenzima A, para formar

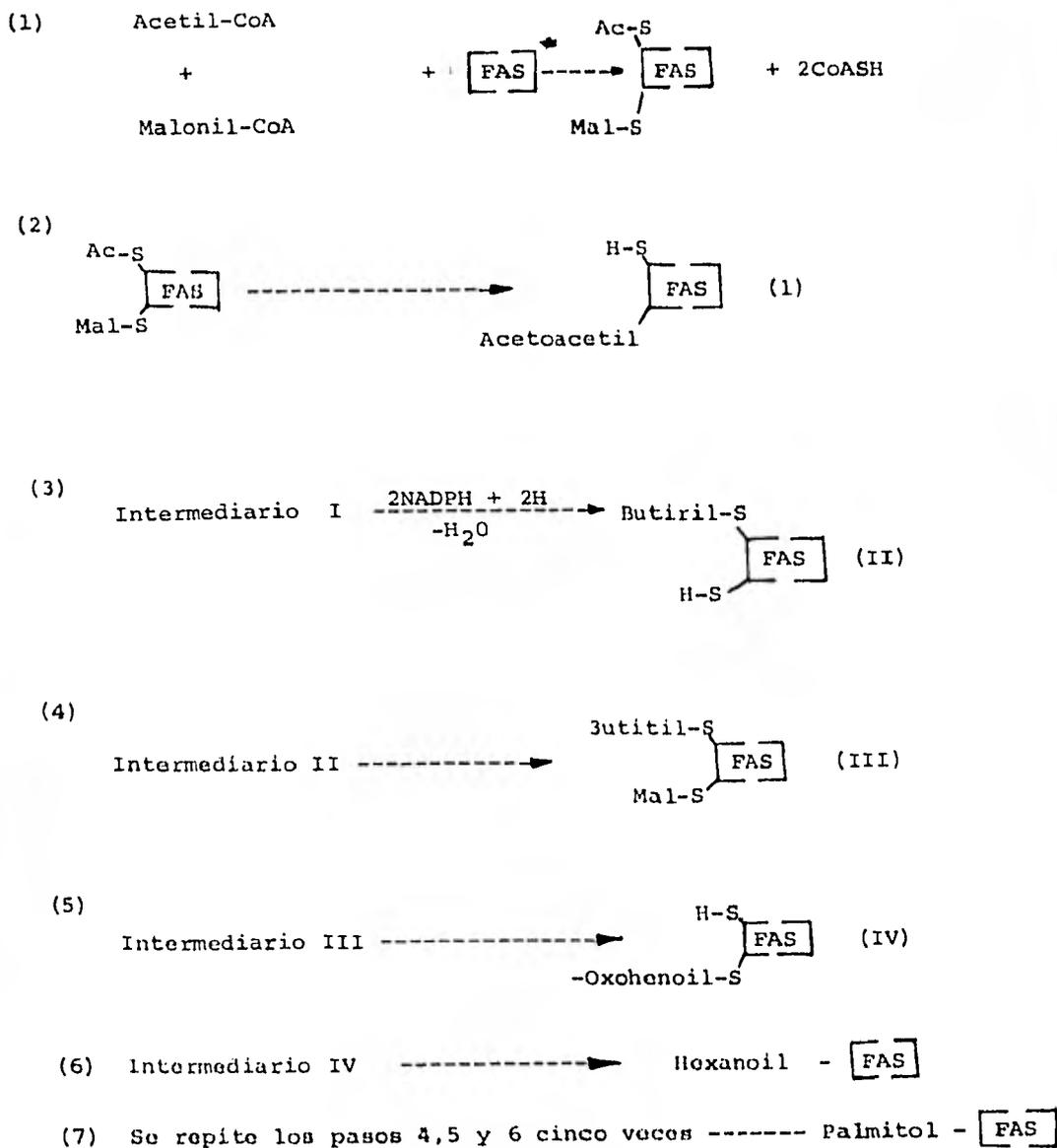
los ésteres de la misma. Después de este primer paso la reacción de los ácidos grasos ocurre en una secuencia de seis pasos sucesivos catalizados por seis enzimas del S.S.F.A. (sistema sintetasa de los ácidos grasos). En la figura 1.2.4.3. se presenta sin detalles la formación del palmitato. En la figura se encuentra que en la formación de los ácidos grasos ocurren reacciones, de condensación, reducción y deshidratación.

El sistema de síntesis de los ácidos grasos se puede encontrar en dos formas, dependiendo del organismo de que se trate; en la primera forma las enzimas son independientes y de bajo peso molecular, la otra forma lo constituye un complejo multienzimático de elevado peso molecular (2 millones de daltones).

El primer tipo de sistema enzimático es típico de bacterias en tanto que el segundo es característico de los organismos superiores como hongos, levaduras y protozoarios. Para Streptomyces erythreus, se tiene evidencias indirectas de la presencia de este último sistema, sugiriendo una relación evolutiva más cercana con los organismos superiores (citado por Corcoran, J.W. 1974).

En la figura 1.2.4.4., se presenta el esquema hipotético para la formación del eritronólido. Asumiendo que el sistema enzimático puede utilizar el 2-metilmalonato en el paso catalizado por la enzima condensante y a partir de aquí ocurrir una

Figura 1.2.4.3. Mecanismo de formación del palmitato.



* [FAS] = Sistema sintetasa de ácidos grasos.

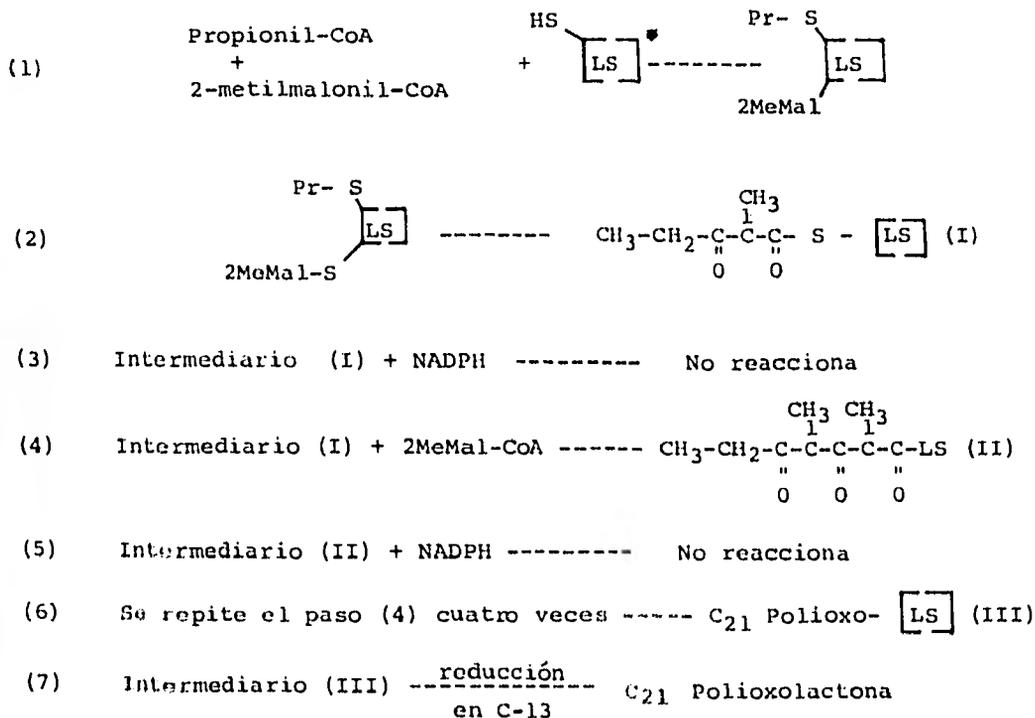
serie de reacciones similares a la formación de los ácidos grasos.

Una diferencia notable en relación a la síntesis de ácidos grasos, es que en la biosíntesis del eritronólido, la enzima que condensa la eliminación de los grupos β -cetona no es acoplado en cada ciclo de elongación; de hecho la formación de la molécula del eritronólido se debe suponer como un proceso en el cual ninguna de las cetonas es eliminada hasta antes de la lactonización (Corcoran, J.W. 1974).

La biosíntesis del eritronólido se ha relacionado con la formación de otros productos naturales, entre los que se encuentran aquellos formados por la vía o ruta policétida. No se han obtenido intermediarios libres de estos compuestos, ya que se han encontrado enlazados a las enzimas que los forman, por lo que no existen estudios enzimológicos de su síntesis. En estudios preliminares sobre la enzimología comparativa en la biogénesis del eritronólido y palmitato por S. erythreus, se encontró que en un sistema libre de micelio, parcialmente purificado por precipitación fraccional con sulfato de amonio; la proteína precipitada a una concentración de sulfato de amonio entre 60 y 90% de saturación, tenía la capacidad de formar ácidos grasos a partir de acetil y malonil-CoA y la síntesis dependía de ambos. El producto de la síntesis fue identificado como una mezcla en la cual el ácido palmítico predominaba; en algunos casos en que la-

acetil-CoA fue sustituida por propionil CoA, hubo también formación de ácidos grasos pero presumiblemente con una longitud de cadena poco usual. Esta fracción de proteína parcialmente purificada fue también capaz de formar moléculas naturales a partir de propionil-CoA y 2-metilmalonil-CoA. Estos compuestos fueron examinados por métodos cromatográficos encontrándose varias sustancias, una de las más interesantes fue muy similar al 6-deoxieritronólico B, conocido como precursor (libre de azúcares) de las lactonas. Sin embargo se observaron ligeras diferencias en movilidad cromatográfica entre los dos compuestos (Corcoran, J.W. 1973).

Figura 1.2.4.4. Modelo hipotético de la formación del eritronólido.



* $\boxed{\text{LS}}$ = sistema sintetasa de la lactona.

Hasta aquí no existen evidencias concluyentes sobre el mecanismo de la formación del eritronólido, por lo que se requiere una mayor profundización en el estudio de los sistemas enzimáticos correspondientes, así como la identificación de los productos formados a partir de propionil y 2-metilmalonil CoA.

La secuencia de reacciones en la formación del eritronólido a las eritromicinas, ha sido obtenida mediante diferentes trabajos; utilizando mutantes bloqueados en distintas etapas de la síntesis del antibiótico. Tardew y Nyman en 1964 (citado por -- Grisebach, H. 1978) aislaron el eritronólido B de cepas de S. erythreus, mutadas en sitios de la vía metabólica, anteriores al de la formación de las eritromicinas. El eritronólido B marcado con C^{14} (obtenido de fermentaciones con $l-C^{14}$ -propionato), fue incubado durante 24 horas con el micelio lavado de S. erythreus. El análisis del caldo de fermentación presenta la conversión del -- eritronólido B marcado con C^{14} a eritromicina A, B y C en altos rendimientos (88 a 95% de radioactividad), lo cual indica que -- el eritronólido B es un intermediario obligatorio en la biosíntesis de las eritromicinas (Hung, et al. 1965).

De otro mutante de S. erythreus, diferente al citado -- anteriormente obtenido por tratamiento con etilenamina seguido -- por irradiación con luz ultravioleta, se aisló del caldo de fermentación, un glicósido neutral el cual fue identificado como -- $3-\alpha$ -L-micarosileritronólido B. Este glicósido fue convertido a-

eritromicina A cuando se agregó al medio de fermentación del mutante de S. erythreus (Abbot 2 N.V. 153) bloqueado en la vía biosintética de las eritromicinas (Martín, et al 1966). En otros estudios realizados por Martín et al. (1970) se encontró que la adición del eritronólido B al mutante (Abbot 2 N.V.153) es convertido en 3- α -L-micarosileritronólido B, el cual puede ser aislado 24 horas después de la adición de la aglicona. Los resultados obtenidos con estos mutantes nos pueden llevar a las siguientes conclusiones.

i) La aglicona del eritronólido B acepta dos azúcares para convertirse en un antibiótico glicosídico.

ii) La micarosa y no la cladinosa es el azúcar neutral aceptado por la aglicona (Martin, et al 1970).

De otro mutante de S. erythreus parcialmente bloqueado en el biosíntesis de la eritromicina, se aisló un compuesto, el 6-desoxieritronólido B, Martin y Rosenbrook (1967), lo proponen como un intermediario, el cual es formado antes del eritronólido B. Cuando este compuesto fue adicionado al medio de fermentación del mutante 2 N.V. 153, se convirtió en eritromicina-A. Mediante el análisis en cromatografía de capa delgada de los extractos del caldo de fermentación, 6 horas después de la adición del 6-eritronólido B, se observa como éste desaparece y aparece el eritronólido B junto con el 3- α -L-micarosileritronólido B, lo cual esta en concordancia con lo anteriormente mencio

nado (citado por Grisebach, H. 1978).

Para pasar del 6- desoxieritronólido B al eritronólido B, se requiere la hidroxilación en el carbono número seis -- del anillo lactónico, esta reacción fue estudiada con extractos libres de células de S. erythreus (Vyngantas y Corcoran 1974). - La reacción requiere oxígeno y es inhibida en presencia de monóxido de carbono.

En la figura 1.2.4.5., se representa el esquema para los pasos finales en la biosíntesis de las eritromicinas. En -- la figura se puede observar que la incorporación de D-desosamina al 3- α -L-micarrosileritronólido B, debe conducir a la formación de una eritromicina. En efecto ésta ha sido recientemente aislada e identificada de los licores madres después de la cristalización de la eritromicina A (Majer, et al 1977). Este compuesto se conoce como eritromicina D y tiene la lactona de la eritromicina B y los azúcares de la eritromicina C; siendo el punto de ramificación para las eritromicinas A, B y C. La relación entre las eritromicinas se obtuvo en estudios de fermentación e investigación enzimática para la conversión de la eritromicina C a -- eritromicina A, de eritromicina B a eritromicina A (Martín, et al 1970) y de eritromicina D a eritromicina B (Grisebach, H. 1978).

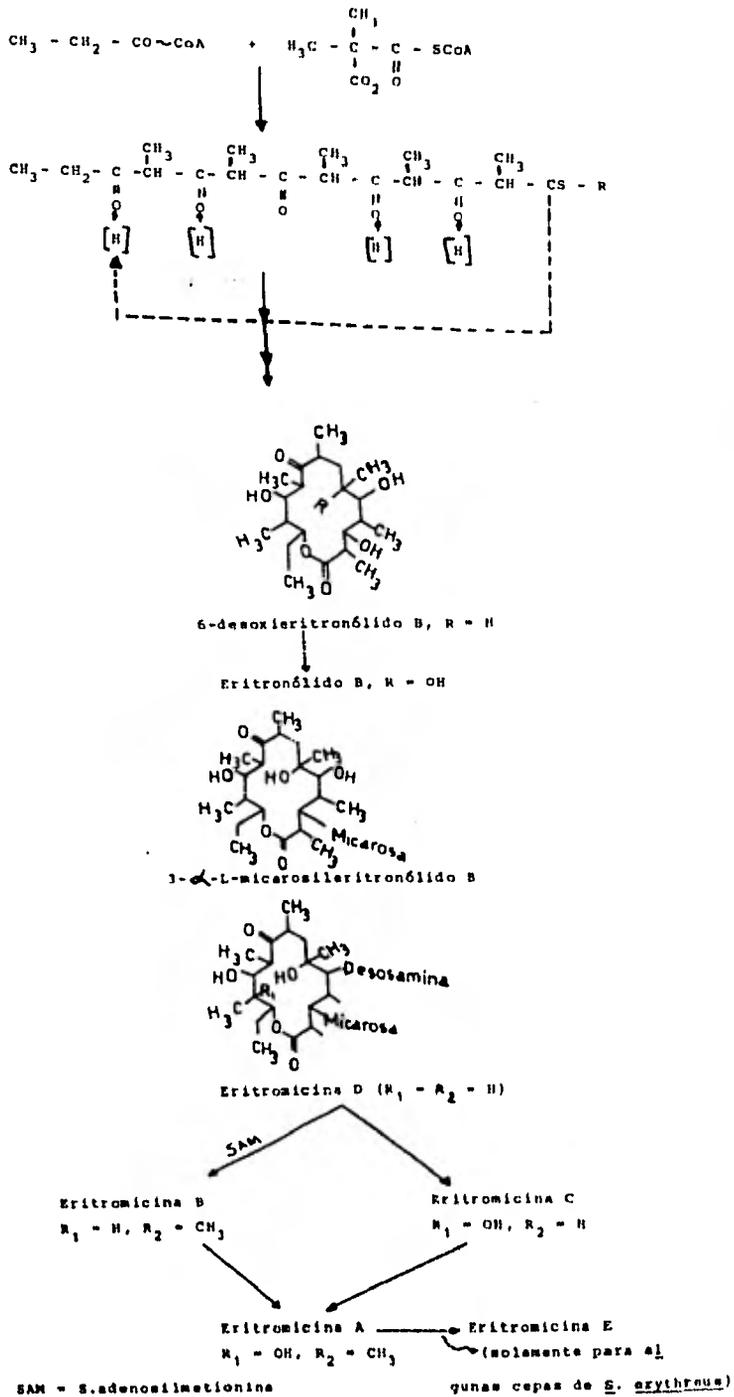
Se conoce mediante estudios traza que los grupos metil unidos a los átomos C-3", 3"-O y N de los azúcares de las eritromicinas son derivados de metionina (citado por Grisebach-

1978). Para la transformación de la eritromicina C a A y eritromicina D a B se requiere la O-metilación de la micarosa. La enzima que cataliza esta reacción fue aislada por Corcoran, J.W.- (1975) de extractos de S. erythreus. Esta enzima se conoce como S-Adenosil metionina:Eritromicina C - O-Metiltransferasa y usa como grupo donador la S-adenosil-L-metionina. La enzima tiene un alto grado de especificidad y únicamente sirven como sustrato las eritromicinas C y D.

La participación de la metionina en la formación de la eritromicina A ha sido demostrada en mutantes de S. erythreus dependientes de metionina. En cepas de S. erythreus no dependientes de metionina se sabe que las concentraciones de las eritromicinas A y C es casi la misma en la primera fase de la formación del antibiótico y que en la última fase la eritromicina C declina rápidamente. En mutantes dependientes de metionina en la última fase de formación del antibiótico, la concentración de eritromicina C es mayor que la de A. de aquí que la adición de metionina favorece la formación de eritromicina A (citado por Grisebach, H. 1978).

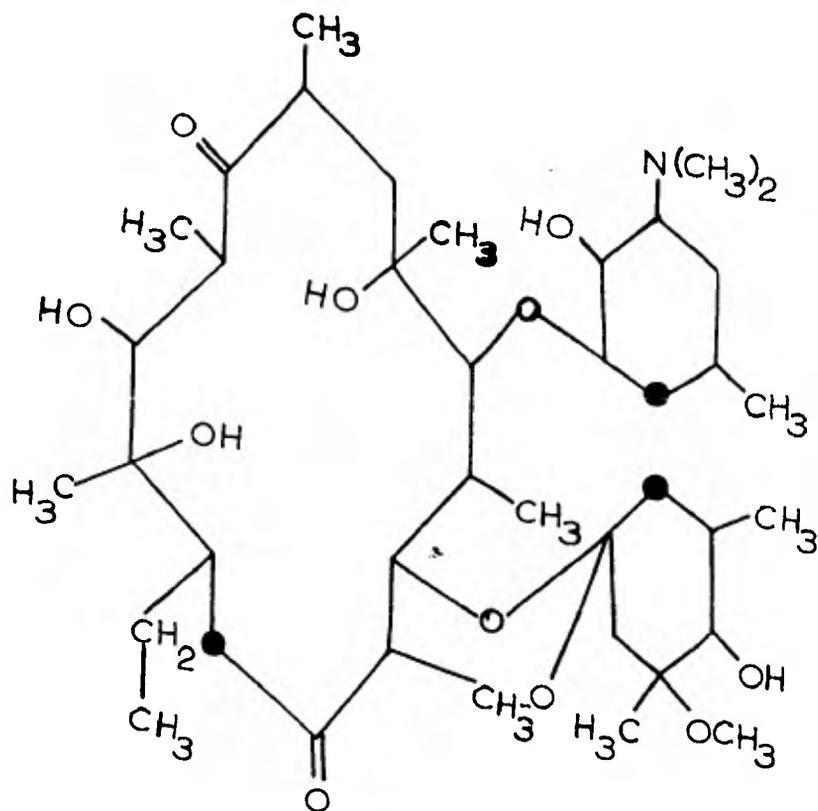
Finalmente, Martín J.R. et al (1975), han identificado un compuesto que puede ser formado por algunas cepas de S. erythreus a partir de eritromicina A, este compuesto en el cual la cladinoso está unida por medio de un enlace éster, quizá co-

Figura 1.2.4.5. Biosíntesis de las eritromicinas.



responde al compuesto con estructura desconocida y con actividad microbiana propuesto por Martín J.R. et al (1970), dicho compuesto se ha designado como eritromicina E (Figura 1.2.4.6.).

Figura 1.2.4.6. Estructura de la eritromicina E.



1.2.5. Factores que afectan la producción de eritromicina.

Al igual que en todos los antibióticos la producción de eritromicina por S. erythreus, debe estar regulada por facto-

res genéticos a través de mediadores bioquímicos y por factores ambientales. Esto permite al organismo productor formar las enzimas necesarias y en las cantidades adecuadas de cada una de ellas. Así las células que presentan un mecanismo de regulación bastante estricto no producen metabolitos de deshecho en el medio ambiente. Actualmente se han encontrado evidencias de que los microorganismos que sobreproducen metabolitos de importancia industrial, están de hecho regulados subnormalmente (Demain, A.L - - 1972).

Los estudios reportados acerca de los factores y mecanismos involucrados en la regulación de la producción de eritromicina por S. erythreus son muy escasos, por lo que no ha sido posible sacar conclusiones lo suficientemente claras, que conduzcan al mejoramiento de la producción de este antibiótico. Sin embargo existen trabajos de cinética de crecimiento y autólisis de S. erythreus, en los que se muestra que la producción de eritromicina depende de las condiciones de cultivo, edad del mismo, estado fisiológico; así como de otros factores genéticos y fisicoquímicos. Bosnjak, et al (1976a) estudiaron la cinética de crecimiento de S. erythreus, cultivado en un medio complejo, el estudio se realizó durante la fase de producción; los resultados sugieren que la velocidad de biosíntesis es proporcional a la concentración de biomasa y está a su vez depende de la velocidad de crecimiento,

edad del cultivo y condiciones de crecimiento. Bosnjak, et al (1976b) al crecer a S. erythreus E-08, en un cultivo semicontinuo utilizando un medio complejo, lograron aumentar la productividad en un 79% en relación al proceso batch; basados en estos resultados se presume que el mantenimiento del microorganismo-- en condiciones nutricionales adecuadas es uno de los prerrequisitos en el retardamiento de la degeneración del cultivo en el proceso de la biosíntesis de la eritromicina. Bosnjak, et al -- (1977), simularon en un proceso batch la cinética de diferenciación de S. erythreus, durante la fase de biosíntesis de eritromicina; encontraron que los valores simulados se adaptan bien a los datos experimentales y el grado de diferenciación depende de las condiciones de cultivo y propiedades del microorganismo. Gros, et al (1979), estudiaron la cinética de crecimiento y autólisis de S. erythreus, la autólisis fue inducida por la ausencia de oxígeno y/o la incubación a diferentes temperaturas; los resultados muestran que se puede aplicar una cinética de primer orden para los cambios de concentración en biomasa.

A continuación se discute lo que se conoce acerca de los factores involucrados en el control de la producción de eritromicina.

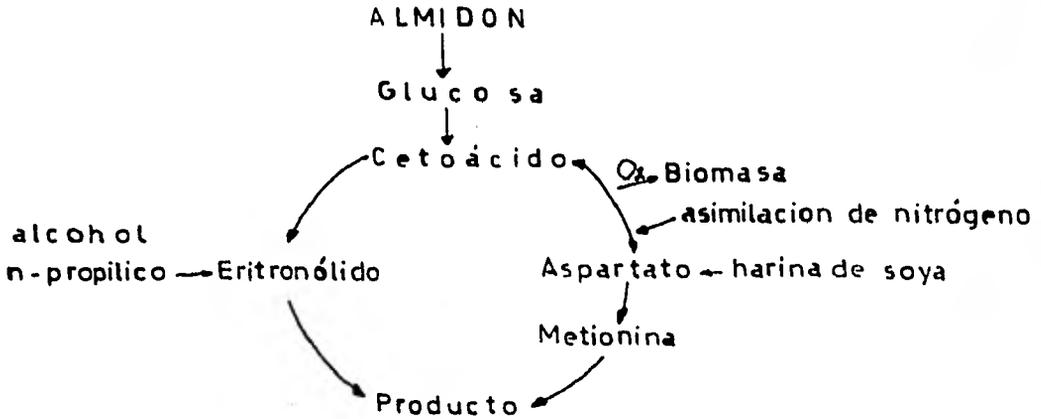
1.2.5.1. Fuente de carbono.

La fermentaciones de eritromicina generalmente se --

llevan a cabo en medios complejos en donde se utiliza como fuente principal de carbono; harina de soya y almidón de maíz. De la literatura se conoce que la biosíntesis de la eritromicina-- se inicia después de que el crecimiento ha terminado y continúa durante un cierto tiempo hasta que los azúcares prácticamente se han agotado del medio. Smith, et al (1962), realizaron estudios en los que encontraron que la adición de carbohidratos en determinadas concentraciones (sacarosa, maltosa, glucosa y fructuosa) a un medio complejo casi al final de la fermentación, -- trae consigo un restablecimiento en la producción de eritromicina; este efecto quizá se deba a que los carbohidratos actúen como precursores de intermediarios para la formación de la eritromicina. Esto se esquematiza en la figura 1.2.5.1., en donde se observa la asimilación de los intermediarios que participan en la formación de la eritromicina; siendo los carbohidratos como el almidón y glucosa precursores de los ácidos grasos de cadena corta que llevan a la síntesis del eritronólido.

En estudios realizados por Ettlér, et al (1978) a nivel de planta piloto sobre la regulación de la fermentación de la eritromicina encontraron resultados similares a los reportados por Smith, et al (1962). Efectos de regulación catabólica por fuente de carbono como la define Magasanik (1961) no han sido reportados en la biosíntesis de eritromicina; sin embargo es interesante notar que existen varias enzimas involucradas en la

Figura 1.2.5.1. Esquema simplificado de la biosíntesis de la eritromicina por S. erythreus.



biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga, los cuales son -- biosintéticamente análogos a los macrólidos, dichas enzimas están sujetas a represión catabólica por glucosa (Sprinkmeyer, -- H.P. 1978). Por otro lado en estudios realizados con los macrólidos tales como la candicidina y nistatina, se encontró que la producción del antibiótico se detiene después de haberse terminado la glucosa (Martín, J.F. 1978). El papel del alcohol propiónico, es bien conocido ya que participa como precursor del -- propionil CoA; sin embargo cuando se adiciona durante el primer período de la fermentación o en concentraciones arriba de las -- óptimas suprime la biosíntesis del antibiótico, sugiriendo un -- efecto de regulación a nivel de las enzimas que participan en -- la formación del antibiótico (Brinberg, et al 1976.; Holjevac.

M. 1976.; y Curcie, et al 1976). Musilek y Seveik (1961), encontraron que la adición de sales de sodio de los ácidos; acético, fórmico y propiónico al medio sobre el cual se crece S. erythreus tiene un efecto estimulador sobre la biosíntesis de la eritromicina. Hasta aquí las evidencias presentadas sobre la regulación catabólica en la biosíntesis de macrólidos no es muy clara, debido a que se requiere glucosa y otros carbohidratos para la síntesis del antibiótico.

1.2.5.2. Fuente de nitrógeno.

En las fermentaciones de eritromicina se utilizan normalmente fuentes de nitrógeno de origen orgánico, entre las que están incluídas la harina de soya, sólidos de licor de cocimiento de maíz, siendo las sales inorgánicas de nitrógeno fuentes pobres para la producción de eritromicina (Stark, et al 1961). Los estudios referentes al efecto de las fuentes de nitrógeno son muy escasos. Smith, R.L (1962), encontró que la adición simultánea de una fuente de nitrógeno (aceite de soya, glicina o NH_4Cl) y sacarosa a un medio complejo de fermentación, suprime la biosíntesis de la eritromicina. Los mismos autores observaron que la adición simultánea de glicina y sacarosa a un medio sintético estimula el crecimiento y producción del antibiótico. Aún no han sido reportados estudios acerca de regulación catabólica por fuente de nitrógeno en la producción de eri

tromicina por S. erythreus.

1.2.5.3. Efecto de los fosfatos.

El efecto del fosfato inorgánico, sobre la producción de los metabolitos secundarios se conoce desde hace mucho tiempo (Witney, et al 1977); Robbers, et al 1972). En estudios nutricio-
nales para la producción de antibióticos, se ha encontrado que -
altas concentraciones de fosfato inhiben la formación del anti-
biótico, estimulando al mismo tiempo el crecimiento vegetativo;-
de aquí que la gran mayoría de los antibióticos únicamente son--
producidos en concentraciones de fosfato subóptimas para el cre--
cimiento. Sin embargo esta limitación puede conducir a una baja-
en la concentración micelial disminuyendo la productividad; ya -
que como se conoce ésta depende del número de células y de la ---
producción específica por célula.

Se han postulado diferentes mecanismos para explicar-
el efecto de los fosfatos, sobre la producción de los metaboli--
tos secundarios (citado por Martín y McDaniel 1977.; Martín J.F.
1977) entre los que se incluyen los siguientes:

1.- "Limitación del crecimiento vegetativo debido a -
la carencia de fosfato, desviación del metabolismo hacia la pro-
ducción de idiolitos. BU'lock (1974) sugiere que diferentes gra-
dos de limitación nutricional son requeridos para disparar la --
formación de diferentes idiolitos".

2.- "Harold y Hostlack (1965) atribuyen la inhibición por fosfatos de la biosíntesis de las tetraciclinas a una desvía ción de las vías catabolicas de los carbohidratos; la glicolisis es favorecida a expensas del ciclo de las pentosas-fosfato, por lo tanto el NADH se convierte en el factor limitante de la síntesis del antibiótico".

3.- "En la biosíntesis de la estreptomycinina (Miller y Walker, 1970), viomicina (Pass y Racynska Bojanowska, 1968) y vancomicina (Murtz y Doolin 1973). El fosfato actua evitando la formación de las fosfatasas alcalinas requeridas para la biosíntesis del antibiótico".

Efecto de represión catabólica por fosfato no sido - aun reportado en la biosíntesis de eritromicina; sin embargo es de esperarse que exista, puesto que ha sido observado en muchas fermentaciones de Streptomyces, género al que pertenece el organismo productor de eritromicina (Demain, A.L. 1972.; Weinberg -- 1972; Gersch, et al 1979).

1.2.5.4. Efecto de la concentración de oxígeno disuelto.

En Streptomyces erythreus, así como en otros microorganismos aerobios el oxígeno constituye un factor muy importante en el crecimiento. Para que en una fermentación aeróbica el crecimiento y metabolismo no estén limitados por el suministro de oxígeno, la velocidad de transferencia de éste debe ser por lo -

menos igual a los requerimientos del microorganismos. Las fermentaciones de Streptomyces y de otros hongos sufren cambios morfológicos más o menos pronunciados en el curso de la fermentación cambiando rápidamente la viscosidad del medio lo que ocasiona la disminución de la concentración de oxígeno disuelto, limitando el crecimiento y en algunos casos la producción de metabolitos (Küenzi, M.T. 1978). La biosíntesis de eritromicina depende de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico a ácido acético, el cual es un intermediario obligatorio en la síntesis. Es evidente que este proceso requiera una adecuada transferencia de oxígeno de la fase gaseosa al medio de cultivo (citado por Páca, et al 1978). En concordancia con esto se ha encontrado que ciertos niveles de concentración de oxígeno disuelto son críticos para la producción de eritromicina (citado por Martín y McDaniel 1977). Un factor que afecta directamente la disolución del oxígeno es la adición de agentes antiespumantes, éste efecto se manifiesta también a nivel de producción de eritromicina (Páca, et al 1978).

De lo anterior se puede concluir que el oxígeno es uno de los principales factores limitantes en la producción de la eritromicina; por lo que en cualquier estudio a nivel de fermentación con Streptomyces erythreus, el oxígeno debe encontrarse a una concentración superior a la crítica.

Los estudios realizados acerca de la eritromicinas se

han enfocado principalmente a la biosíntesis y modo de acción - de este antibiótico sobre los microorganismos sensibles al mismo. No obstante la importancia que presentan los mecanismos de regulación en la biosíntesis y producción de antibióticos, tanto del punto de vista académico como industrial. La información publicada sobre los mecanismos que intervienen en la regulación de la producción de la eritromicina es escasa y no muy clara,-- por lo que cualquier estudio ya sea nivel genético o de fermentación contribuirá a dilucidar los fenómenos de regulación involucrados en la biosíntesis y/o producción de eritromicina.

1.3 Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo es investigar el efecto del fosfato inorgánico, así como las fuentes de carbono y nitrógeno, sobre algunos parámetros bioquímicos; pH, crecimiento, consumo de azúcares totales y su relación con la producción de eritromicina por fermentación con S. erythreus.

En segundo lugar evaluar el efecto de las fuentes antes mencionadas, como posibles agentes de regulación en la producción de eritromicina por S. erythreus.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1 Organismo.

Se utilizó una cepa industrial de Streptomyces ery-
threus (12479-D), con alta productividad. El microorganismo fue--
conservado como suspensión de esporas en agua destilada estéril,
refrigerada a 4 °C. La suspensión de esporas se obtuvo a partir
de tubos inclinados, inoculados con el microorganismo en cues--
tión. Los componentes de los tubos inclinados fueron los si--
guientes: (en g/l) almidón de papa 5, glucosa 5, triptona 5, --
cloruro de betaína 0.5, licor de cocimiento de maíz sólido 1, --
KH₂PO₄ 0.15, NaCl 0.01, CaCl₂ 0.08, agar 20, solución A 2 ml --
(solución A en g/l: MgSO₄ 100, FeSO₄.5H₂O 0.4, CoCl₂.6H₂O 0.1, --
pH 3.5). Los tubos se incubaron por 10 días a 34 °C.

2.2.1. Equipo.

Un fotocolorímetro marca Bausch & Lomb, Spectronic --
20; una centrifuga clínica marca Solvat con regulación de velo-
cidad y tiempo de centrifugación; un potenciómetro Corning mode
lo 125; cuarto de temperatura constante equipado con agitadores
rotatorios y alternantes; un autoclave para esterilización de -
medios de cultivo y material; área estéril equipada con lámpa--
ras de luz ultravioleta.

2.2.2. Reactivos y materias primas.

Las materias usadas en la preparación de los medios de cultivo fueron obtenidas de la Compañía Fermic, S.A. de C.V. y son las que a continuación se mencionan: licor de cocimiento de maíz sólido, harina de soya, almidón de maíz, dextrina y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los reactivos usados en la preparación de los medios de cultivo fueron de grado analítico (Baker, J.T. S.A.). Los reactivos usados en las determinaciones fueron: antrona (Sigma-Chemical Co.) acetato de isobutilo y eritromicina (Fermic, S.A. de C.V.).

2.3. Medios y condiciones de cultivo para el crecimiento y producción de eritromicina por Streptomyces erythreus.

2.3.1. Medios de cultivo.

La composición de los medios de cultivo utilizados se presenta en las tablas; 2.3.1.1., 2.3.1.2., 2.3.1.3 y 2.3.1.4.

Tabla 2.3.1.1. Medio de cultivo vegetativo* (Stark et al 1961).

Componente	gramos
licor de cocimiento de maíz sólido	8
sacarosa	30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
CaCO_3	2
H_2O destilada c.b.p.	1 000 ml

*el pH del medio antes de esterilizarse se ajustó a 7 con una solución de KOH al 20%

Tabla 2.3.1.2. Medio de cultivo fermentativo sintético I (Stark, et al 1961).

Componente	gramos
KH_2PO_4	2.5
NaCl	5.0
MgSO_4	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.001
CaCO_3	3.0
sacarosa	68.4
glicina	7.5
H_2O destilada c.b.p.	1 000.0 ml

pH = 7.8 sin ajustar

Tabla 2.3.1.3. Medio de cultivo fermentativo° II (Sánchez, et al, 1975).

Componente	%
extracto de levadura	0.4
bactodextrosa	1.0
extracto de malta	0.4

*el pH del medio de cultivo antes de esterilizar se ajustó a 7 con -- una solución de KOH al 20%.

Tabla 2.3.1.4. Medio de cultivo fermentativo* III - -
(Stark, et al 1961).

Componente	gramos
harina de soya	33.0
almidón de maíz	31.5
dextrina	30.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.4
CaCO ₃	7.2
H ₂ O destilada c.b.p.	1000.0 ml

* el pH del medio antes de -
esterilizar fue de 7.2.

2.3.2. Condiciones de crecimiento.

Las condiciones para el crecimiento de S. erythreus, -
en el medio de cultivo vegetativo son descritas a continuación:
se usaron matraces erlenmeyer de 500 ml, con 50 ml de medio ve-
getativo, inoculados con 0.8 ml de la suspensión de esporas. --
Además de los componentes del medio de cultivo, a cada matraz -
se le agregaron 0.2 ml de aceite de soya (antiespumante).

Los matraces fueron incubados a 34 °C manteniendose -
en agitación alternante durante 48 horas a 100 r.p.m.

Las condiciones de cultivo para S. erythreus, en los-
medios de cultivo fermentativos fueron los siguientes: Los ma--
traces erlenmeyer de 500 ml con 40 ml de medio de cultivo, fue-

ron inoculados con 2 ml de medio de cultivo vegetativo previamente inoculado con S. erythreus.

Los matraces fueron incubados a 34 °C en agitación rotatoria a 300 r.p.m., retirándose a las 24 horas para adicionar 0.6 ml de propanol, incubándose nuevamente bajo las mismas condiciones. Fueron inoculados un número suficiente de matraces en cada experimento, en forma tal que cada matraz pudiera ser descartado después de muestrearlo. Todos los datos representan el promedio de 2 a 3 matraces.

2.4. Determinación de los parámetros de la fermentación.

2.4.1. Determinación de eritromicina.

Se utilizó el método químico desarrollado por Jared, et al (1953); que consiste en la extracción de la eritromicina del caldo de fermentación con acetato de isobutilo a pH 9.5; extrayéndose posteriormente, con ácido clorhídrico 0.1 N. El extracto resultante se trata con ácido sulfúrico 27 N, desarrollándose un color amarillo intenso que es proporcional a la concentración de eritromicina presente. El compuesto formado después del tratamiento con ácido sulfúrico tiene un máximo de absorbancia a 485 nm.

El procedimiento para la determinación de eritromicina en el caldo de fermentación se discute con mayor detalle en-

el apéndice A.

2.4.2. Determinación de la concentración de azúcares totales.

Fue realizada mediante el método de la antrona (Keleti, y Leader 1974). El principio de la reacción es la condensación del antranol, el cual reacciona con ácido sulfúrico para dar derivados del furfural de los azúcares presentes. El procedimiento detallado para esta determinación se describe más adelante en el apéndice A.

2.4.3. Determinación de biomasa.

La cuantificación de la biomasa fue realizada en forma indirecta mediante la técnica de "Packing Mycelial Volume" - (PMV), esta técnica consiste en medir el volumen del micelio - después de la centrifugación, expresándose en % del volumen total utilizado en la determinación. En el apéndice A se describe con mayor detalle esta técnica. (Pirt, J.S 1975).

2.4.4. Determinación de pH.

Las determinaciones de pH en el medio de cultivo fueron realizadas en un potenciómetro, equipado con electrodo de vidrio.

2.5. Prueba de medios de cultivo para el crecimiento y producción de eritromicina por Streptomyces erythreus.

En este experimento se probó la influencia de distintos medios, sobre el crecimiento y producción de eritromicina - por S. erythreus. Los medios de cultivo fermentativo utilizados son los descritos anteriormente. Las condiciones de inoculación e incubación ya fueron indicadas con anterioridad.

A las 96 horas de haber iniciado la fermentación se retiraron los matraces y se efectuaron las siguientes determinaciones: concentración de eritromicina, PMV y pH.

2.6. Efecto del fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina por Streptomyces erythreus.

Se probó el efecto del fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus en el medio complejo fermentativo III. Para ello se realizaron dos experimentos; en el primero, además de los componentes del medio de cultivo se añadió fosfato inorgánico en distintas concentraciones (0, 4, 10, y 20 mM); en el segundo experimento el fosfato se agregó a las 48 y 96 horas post-inoculación, a un nivel de 4 y 20 mM. A partir de las 48 horas se hicieron determinaciones de los siguientes parámetros: concentración de eritromicina, azúcares totales, PMV y pH.

2.7. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por Streptomyces erythreus.

Para establecer el efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus, se llevaron a cabo dos experimentos con distintas fuentes de nitrógeno. En un experimento se probó el efecto de la adición de sacarosa y la limitación de nitrógeno en el medio de cultivo fermentativo III. El estudio se realizó variando la concentración inicial de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y añadiendo 2 ml de una solución de sacarosa 0.2 M a las 96 horas de haber iniciado la fermentación.

En otro experimento se determinó el efecto de la urea sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus; la urea se agregó al inicio de la fermentación junto con los otros componentes del medio de cultivo a excepción del sulfato de amonio.

2.8. Determinación de la evaporación del medio de cultivo fermentativo III, para el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus.

La evaporación del medio de cultivo fermentativo se determinó usando matraces bafleados de 500 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo sin inocular, los cuales fueron incubados a

34 °C en agitación rotatoria a 300 r.p.m. A distintos tiempos -
posteriores a la incubación los matraces fueron retirados con -
el fin de determinar la pérdida en volumen del medio de cultivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. Prueba de medios de cultivo para el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus.

Durante este estudio se efectuó un experimento donde se probaron 3 medios de cultivo, para el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Este experimento se realizó durante 96 horas. Retirándose los matraces para hacer determinaciones de pH, PMV y concentración de eritromicina. Los resultados obtenidos se describen en la tabla 3.1.1.

Tabla 3.1.1. Resultados de la prueba de medios de cultivo para el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus.

Medios de cultivo	pH (al inocular)	pH (96 hrs)	PMV (%)	Eritromicina (µg/ml).
Sintético I	7.2	6.9	19	1060
Complejo II	7.3	8.1	4	0
Complejo III	7.9	6.8	45	2555

En esta tabla podemos observar que el medio complejo-III, permite un mejor crecimiento (PMV) y mayor producción de eritromicina; para ambos parámetros, representa aproximadamente el doble al compararse con el medio sintético I; presentándose un pH similar en los dos medios al término de las 96 horas. Ade

más la productividad específica de eritromicina (expresada en μg de eritromicina / % de PMV. ml), es aproximadamente 17 unidades más alta en el medio complejo III en relación al medio sintético I.

En la misma tabla se presenta que el medio complejo II, no resulto ser apropiado para el crecimiento del microorganismo. Esto quizá se debió al incremento de pH registrado en el medio, limitación del crecimiento por la ausencia de ciertos requerimientos nutricionales o ambos.

Smith, et al (1962), encontró que el crecimiento y producción de eritromicina por Streptomyces erythreus, presenta un comportamiento distinto dependiendo del medio de cultivo usado, lo cual indica que los estudios realizados en un medio sintético no pueden ser extrapolados a un medio complejo de producción.

Por las razones que a continuación se mencionan, en los subsecuentes experimentos de este estudio se decidió utilizar el medio complejo III.

- Permite un buen crecimiento y producción de eritromicina.
- Los resultados obtenidos pueden ser aplicados en la optimización del medio de cultivo a nivel de producción del antibiótico.
- Los estudios en un medio complejo de fermentación,-

de alguna manera ayudan a dilucidar la presencia de fenómenos de regulación en la biosíntesis del antibiótico; como lo muestran los estudios realizados en otros antibióticos (Martín y McDaniel 1974).

3.2. Efecto del fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus.

Para estudiar este efecto se realizaron dos experimentos. En el primero se añadió el fosfato junto con los otros componentes del medio de cultivo; obteniéndose concentraciones finales de 0, 4, 10 y 20 mM. Los resultados se discuten a continuación:

La tabla 3.2.1. muestra los resultados para el control cuando no se adiciona fosfato al medio; en ella se advierte que durante las 72 horas posteriores a la inoculación existe una disminución continua de pH, volviéndose a incrementar a un valor final aproximado de 8. De acuerdo a lo reportado en la literatura este incremento se cree es originado por la desaparición de azúcares y la subsecuente utilización de ácidos orgánicos intermediarios; así como también a la aparición de compuestos nitrogenados que surgen de la lisis celular (Corum, et al - 1952; Stark y Smith 1961; Gros, et al 1978). El ascenso en pH corresponde al período de la producción de eritromicina, a su vez se observa que ésta es paralela al consumo de carbohidratos.

El análisis de los datos de la tabla 3.2.2. indica - que el PMV no resulto ser un buen método para cuantificar el - crecimiento micelial en las condiciones de prueba, por las li- mitaciones que presenta cuando se usa un medio líquido con par- tículas sólidas en suspensión que interfieren con su determina- ción. Sin embargo, es probable que exista crecimiento micelial puesto que hay disminución de pH y azúcares totales durante -- las primeras 72 horas de fermentación. La comparación de es-- tos resultados con los de la tabla anterior señala una disminu- ción de azúcares y producción de eritromicina; en cambio en el pH se encuentra el mismo comportamiento, a pesar de la diferen- cia inicial.

Los valores de la tabla 3.2.3. son los resultados de los parámetros de la fermentación al añadir una concentración- inicial 10 mM de fosfato inorgánico. A diferencia de los datos de la tabla anterior el nivel de azúcares totales a las 96 ho- ras posteriores a la inoculación es ligeramente menor. Y al -- igual que en los datos de las otras tablas se registra una dis- minución de pH durante las primeras horas de crecimiento. En- la producción de eritromicina hay un descenso muy marcado en - relación al control.

Los resultados obtenidos al añadir una concentración 20 mM de fosfato inorgánico se encuentran representados en la- tabla 3.2.4. Al examinar los datos se encuentra lo siguiente:--

la producción de eritromicina sigue un curso similar a los valores de la tabla anterior; en tanto que en el consumo de azúcares es más parecido al control. En el PMV se observa una disminución de un valor de 42% a las 48 horas, a 27.5% a las 96 horas de haber inoculado. La variación de pH es muy semejante a la de los resultados de las tablas anteriores, siendo el pH inicial igual al del control.

La adición de fosfato inorgánico en concentraciones crecientes mostró un efecto negativo sobre la producción de eritromicina. Este decremento puede ser originado por el cambio en pH o por la presencia de fosfatos en el medio. La discusión de los resultados sugiere que la disminución es debida a esto último. El pH inicial a las concentraciones de fosfatos 0 y 20 mM fue de 8; en tanto que para las concentraciones de 4 y 10 mM fue de 6.8 y 6.9 respectivamente; lo cuál quiere decir que si el pH inicial fuera el factor principal en el decremento de la producción del antibiótico, éste debería manifestarse tanto en las concentraciones de 0 como en las de 20 mM, esto no sucede de esa manera. Además en todos los casos se observa una tendencia a la disminución de este parámetro y en el momento en que expresa el efecto (aproximadamente a las 72 horas), el pH se encuentra dentro de un rango muy estrecho 6.6-6.9 (figura 3.2.1.); lo que confirma que el descenso en la producción de eritromicina es debido a la presencia de fosfatos en el medio. Dicho efec

to se hace más patente al final de la fermentación (figura 3.2.2.), en donde se observa una disminución con respecto al control de 29.1, 39.4 y 37.5% para las concentraciones de 4, 10 y 20 mM respectivamente. En la figura 3.2.1. se advierte que la presencia de fosfatos en el medio de cultivo; simultáneamente causa un efecto negativo en la producción de eritromicina, estimula la velocidad de consumo de azúcares como se interpreta en la disminución de la concentración de éstos (figura 3.2.3.). Los resultados de este experimento concuerdan con los estudios reportados en la literatura al respecto, donde el fosfato inorgánico es un efector negativo de la biosíntesis de muchos antibióticos. Los macrólidos son especialmente sensibles a este efecto. La adición de fosfatos al medio de crecimiento del organismo productor de la nistatina, incrementa la velocidad de utilización de los carbohidratos y suprime la síntesis del antibiótico. La ayfactina es inhibida en altas concentraciones de fosfatos y simultáneamente se incrementa la utilización de almidón. En las fermentaciones de nistatina se encontró que el fosfato extracelular disminuye durante la fase de crecimiento y permanece en concentraciones bajas durante la fase de producción (para referencias ver Martín, 1977). En la síntesis de nistatina (Liu, et al 1975) y turimicina (Gersch, et al 1979), se encontró que la adición de fosfato inorgánico estimula el crecimiento micelial (peso seco) y disminuye la producción de antibiótico.

En el segundo experimento el fosfato inorgánico se añadió a las 48 y 96 horas de haber iniciado la fermentación; las concentraciones adicionadas fueron de 0,4 y 20 mM. En la tabla 3.2.5. se resume el efecto del fosfato inorgánico (añadido a los tiempos indicados) sobre el pH, PMV y concentración de eritromicina. Al igual que en el experimento anterior se observa un comportamiento similar en pH; es decir disminuye durante las primeras horas de la fermentación volviéndose a incrementar al final de la misma. En el PMV se encuentran variaciones difíciles de interpretar, lo cual confirma que este método no es apropiado para cuantificar crecimiento micelial en las condiciones probadas.

En estudios realizados por Gersch, et al (1979) sobre la biosíntesis de la turimicina por Streptomyces hygroscopicus se encontró que la adición de fosfato inorgánico después de cierto tiempo de haberse iniciado el crecimiento no ocasiona ningún efecto sobre la producción de este antibiótico. Estos resultados no coinciden con los reportados en este trabajo. Pero sin embargo al compararlos con los obtenidos por Liu, et al (1975) y Martín, et al (1977), en donde se encontró que la adición de fosfato a una concentración arriba de 5 mM a las células en fase de producción de candicina, origina un incremento en la captación de oxígeno y la síntesis del antibiótico es inhibida. Estos cambios se acompañan por un aumento en el peso-

seco y velocidad de utilización de glucosa.

Los experimentos de este trabajo no determinan a que nivel molecular es ejercido el control negativo por fosfato, ya que puede ser considerado como una represión de las enzimas del metabolismo secundario o inhibición de las enzimas preformadas. - Una inhibición es sugerida en la síntesis de la candidicina - - (Martín, et al 1977). Como se mencionó en la introducción, se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto del fosfato inorgánico; no obstante la diferencia entre ellos se piensa que sea posible la existencia de un mediador común, tal como el nivel de ATP o la carga energética por adenilato, el cual regularía la expresión del (o los) gene (s) relacionado con la -- síntesis del antibiótico (Martín y McDaniel 1977).

Tabla 3.2.1. Efecto de la adición inicial de fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio fermentativo III. Esta tabla muestra los resultados de los parámetros indicados en el primer renglon, cuando no se adicionó fosfato inorgánico.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	8.0	-	-	-
48	7.8	38.5	6.76	302
72	6.9	31.5	5.18	903
96	7.5	31.0	3.03	1589
168	7.9	+	2.40	3202

-No se determinó

+No se determinó por falta de volumen.

Tabla 3.2.2. Efecto de la adición de fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio fermentativo III. Esta tabla muestra los valores de los parámetros indicados, para una adición inicial de una concentración 4 mM de fosfato inorgánico.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	6.9	-	-	-
48	6.55	25.0	5.51	365
72	6.60	33.0	2.48	776
96	7.85	26.5	2.24	1498
168	7.8	+	1.35	2270

-No se determinó

+No se determinó por falta de volumen.

Tabla 3.2.3. Efecto de la adición inicial de fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio fermentativo III. Esta tabla muestra los valores de los parámetros indicados, para la adición inicial 10 mM de fosfato inorgánico.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina (µg/ml)
0	6.8	-	-	-
48	6.1	28.5	5.26	311
72	6.6	25.0	2.58	596
96	8.0	32.0	1.80	1169
168	7.9	+	1.04	1942

-No se determinó

+No se determinó por falta de volumen.

Tabla 3.2.4. Efecto de la adición inicial de fosfato inorgánico sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio fermentativo III. Esta tabla muestra los valores de los parámetros indicados para la adición inicial de una concentración 20 mM de fosfato inorgánico.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	8.0	-	-	-
48	6.7	42.0	6.05	358
72	6.9	28.0	5.00	604
96	6.9	27.5	2.84	1159
168	7.9	+	2.40	2002

-No se determinó

+No se determinó por falta de volumen.

Tabla 3.2.5. Efecto de la adición de fosfato a diferentes tiempos sobre la producción de eritromicina por S. erythreus. Se añadió un volumen de 2 ml de una solución de fosfato inorgánico para alcanzar una concentración final de 4 y 20 mM en los matraces, al control únicamente se le añadió 2 ml de agua destilada estéril.

Tiempo (horas)	Tiempo de adición del fosfato (horas)	Concentración de fosfato adicionado al medio (mM)	pH	PMV (%)	Eritromicina (µg/ml)
0	+	+	8.0	*	*
48	+	+	7.1	40	380
72	+	+	7.0	36	1620
120	96	0	7.6	25	2050
120	96	4	7.8	30	1960
144	96	20	7.8	20	1848
144	96	0	7.4	21	2600
144	96	4	7.9	25	2350
168	48	20	8.0	26	2234
168	48	0	8.0	20	3200
168	48	4	7.9	18	2943
168	48	20	7.9	22	2815

+No adición de fosfato inorgánico

*No se determinó

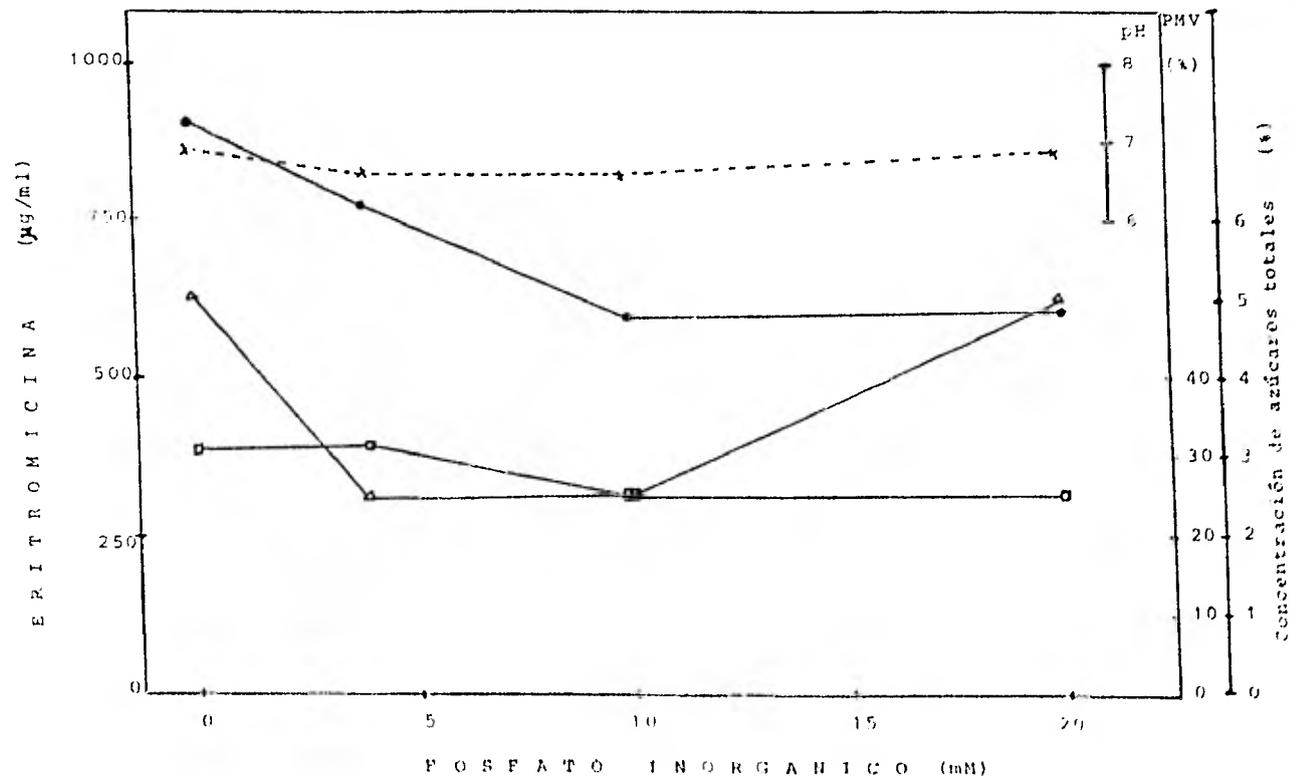


Figura 3.2.1. Efecto del fosfato inorgánico sobre la producción de eritromicina, PMV, concentración de azúcares totales y pH en *S. erythraeus*. El fosfato fue agregado junto con los otros componentes del medio fermentativo III. ●—● Eritromicina; □—□ PMV; ▲—▲ Concentración de azúcares totales; ×—× pH.

Figura 3.2.2. Efecto de la concentración de fosfatos sobre la producción de eritromicina por *S. erythreus*.

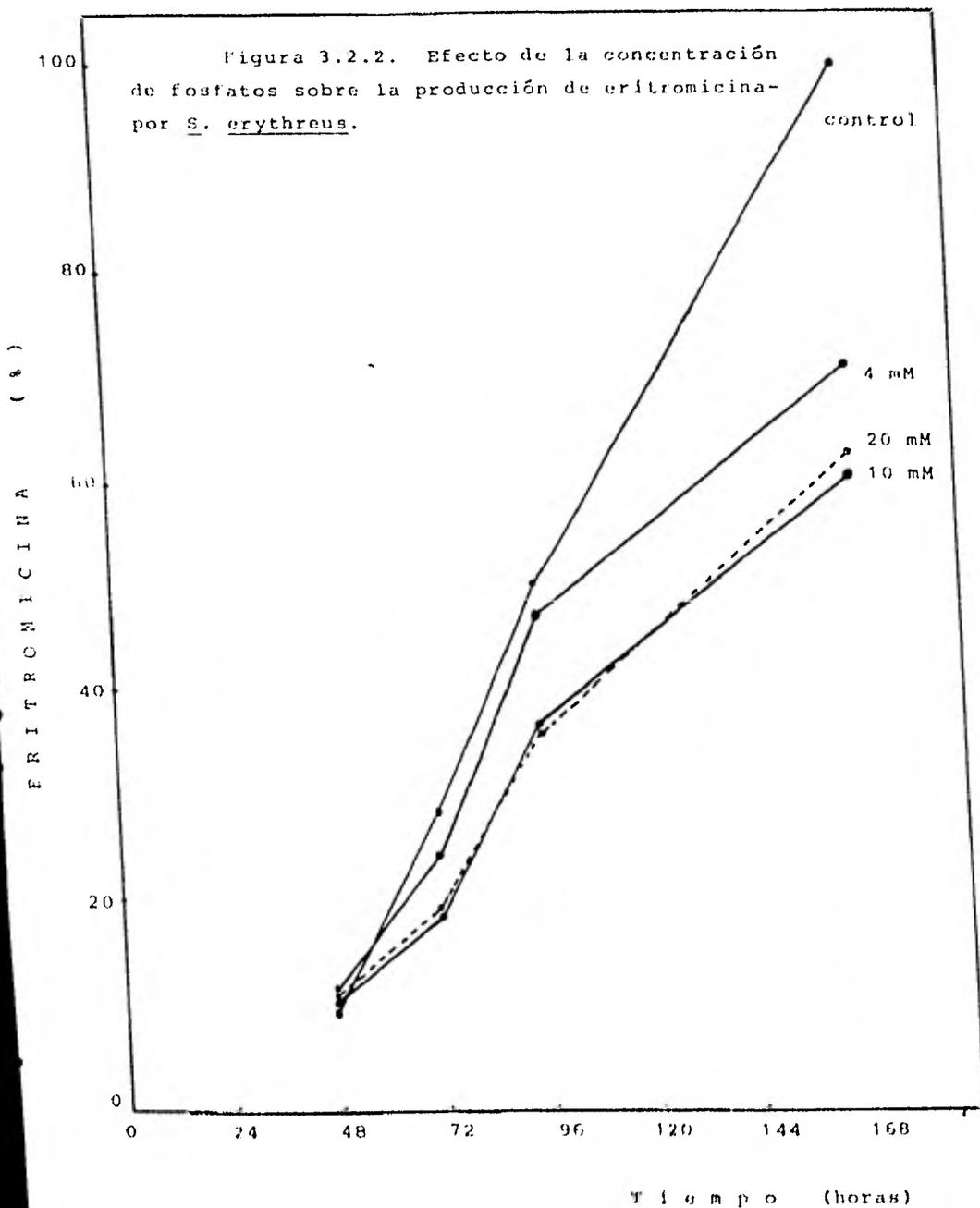
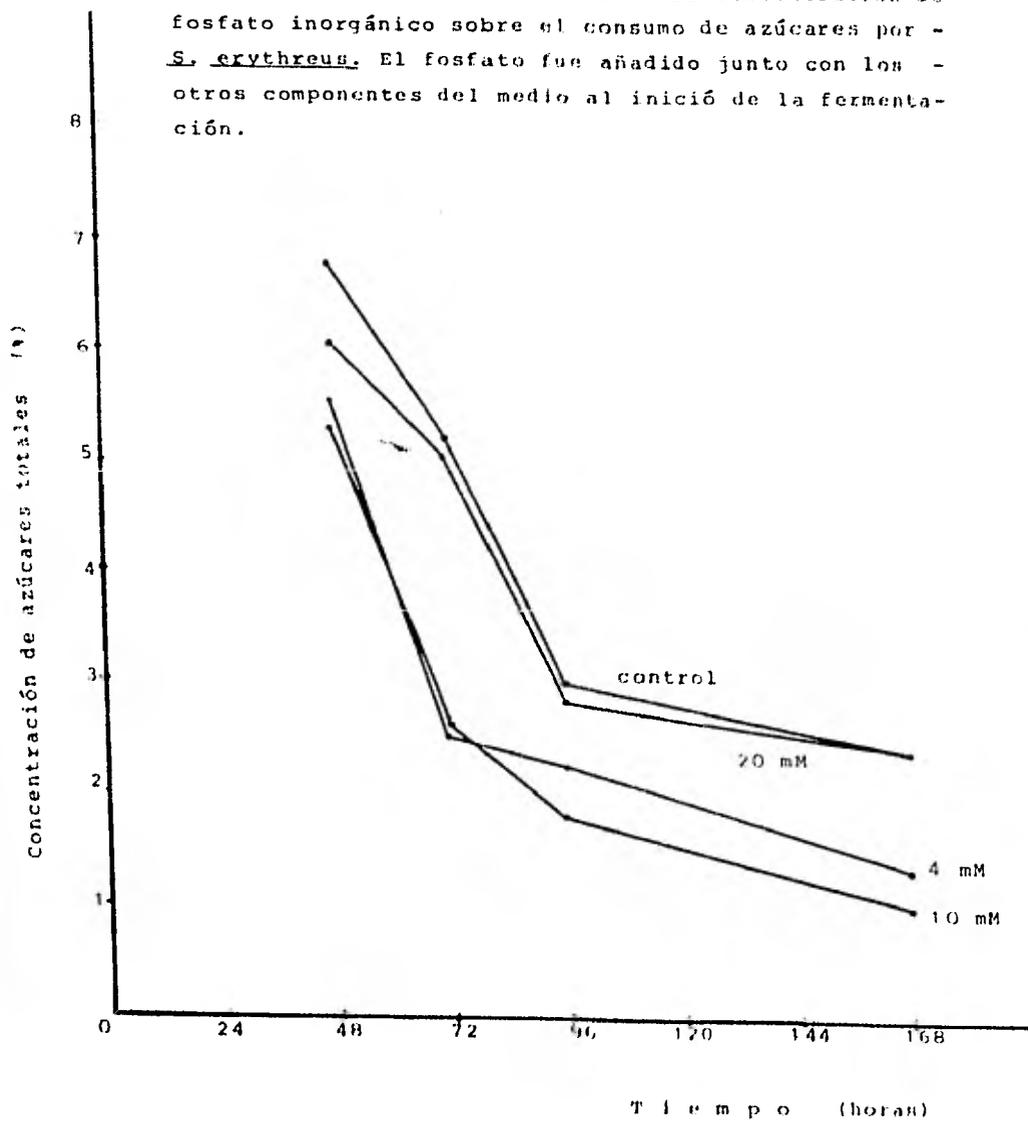


Figura 3.2.3. Efecto de la concentración de fosfato inorgánico sobre el consumo de azúcares por *S. erythreus*. El fosfato fue añadido junto con los otros componentes del medio al inicio de la fermentación.



3.3. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus.

En esta etapa se estudió el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Se utilizaron como fuente de carbono; sacarosa y glucosa en el medio complejo de fermentación III; en donde se variaron las concentraciones iniciales y en ocasiones se hicieron adiciones a diferentes tiempos, con diferentes concentraciones.

Cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, ésta se adicionó junto con los otros componentes del medio al inicio de la fermentación en concentraciones de 0, 0.05, 0.1, 0.4, 0.6 M. Los resultados se discuten a continuación:

En el control se encontró una disminución gradual en la concentración de azúcares totales, llegando a un valor final de 1.65 %. El pH inicial fue de 7.8; a partir de este punto hasta las 72 horas hay un decremento volviéndose ligeramente ácido. Este periodo coincide con el incremento en la producción de eritromicina y disminución del PMV (tabla 3.3.1.). Al final de la fermentación se observó un incremento en pH.

La presencia de glucosa en el medio de cultivo a un nivel de 0.05 M originó un aumento en el crecimiento (PMV) durante las primeras 48 horas de la fermentación; en las siguientes 24 horas hubo descenso en este parámetro estabilizándose en

las subsecuentes. La fermentación se inició con un pH de 7.9 - cayó a 7.2 y se elevó al final a un valor cercano a 8. Observándose en esta fase un ligero ascenso en la producción de eritromicina y una alta concentración de azúcares totales (tabla 3.3.2.).

Al incrementar la glucosa en el medio de cultivo a un nivel de 0.1 M (tabla 3.3.3.), se pudo ver un efecto estimulador en el PMV con respecto al control. Este efecto lo mismo que el consumo de azúcares fue muy parecido al descrito en la tabla anterior; sin embargo los datos de esta tabla muestran que la producción de eritromicina fue menor a las 96 horas posteriores a la inoculación; esto quizá se debió al pH -- elevado.

En la tabla 3.3.4., se describen los resultados obtenidos al añadir una concentración 0.4 M glucosa. A lo largo de la fermentación se obtuvo crecimiento micelial elevado, en tanto que la concentración final de azúcares totales fue muy similar a la que se observó en el control a las 48 horas post-inoculación. A diferencia de los resultados de las tablas anteriores se encontró una disminución muy marcada en el pH durante las primeras 96 horas de fermentación, aumentando ligeramente al final a un valor de 6.5. La producción de eritromicina ascendió fuertemente en las últimas horas de la fermentación; alcanzándose aproximadamente un 34 % más en relación al control.

En la tabla 3.3.5., se encuentran los datos de los valores obtenidos al añadir una concentración inicial 0.6 M de -- glucosa. El análisis de los resultados muestra lo siguiente: -- la presencia de glucosa a este nivel ocasionó una elevación de casi el doble en la producción de eritromicina en relación al control. El PMV se mantuvo en un valor de 98 % al través de la fermentación, no así el pH el cual se inició en 7.2 disminuyó a 5.9 en las siguientes 48 horas y partir de aquí osciló entre 6.6-6.8. La concentración de azúcares fue alta durante las primeras horas, registrándose un valor final similar al de la tabla anterior.

La adición inicial de glucosa en concentraciones crecientes provocó un efecto estimulador debido al aumento de -- biomasa (PMV, figura 3.3.1.); este efecto al parecer también -- se manifestó a nivel de producción de eritromicina (figura 3.3.2.). La estimulación de la producción de eritromicina pudo bien haberse debido a la presencia de glucosa, disminución de pH o -- estimulación del crecimiento micelial. El examen de los resultados muestra que cuando se adiciona glucosa en pequeñas concentraciones la disminución de pH no fue muy marcada; sin embargo -- hubo un efecto de estimulación en la producción de eritromicina al final de la fermentación (figura 3.3.1.). Los resultados anteriores sugieren que para obtener un buen crecimiento micelial y producción de eritromicina es indispensable mantener los azú-

cares a un nivel alto.

En estudios realizádos con otros antibióticos usando la glucosa como fuente de carbono, se ha encontrado un efecto - de regulación catabólica sobre su biosíntesis; actinomicina (Gallo y Katz 1972), estreptomycin (Demain e Inanine 1970), bacitracina (Haavik, 1974), siomicina (Kimura, 1967). En las fermentaciones de estreptomycin y actinomicina, está presente la re- presión catabólica y la inhibición de las enzimas preformadas - Mientras que en la biosíntesis de la siomicina únicamente se ob- serva esta última. Sin embargo hay diferencia significativa en- tre la regulación catabólica de la biosíntesis de estos antibió- ticos y el efecto de la glucosa sobre la biosíntesis de macróli- dos. Por ejemplo la formación de actinomicina ocurre únicamente después de que la glucosa se ha terminado en el medio de culti- vo, en tanto que en la síntesis de macrólidos ésta es indispen- sable para su formación. La producción de candicidina se detie- ne al terminarse la glucosa (Martín y McDaniel 1975).

Las evidencias existentes sobre la regulación catabó- lica de la biosíntesis de macrólidos por glucosa son poco cla- ras debido a ésta es requerida para la síntesis del producto.

En un segundo experimento para probar el efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de eritromi- cina por S. erythreus; se hicieron adiciones de sacarosa al me- dio complejo fermentativo III. Estas se efectuaron a las 96 --

horas de haber iniciado la fermentación utilizando un volumen - de 2 ml de concentraciones de sacarosa a 0.05 y 0.1 M; al control se le adicionaron 2 ml de agua destilada estéril.

Los datos de la tabla 3.3.2.1., muestran los resultados obtenidos para el control. En forma similar a los controles de los experimentos anteriores se manifiesta una disminución de pH durante las primeras horas de la fermentación incrementándose al final de la misma. La producción de eritromicina se inició a las 72 horas posteriores a la inoculación; este período coincide con la elevación de pH y máximo crecimiento micelial (PMV). Siendo interesante notar que el consumo de azúcares fue paralelo a la formación del antibiótico. Al final de la fermentación el pH fue de 8 mientras que los azúcares decayeron a un nivel bajo. La elevación en pH se puede atribuir a la autólisis del micelio, lo cuál es evidente que ocurre ya que hay una disminución en el crecimiento (PMV).

De los resultados obtenidos se observa que la adición sacarosa a una concentración de 0.05 M tiene un efecto estimulador sobre la producción de eritromicina como se deduce de las determinaciones (tabla 3.3.2.2.). En esta tabla se encuentra -- que mientras hay una disminución en la concentración final de -- azúcares de aproximadamente el doble con respecto al control, -- en el PMV no se observa tal variación, lo cuál indica que los -- azúcares son utilizados en la biosíntesis del producto. La adi--

ción de sacarosa al medio mantiene el pH a un nivel inferior a 8.

En la tabla 3.3.2.3. Se describen los valores obtenidos al adicionar sacarosa a una concentración 0.1 M. Al igual que los datos de la tabla anterior la comparación con el control manifiesta un decremento de casi el 40% en la concentración final de azúcares totales; sin embargo en la producción de eritromicina solamente se observa un pequeño incremento. El pH a partir de las 96 horas se mantuvo en 7.5 en tanto que el PMV aumentó ligeramente.

Corum, et al (1954) usando sacarosa como única fuente de carbono en un medio sintético encontraron que ésta se rompe en glucosa y fructuosa y se utiliza a una velocidad tal que permite un buen crecimiento y producción de eritromicina.

La producción de eritromicina por S. erythreus en un medio complejo se inicia casi al final de la fase de crecimiento y continúa por un cierto tiempo, el cuál depende la presencia de azúcares en cantidades significativas; infiriéndose que en el proceso de crecimiento el microorganismo consume la mayor parte de azúcares (Smith, et al 1962; Gros, et al 1978). Al alimentar sacarosa en el final del ciclo de fermentación se puede controlar la biosíntesis de la eritromicina; 1) incrementando los precursores intracelulares del eritronólido (propionato y 2-metil malonato, 2) retardando el tiempo en la degeneración del cultivo durante el proceso de la biosíntesis del antibióti-

co, como es sugerido por los estudios de cultivo semicontinúo - y cinética de crecimiento en la fase de producción de eritromicina por S. erythreus (Bošnjak, et al 1976 y 1977).

Tabla 3.3.1 Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio complejo III. Esta tabla muestra los resultados obtenidos para el control, es decir sin adición de glucosa.

Tiempo (horas)	PH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	7.8	-	-	-
48	7.5	60	6.20	410
72	6.9	40	5.60	1025
96	7.3	32	3.80	2325
168	7.9	30	1.65	2684

- No se determinó

Tabla 3.3.2. Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio complejo III. La glucosa a una concentración 0.05 M se adicionó junto con los otros componentes del medio.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina (µg/ml)
0	7.9	-	-	-
48	7.2	98	7.52	618
72	7.5	66	6.40	1100
96	8.0	65	5.80	2288
168	7.9	54	5.30	2989

- No se determinó

Tabla 3.3.3. Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio complejo. Esta tabla muestra los resultados obtenidos al añadir una concentración 0.1 M de glucosa.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	7.9	-	-	-
48	7.0	96	7.5	607
72	7.7	81	6.5	1800
96	7.6	50	5.8	2962
168	8.0	48	5.0	2867

- No se determinó

Tabla 3.3.4. Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina en el medio complejo III. La glucosa a una concentración de 0.4 M se adicionó junto con los otros componentes del medio de cultivo.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	7.5	-	-	-
48	6.2	98	11.3	545
72	6.2	95	8.4	1377
96	6.2	90	7.2	2093
168	6.5	85	5.9	3599

- No se determinó

Tabla 3.3.5 Efecto de la adición de glucosa sobre la producción de eritromicina en el medio complejo III. La glucosa a una concentración de 0.6 M se adicionó junto con los otros componentes del medio de cultivo.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	7.2	-	-	-
48	5.9	98	13.5	436
72	6.7	98	12.0	1232
96	6.8	98	9.0	2650
168	6.6	98	6.0	4179

- No se determinó.

Figura 3.3.1. Efecto de la concentración inicial de glucosa sobre el crecimiento micelial (PMV) en S. *ery* -- threus.

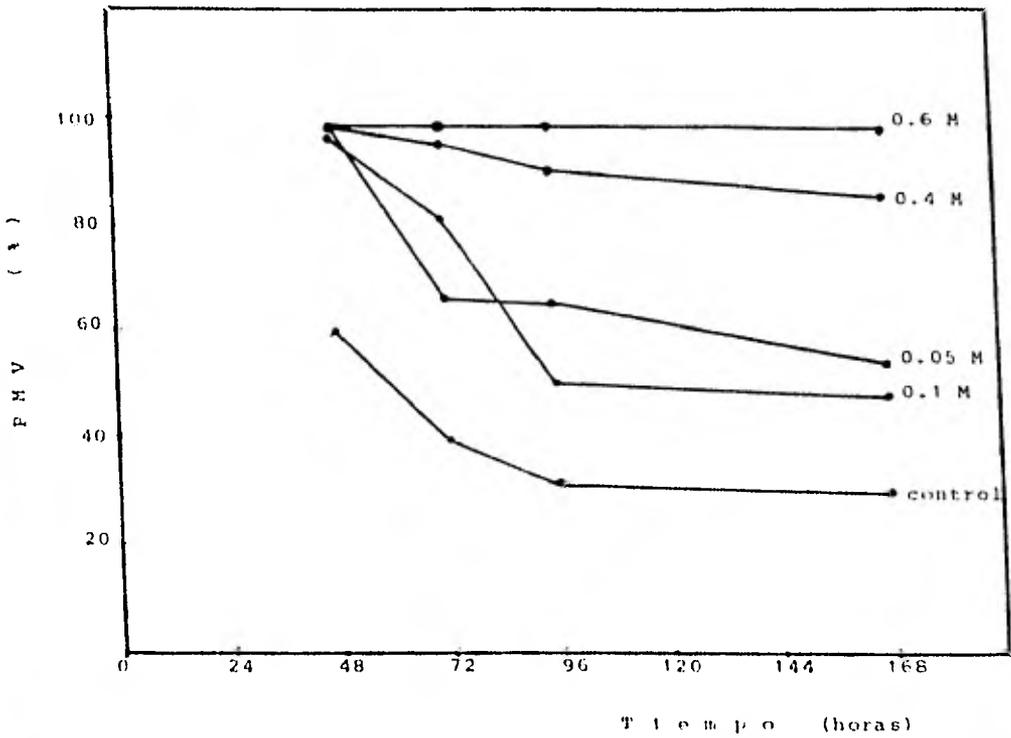


Figura 3.3.2 Efecto de la concentración inicial sobre la producción de eritromicina -- por Streptomyces erythreus.

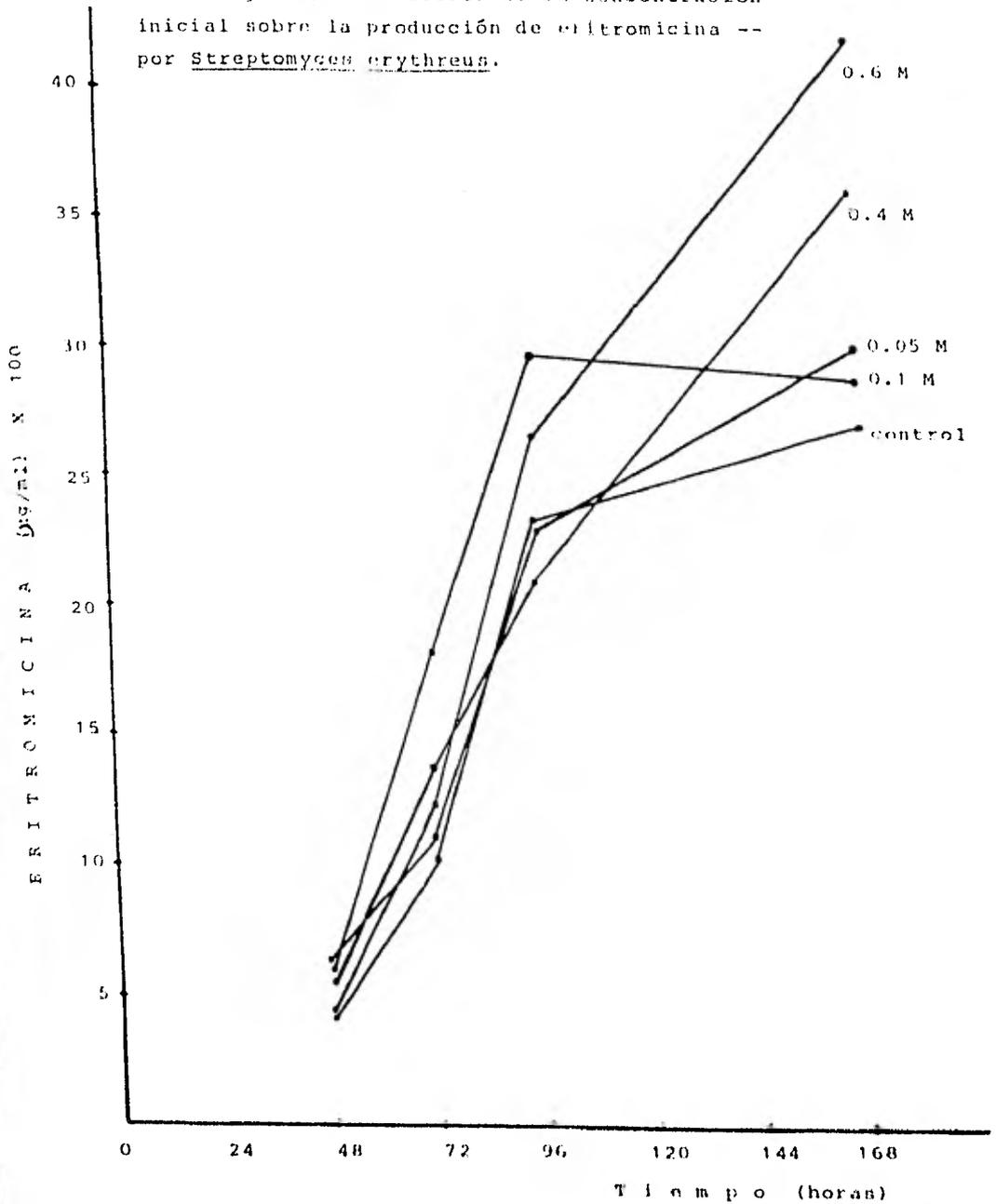


Tabla 3.3.1.1. Efecto de la adición de sacarosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Los datos presentados en la tabla muestran los resultados obtenidos sin adición de sacarosa.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina (µg/ml)
0	8.0	-	-	-
48	6.5	18	6.80	0
72	7.2	31	5.50	187
96	7.5	25	3.30	960
168	7.5	23	2.73	2798

- No se determinó.

Tabla 3.3.1.2 Efecto de la adición de sacarosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. La tabla muestra los resultados obtenidos al añadir 2 ml de una solución de sacarosa 0.05 M, la adición se efectuó a las 96 horas de haber iniciado la fermentación.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	8.0	-	-	-
48	6.5	18	6.8	0
72	7.2	31	5.5	187
96	7.5	25	3.3	960
168	7.5	22	1.2	3379

- No se determinó.

Tabla 3.3.1.3. Efecto de la adición de sacarosa sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Los datos de la tabla muestran los resultados obtenidos al adicionar 2 ml de una solución de sacarosa - 0.1 M, la adición se efectuó a las 96 horas de haber iniciado la fermentación.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	8.0	-	-	-
48	6.5	18	6.8	0
72	7.2	31	5.5	187
96	7.5	25	3.3	960
168	7.5	24	1.7	2887

- No se determinó.

3.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus.

Como fuente de nitrógeno se probaron el sulfato de amonio (la fuente usada normalmente en el medio de cultivo) y la urea.

El sulfato de amonio se usó en concentraciones de 0, 0.3 y 1.2 g/l; y en todos los casos se agregaron 2 ml de una solución de sacarosa 0.2 M. La adición se efectuó a las 96 horas de haber iniciado la fermentación. Los resultados se analizan a continuación:

La ausencia de sulfato de amonio en el medio de cultivo dió como resultado un ascenso en la producción de eritromicina (tabla 3.4.1.). A diferencia de los resultados de los experimentos anteriores el pH se mantuvo dentro de un rango muy estrecho 7.5-7.8. De las 72 horas en adelante se observó un fuerte incremento en la producción de eritromicina; a este tiempo hubo una disminución en el PMV que se prolongó hasta el final de la fermentación. En la concentración de azúcares totales se advirtió una disminución gradual alcanzándose un valor final de 1.5 %.

La tabla 3.4.2., muestra los valores de los parámetros indicados al usar una concentración de sulfato amonio 0.3-g/l. Claramente se observa un descenso en la producción de eritromicina en relación a los datos de la tabla anterior. Este --

descenso es más notorio a las 96 horas de haber iniciado la -- fermentación, encontrándose que para este periodo la concentración de azúcares totales es ligeramente menor que en el caso anterior. En el pH se advierte una caída durante las primeras 72 horas post-inoculación. La adición de sacarosa a las 96 horas estimuló el crecimiento micelial como se ve en la determinación de PMV a las 168 horas.

Al aumentar la concentración de sulfato de amonio a 1.2 g/l se observó una disminución muy marcada de la producción de eritromicina en relación a los resultados obtenidos en las 2 tablas anteriores. Este decremento se manifiesta desde el inicio de la fermentación; sin embargo es más evidente al final de ésta (tabla 3.2.3.). La disminución en la concentración de azúcares totales sigue un comportamiento similar al -- descrito en las tablas anteriores. La fermentación se inició con un pH de 7.8 y a partir de aquí disminuyó a 7.0, volviéndose se a incrementar a 8.0.

El incremento en la concentración de sulfato de amonio adición de sacarosa originó un efecto negativo en la producción de eritromicina; en tanto que el crecimiento micelial -- (PMV) fue estimulado.

El control de la utilización de las fuentes de nitrógeno por la célula en el metabolismo primario es un fenómeno -- ampliamente estudiado en algunos microorganismos. La actividad

específica de la enzima glutamino sintetasa de Neurospora crassa, varía en relación a la fuente de nitrógeno usada en el crecimiento del organismo; en una fuente de nitrógeno pobre tal como el glutamato, la actividad específica de la enzima es alrededor de 10 veces mayor que la encontrada en una fuente de nitrógeno más rica como la glutamina o el amoníaco. Estas diferencias en actividad corresponden a diferencias en concentración de la enzima; esta última es explicada por diferencias en la velocidad relativa de síntesis de la enzima (Quinto, et al 1977). El quimioautótrofo facultativo Thiobacillus novellus, elabora dos especies de enzimas glutamato deshidrogenasa; una específica para NADP y la otra para NAD; cuando este organismo se crece en glutamato o en nutrientes que generan glutamato (histidina y arginina), la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP se reprime, en tanto que la enzima dependiente de NAD se despreprime (LeJohn, et al 1968). En Neurospora, el glutamato es degradado y usado como fuente de energía en una reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD, la cual es químicamente distinta de la enzima dependiente de NADP y bajo el control de diferentes locus genéticos. El glutamato despreprime la enzima dependiente de NADP (citado por Shapiro y Stadman-1970). El amonio reprime la formación de muchas enzimas involucradas en la utilización de otras fuentes de nitrógeno; tales como la ornitina transaminasa la nitrito reductasa, la arginasa,

la treonina deshidratasa, acetoamidasa, nitrato reductasa, etc. La represión por amonio requiere además del ion NH_4 , 2-oxoglutarato y una enzima glutamato deshidrogenasa activa (específica - para NADP) (Dubois, et al 1974).

Estudios específicos de regulación catabólica por nitrógeno en la producción de antibióticos, no han sido reportados; sin embargo en la literatura se encuentran reportes que sugieren la presencia de un control a través de este mecanismo. - Smith et al (1962), encontró que la adición de sacarosa a un medio complejo de fermentación motivaba una renovación en la síntesis de eritromicina y la adición simultánea de harina de soya más sacarosa no ocasionaba dicho cambio. Martín y McDaniel (1975) encontraron resultados similares en la síntesis de candicidina al hacer adiciones repetidas de harina de soya a un medio complejo para su fermentación.

Los efectos reportados en este estudio posiblemente son debido a una desviación del metabolismo de secundario a metabolismo primario; en donde la energía y cofactores formados son utilizados en el proceso de crecimiento, evitándose la síntesis de la eritromicina. Como se mencionó en la introducción, - la formación de los intermediarios necesarios para la biosíntesis de las eritromicinas dependen de la vía del piruvato (citado por Páca, et al 1978). Esto junto con lo encontrado en este trabajo, sugiere que niveles bajos de nitrógeno en el medio de-

cultivo durante la síntesis del antibiótico evita que el piruvato sea utilizado en las reacciones de crecimiento, quedando este compuesto en disponibilidad para la formación de propionato u otros intermediarios de las eritromicinas. El nivel de nitrógeno en el medio de cultivo ha sido propuesto como uno de los mecanismos que controlan la formación de metabolitos secundarios, requiriéndose diferentes grados de limitación de este compuesto para disparar la síntesis de los distintos metabolitos secundarios (citado por Martín y McDaniel 1975).

El mecanismo por el cual el nitrógeno regula el cambio de metabolismo (primario a secundario o viceversa), es debido quizá a alguna de las siguientes causas: a). No permitiendo o solo parcialmente, la expresión de los genes involucrados en la síntesis del metabolismo secundario; b). Inhibe las enzimas que participan en la síntesis del metabolismo secundario; c). Controla la formación de intermediarios que participan en la síntesis de metabolitos secundarios.

En el siguiente experimento se probó el efecto de la urea como fuente de nitrógeno en el crecimiento y producción de eritromicina por Streptomyces erythreus, a continuación se discuten los resultados obtenidos.

A una concentración de 1.2 g/l la urea tiene un comportamiento paralelo (tanto en producción de eritromicina como en crecimiento), al observado cuando se usa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una con

centración de 2.4 g/l. En caso de exceder la concentración de urea arriba indicada se presenta un efecto inhibitorio en ambos parámetros (figura 3.4.1.).

Al incrementar la concentración de urea en el medio de cultivo a un nivel de 1.2 g/l el consumo de azúcares se detiene como es indicado por la concentración de éstos, manteniéndose constantes a partir de las 96 horas de haber iniciado la fermentación (figura 3.4.2.). Esto posiblemente se deba a que el crecimiento micelial (PMV) cae bruscamente a valores cercanos a cero (figura 3.4.3.). Sin embargo a una concentración de urea de 1.2 g/l el consumo de azúcares sigue un comportamiento muy similar al observado cuando se usa sulfato de amonio a la concentración del medio complejo de fermentación III. A concentraciones de 2.4 y 4.8 g/l de urea la fermentación se inició con un pH arriba de 8 (figura 3.4.4.), disminuyendo posteriormente a un nivel inferior a este valor, en tanto que a la concentración de urea 1.2 g/l la fermentación se inició con un pH de 8 disminuyendo a 6.5 a las 72 horas y a partir de aquí se volvió a incrementar.

Como fuente de nitrógeno la urea a concentraciones arriba de 1.2 g/l en las condiciones probadas tiene un efecto inhibitorio, que se manifiesta en la producción de eritromicina. Este efecto quizá se deba al bajo crecimiento micelial registrado como se deduce de las determinaciones de PMV y concentración

de azúcares totales o tal vez a los pH elevados al inició de la fermentación. No existen estudios reportados en donde se haya usado la urea como fuente de nitrógeno para la producción de -- eritromicina; por lo cual no se pueden hacer comparaciones con los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 3.4.1. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Al medio complejo de fermentación III sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se le adicionaron 2 ml de una solución de sacarosa 0.2 M. La adición se efectuó a las 96 horas de haber iniciado la fermentación.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	7.7	-	-	-
48	7.8	44	5.5	564
72	7.6	27	4.9	1610
96	7.5	23.5	3.4	2683
168	7.6	10	1.5	3974

- No se determinó.

Tabla 3.4.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Al medio complejo de fermentación III, conteniendo 0.3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se le adicionaron 2 ml de una solución de sacarosa 0.2 M. La adición se efectuó a las 96 horas de haber iniciado la fermentación.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	7.8	-	-	-
48	7.7	44	5.6	403
72	6.5	34	4.4	1062
96	7.4	27	2.4	2043
168	7.6	32	1.5	3402

- No se determinó

Tabla 3.4.3 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de eritromicina por S. erythreus. Al medio complejo de fermentación conteniendo 1.2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se le adicionaron 2 ml de una solución de sacarosa 0.2 M. La adición se efectuó a las 96 horas de haber iniciado la fermentación.

Tiempo (horas)	pH	PMV (%)	Azúcares totales (%)	Eritromicina ($\mu\text{g/ml}$)
0	7.8	-	-	-
48	7.6	44	5.5	317
72	7.2	33	4.4	1154
96	7.0	23	2.8	1958
168	8.0	35	1.5	2843

- No se determinó

Figura 3.4.1. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de eritromicina por Streptomyces erythreus.

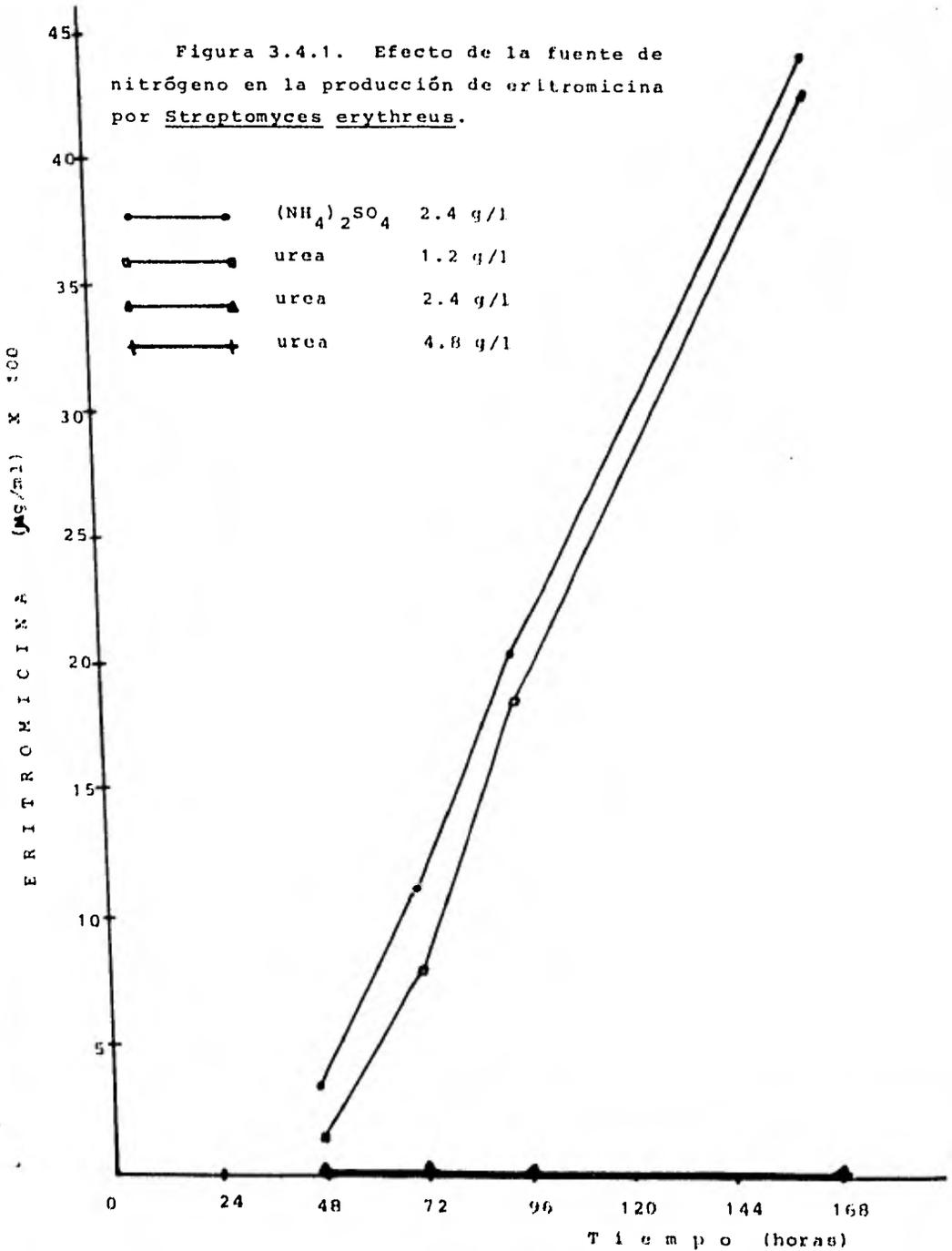


Figura 3.4.2. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el consumo de azúcares por *S. erythreus*.

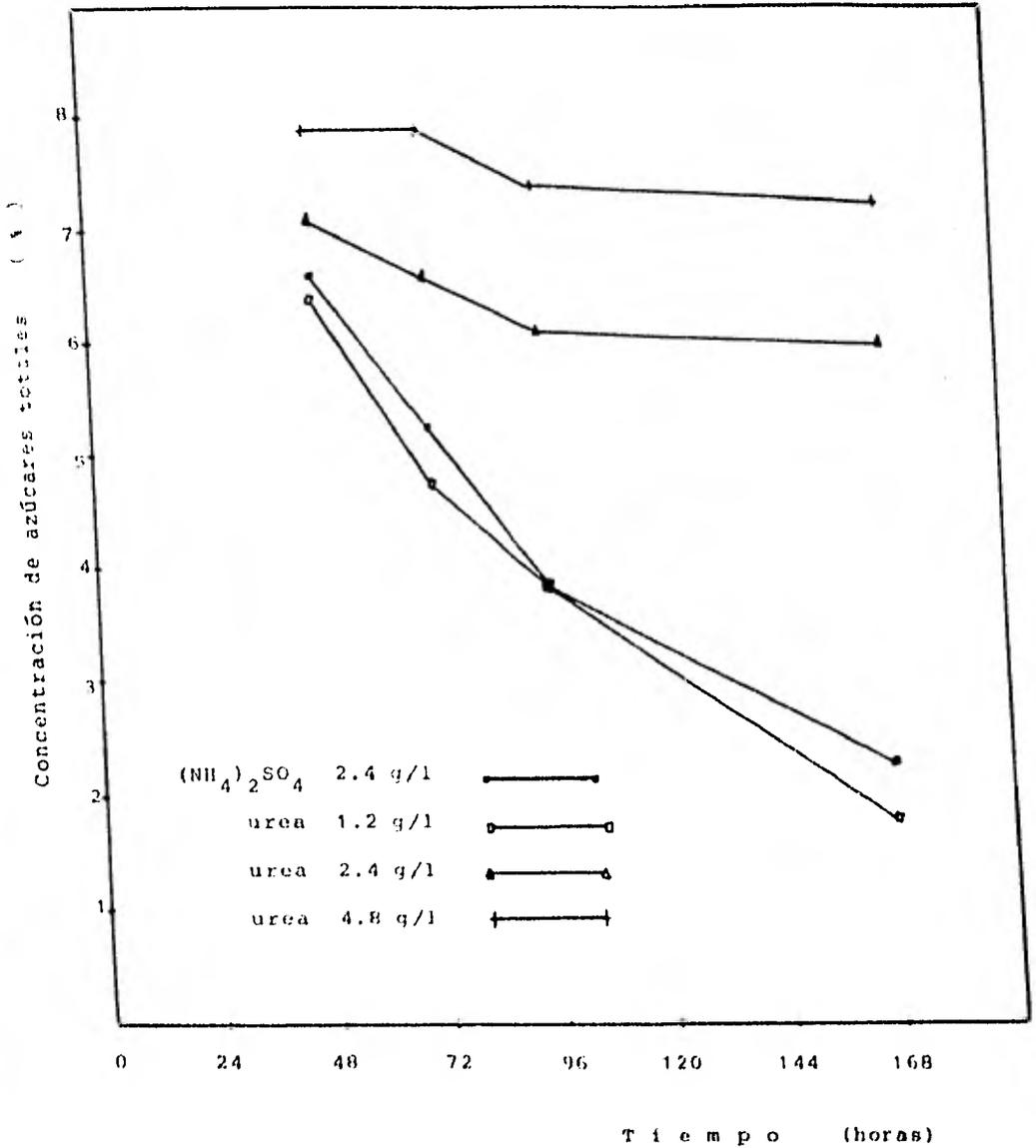


Figura 3.4.3. Efecto de la urea sobre el crecimiento micelial (PMV) de *S. erythraea*.

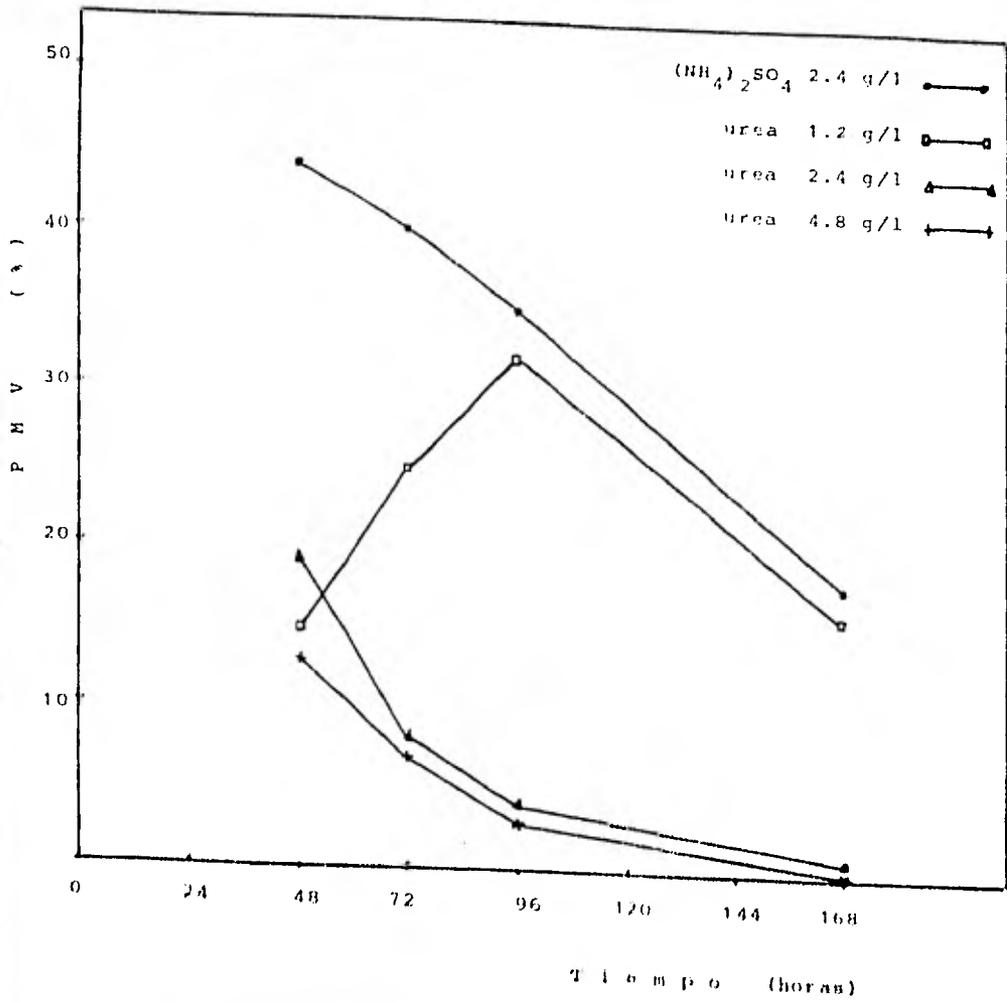
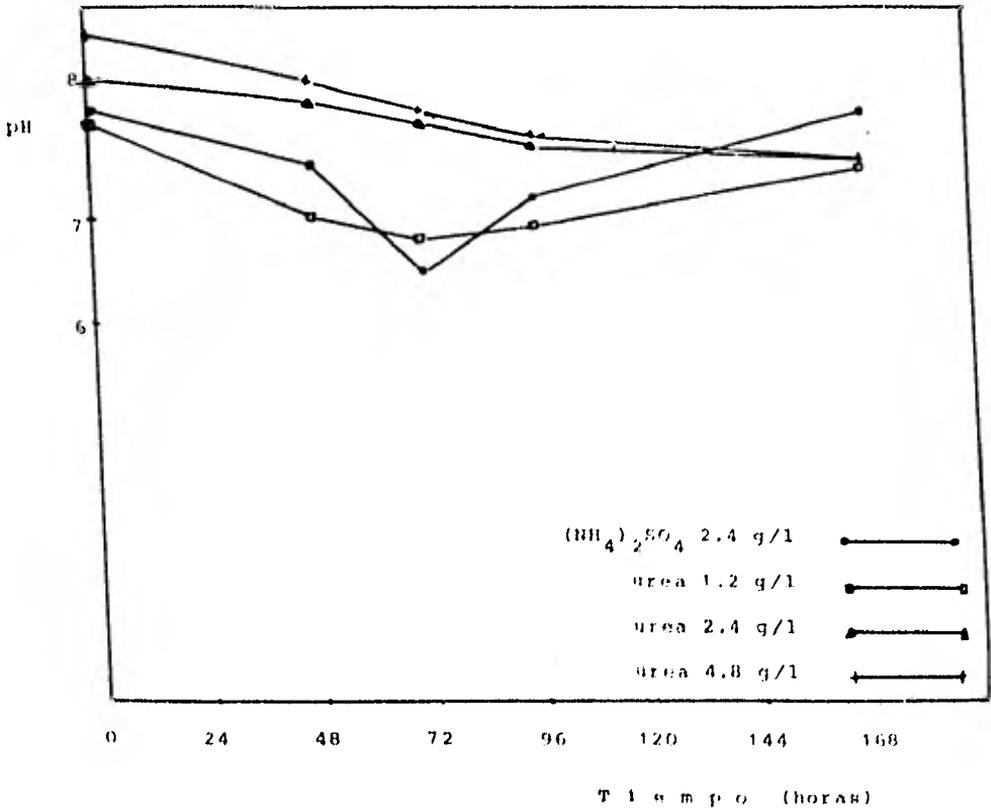


Figura 3.3.4. Curso del pH en la fermentación de eritromicina por *S. erythraeus*, usando urea y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.



3.5 Evaporación del medio de cultivo fermentativo III.

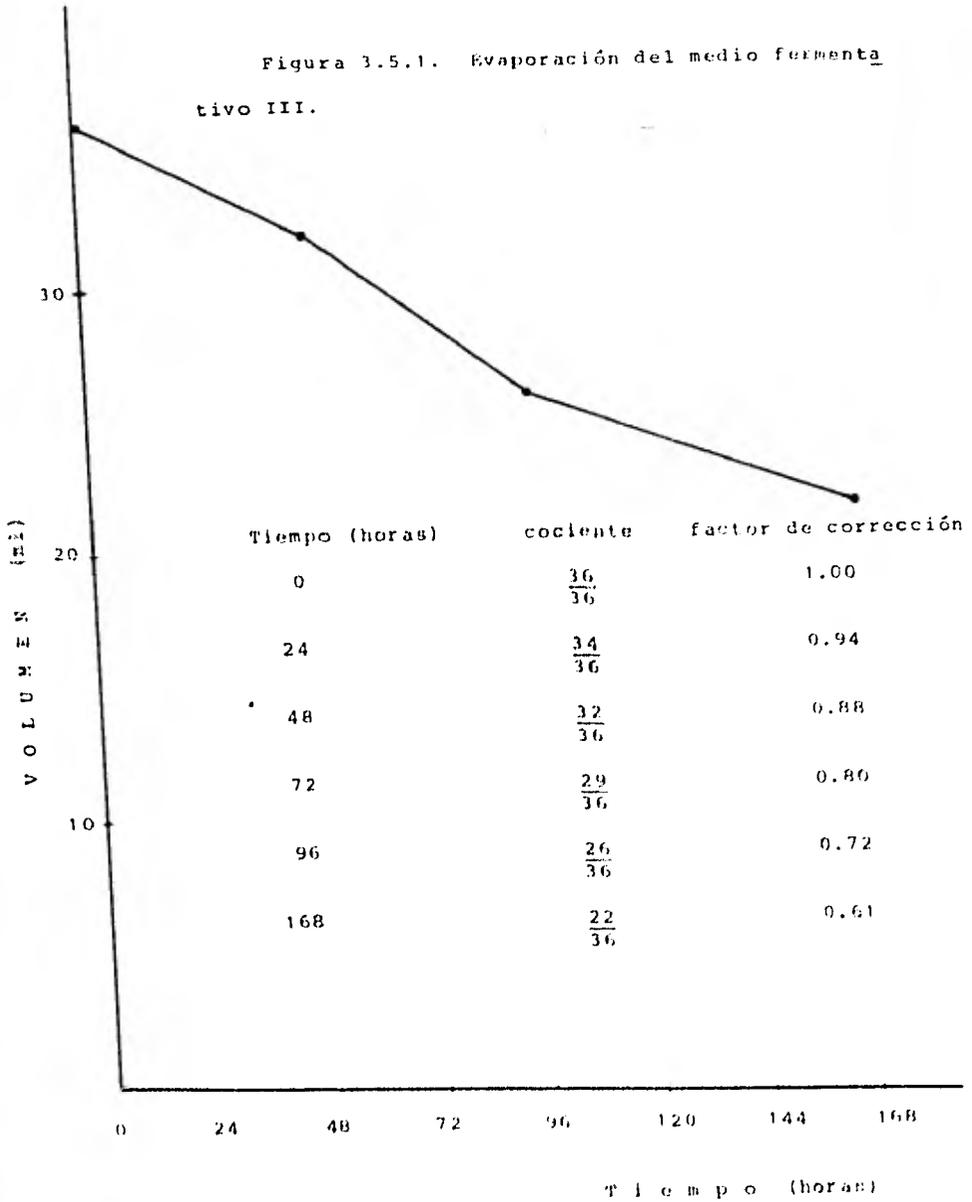
Se noto que la evaporación en experimentos de este tipo (7 días a 34 °C), es una variable importante por la cual deben corregirse los resultados. Para ello se realizó un experi--mento en matraces erlenmeyer de 500 ml conteniendo 40 ml de medio de cultivo fermentativo III, sin inocular. Los matraces fueron incubados en las condiciones indicadas en la sección de materiales y métodos; retirandose a diferentes tiempo con el fin--de cuantificar el cambio en volumen. Los resultados se encuen--tran graficados en la figura 3.5.1. Esta figura muestra que la pér--dida de agua por evaporación es bastante considerable, alcanzándose en ocasiones hasta un 40 % en la fase final de la fer--mentación.

El cambio en volumen por evaporación en matraces agitados ya ha sido descrito con anterioridad (Solomons, 1969); sin embargo, se le ha prestado poca atención no obstante la impor--tancia que presenta; ya que ésto puede causar diferencias en la interpretación de los resultados, en las fermentaciones con matraces agitados.

Wang,H (1979), encontró que la pérdida de agua debida a la evaporación en matraces agitados, está influenciada por el tipo de tapón usado, así como por la temperatura de incubación y velocidad de agitación, siendo independiente del volumen inicial del medio de cultivo.

Los experimentos realizados en este trabajo fueron corrregidos por evaporación mediante un factor de corrección el -- cual fue obtenido de los resultados graficados en la figura - - 3.5.1., al dividir el volumen encontrado a determinado tiempo - entre el volumen inicial. Este factor se uso para corregir los- resultados de concentración de azúcares totales y eritromicina, multiplicandose por el valor del parámetro a corregir.

Figura 3.5.1. Evaporación del medio fermentativo III.



4. CONCLUSIONES.

4.1. De los medios de cultivo probados el medio fermentativo III, resultó ser el más apropiado tanto para el crecimiento como para la producción de eritromicina, alcanzándose valores de 2555 $\mu\text{g/ml}$ en 96 horas de fermentación.

4.2. Los fosfatos inorgánicos muestran que a concentraciones iniciales bajas de 4 mM o adiciones a diferentes - - tiempos (48 y 96 horas) durante la fermentación se presenta un efecto negativo en la producción de eritromicina.

4.3. Cuando se usa glucosa como fuente de carbono se observa que a concentraciones mayores de 0.05 M, parece haber un efecto estimulador, debido al aumento de biomasa (PMV). - El nivel de azúcares en el medio debe ser alto para mantener - el crecimiento y producción del antibiótico.

4.4. La adición de sacarosa al final de la fase de - fermentación al parecer restablece la producción de eritromicina ya que se observa un incremento en la concentración de ésta a las 168 horas posteriores a la inoculación.

4.5. La limitación de una de las fuentes de nitrógeno como es el sulfato de amonio y adición de sacarosa al final de la fermentación, favorece la producción de eritromicina.

4.6. Como fuente de nitrógeno la urea es adecuada en concentraciones menores a 1.2 g/l. En caso de exceder este valor y en las concentraciones probadas existe un efecto inhibitorio en el crecimiento y producción de eritromicina.

4.7. Cuando no se mantiene la humedad relativa constante, en las condiciones probadas; es necesario corregir los resultados debido al cambio de volumen del medio de cultivo -- que ocurre en el transcurso de la fermentación.

5. APENDICE A.

5.1. Tratamiento de las muestras para la determinación de los parámetros de la fermentación.

5.1.1. Determinación de eritromicina en el caldo de fermentación.

Reactivos.

a.- Acido sulfúrico 27 N. Adicionar 750 ml de ácido sulfúrico grado reactivo (gravedad específica 1.84) a 250 ml de agua destilada; lentamente, agitando y enfriando.

b).- Buffer de carbonatos, pH 9 (0.1 M). Disolver 7.47 gramos de bicarbonato de potasio monobásico y 6.84 gramos de fosfato de potasio dibásico trihidratado en agua destilada, llevarlos a 500 ml.

c).- HCl 0.1 N.

Preparación de las muestras.

Remover el aire del caldo de fermentación dejando agitar 15 minutos, tomar 1 ml de caldo con una pipeta colocarlo en un matraz de 100 ml; lavar la pipeta con buffer pH 9 (el lavado se agrega al matraz). Posteriormente aforar con el mismo buffer.

A continuación adicionar a un embudo de separación 20 ml de acetato de isobutilo y 20 ml de la muestra diluida, agi--

tar vigorosamente por 30 segundos.

Del sobrenadante tomar 10 ml y vaciar en otro embudo de separación que contenga 10 ml de HCl 0.1 N, agitar vigorosamente por 30 segundos. La parte inferior vaciarla en un tubo de ensaye y de éste tomar una alícuota de 5 ml al que se le -- agregan 5 ml de H₂SO₄ 27 N.

Después de 30 minutos se lee la absorbancia a 485 nm, usando como blanco agua destilada.

Curva standard., ver figura 5.1.1.1.

5.1.2. Determinación de azúcares totales en el caldo - de fermentación.

Reactivos.

a).- Reactivo de antrona. Adicionar a un matraz de 2000 ml; 330 ml de agua destilada (fria 4°C), agitar y adicionar 760 ml de H₂SO₄. Posteriormente adicionar 1 g de antrona agitar hasta disolver (el color de la solución debe ser amarillo paja).

b).- Acido clorhídrico concentrado

Determinación.

Tomar 5 ml de caldo de fermentación y colocar-- los en un matraz aforado de 100 ml lavando la pipeta con agua-- destilada, aforar con la misma y agitar vigorosamente. De este matraz tomar una alícuota de 5 ml y llevarla a un tubo de ensa

ye; a continuación adicionarle 1 ml de HCl concentrado. Colocar al tubo en un baño de agua a ebullición durante 22 minutos; adicionar 20 ml de agua destilada para enfriar. La solución se filtra en papel filtro número 615 y se recibe en un matraz aforándose con agua destilada, agitar vigorosamente.

De la solución preparada arriba, tomar 2 ml en un tubo de ensayo, a la cual se le adicionan 10 ml de reactivo de antrona, agitando posteriormente por 10 segundos; al mismo tiempo se prepara un blanco, poniendo 2 ml de agua destilada y 10 ml de reactivo de antrona. El blanco y muestra se colocan en un baño de agua a ebullición durante 12 minutos; después de los cuales se enfrían en hielo. Leer absorbancia a 622 nm. La curva estándar se prepara a partir de una solución patrón de 1 mg/ml - ver figura 5.1.2.1.

Figura 5.1.1.1. Curva estandard para eritromicina
(Método químico; Jared, H.F. et al 1953). λ 485 nm.

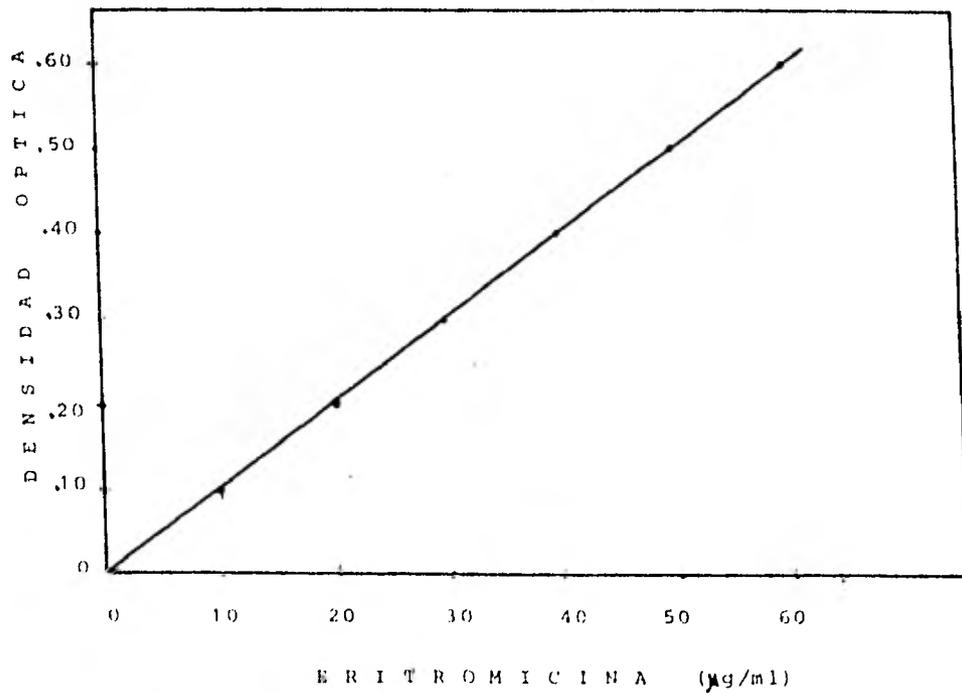
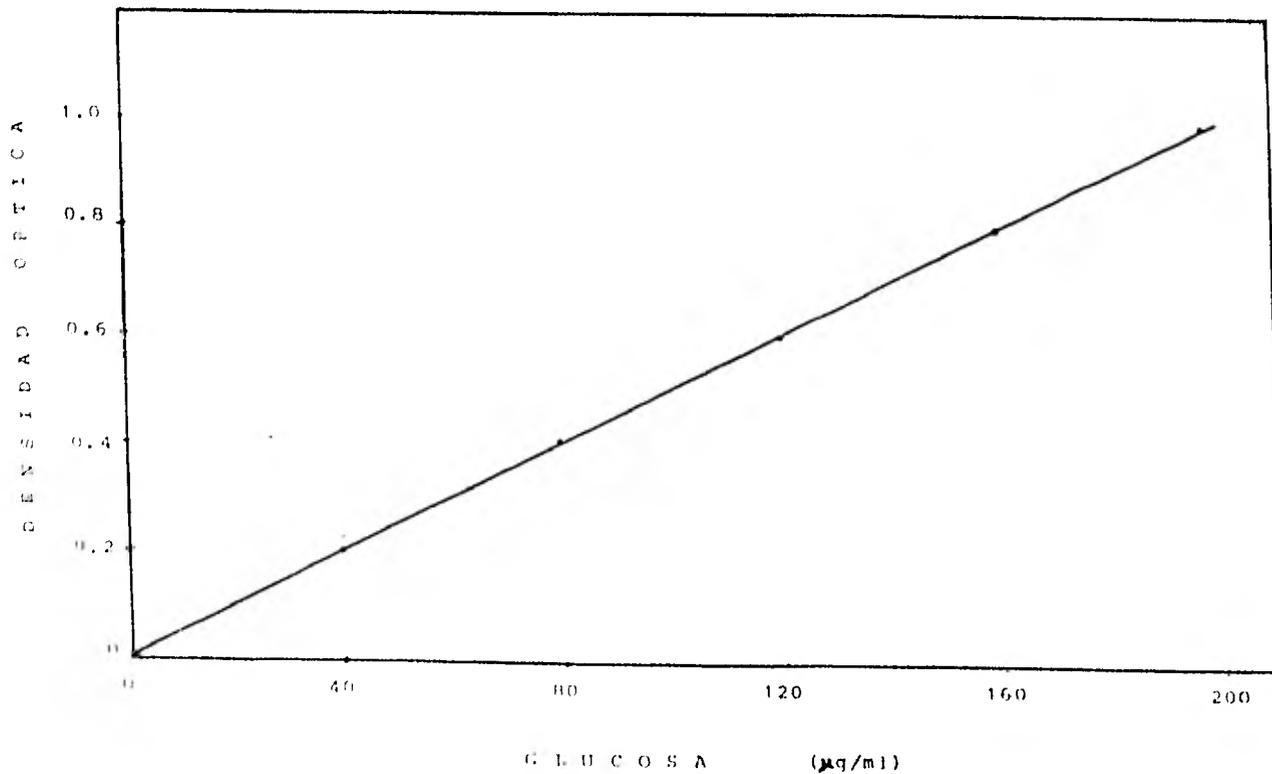


Figura 5.1.2.1. Curva estandard para azúcares totales
(Método de la antrona; Keleti y Leaderer 1974) 622 nm.

109



6. BIBLIOGRAFIA.

- Basak, k. y Majumdar, S.K. (1973). Utilization of Carbon and Nitrogen Sources by Streptomyces Kanamyceticus for Kanamycin - Production. Antimicrob. Agents Chemother. 4, 6-10.
- Bosnjak, M., Holjevac, M. y Johaniden, V. (1976b). Erythromycin - Biosynthesis in Semicontinuous Culture of Streptomyces erythreus. J. appl. Chem. Biothechnol. 26, 333-334.
- Bosnjak, M., Vrana, M. y Topolovec, V. (1976a). Growth Kinetics of Streptomyces erythreus During Erythromycin Biosynthesis. - ABSTRACTS: Fifth International Fermentation Symposium. Berlin Sección 12. p. 219.
- Bosnjak, M., Topolovec, V y Holjevac, M. (1977). Simulation of Microbial Population Differentiation During the Process of Antibiotic Biosynthesis. Proc 12th Yug, Intern. Symp. Processing Informatica 77 (6 219). 1-4.
- Bosnjak, M., Topolovec, V. y Vrana, M. (1978). Growth Kinetics of Streptomyces erythreus During Erythromycin Biosynthesis. - J. appl. Chem. Biothechnol. 28, 791-798.
- Brinberg, L.S., Yudina, O.D., Grodzenskaya, S.F., Korchagin, V.B. - Vagina, I.M. y Sapozhnikov, Y.M. (1976). Gas-Liquid Chromatography Studies on Dynamics of n-Propil alcohol Consumption by

- Act. erythreus During Erythromycin Biosynthesis. Antibioti-
ki. 21, 27-30.
- Corcoran, J.W. (1973). Genetic Considerations and Erythromycin-
Production by Streptomyces erythreus. Genetics of Industrial
Microorganisms, Actinomycetes and Fungi. Vol 2. Elsevier. -
Amsterdam. 339-351.
- Corcoran, J.W. (1974). Lipid and Macrolide Biosynthesis in ---
Streptomyces erythreus. Developments in Ind. Microbiology.-
15, 93-100.
- Corcoran, J.W. (1975). S-Adenosylmethionine: Erythromycin C- O-
Methyltransferase. Methods in Enzymology. 43, 487-498.
- Corum, C.J., Stark, W.M. y Bird, H.L. (1954). Biochemical Changes
in a Chemically Defined Medium by Submerged Cultures of - -
Streptomyces erythreus. Applied Microbiology. 2, 326-329.
- Curcie, M., Lazić, B., Bosnjak, M. y Bosnjak, N. (1976). Modelling
of Precursor Consumption Dynamics in the Process of Erythro-
mycin Biosynthesis. Informatika 76 (Bled), 6 111, 1-5.
- Demain, A.L. (1972). Cellular and Environmental Factors Affecting
the Synthesis and Excretion of Metabolites. J. appl. Chem. -
Biotech. 22, 345-362.

- Demain, A.L. e Inamine, E. (1970). Biochemistry and Regulation of Streptomycin and Mannosidostreptomycinase (α -D-Mannosidase)-Formation. *Bacteriol, Review.* 34, 1-10.
- Dubois, E., Grenson, M. y Wiame, J.M. (1974). The Participation of the Anabolic Glutamate Dehydrogenase in the Nitrogen Catabolite Repression of Arginase in Saccharomyces cerevisiae. -- *Eur. J. Biochem.* 48, 603-616.
- Ettler, P. y Votruba, J. (1978). Regulation of Erythromycin Fermentation. ABSTRACTS: Eur. Congress on Biotechnology. Interlaken, Suiza. 62-64.
- Faulker, D.J. (1978). Antibiotics from Marine Organisms. Topics in Antibiotic Chemistry. Vol. 2. John Wiley & Sons. Nueva York. 9-52.
- Friedeman, S.M., Kaneda, T. y Corcoran, J.W. (1964). Antibiotics -- Glycosides: A Comparison of 2-Methylmalonate and Propionate As Precursors of the C₂₁ Branched Chain Lactone in Erythromycin. *J. Biol. Chemistry.* 239, 2386-2391.
- Gallo, M. y Katz, E. (1972). Regulation of Secondary Metabolite -- Biosynthesis: Catabolite Repression of Phenoxazinone Synthetase and Actinomycin Formation by Glucosa. *J. Bacteriol.* 109, 659-667.

- Gersch, D., Skurk, A. y Romer, W. (1979). Phosphate Inhibition of Secondary Metabolism in Streptomyces hygroscopicus and its Reversal by Cyclic AMP. Arch. Microbiol. 121, 91-96.
- Glasby, S.J. (1978). Enciclopedia de los Antibióticos. AC. Madrid 306-309.
- Goulden, S.A. y Chattaway, F.W. (1969). End-product Control of -- Acetohydroxyacid Synthetase by Valine in Penicillium chrysogenum Q 176 and a High Penicillin-Yielding Mutant. J. Gen. Microbiol. 59, 111-118.
- Grisebach, H. (1978). Biosynthesis of Macrolide Antibiotics. -- Antibiotics and Other Secondary Metabolites. Biosynthesis and Production. Academic Press. San Francisco. 113-127.
- Gros, I., Bosnjak, M., Johanides, V. y Topolovec, V. (1978). Autolysis of Streptomyces erythreus. ABSTRACTS: First Eur. Congress on Biotechnology. Interlaken, Suiza. 66-69.
- Haavik, H.I. (1974). Studies on the Formation of Bacitracin by - Bacillus licheniformis: Role of Catabolite Represión by Glucosa and Organic Acids. J. Gen. Microbiol. 84, 321-326.
- Holjevac, M. y Vlasić, D. (1976). Studies on Kinetics of n-Propanol Uptake and Propionate Kinase Activity in Streptomyces erythreus. ABSTRACTS: Fifth International Fermentation Symposium. Berlin. Sección 8. p. 145.

Hung, P.P., Marks, C.L. y Tardrew, P.L. (1965). The Biosynthesis and Metabolism of Erythromicins by Streptomyces erythreus.

J. Biol. Chem. 240, 1322-1326.

Jared, H.F., Prescott, G.C., Hinman, J.W. y Caron, E.L. (1953).

Colorimetric Determination of Erythromycin. Anal. Chem. 25, -1195-1197.

Keleti, G. y Leaderer, W.H. (1974). Handbook of Micromethods -- for the Biological Sciences. Van Nostrand Reinhold. Toronto. P. 73.

Kimura, A. (1967). Agr. Biol. Chem. 31, 845-452.

Küenzi, M.T. (1978). Process Design and Control in Antibiotic - Fermentations. Antibiotics and Other Secondary Metabolites.- Biosynthesis and Production. Academic Press. San Francisco - 39-56.

Léjohn, B. y McCrea, B.E. (1968). Evidence for Two Species of Glutamate Dehydrogenases in Thiobacillus novellus. J. Bacteriol. 95, 87-94.

Liu, C.M., McDaniel, L.E. y Schaffner, C.P. (1975). Factors Affecting the Production of Candicidin. Antimicrobial Agents - Chemotherapy. 7, 196-202.

- Lutz, A., Grooten, O. y Hoffer, J. (1957). Evolution et Modifications de la Resistance des Staphylocoques Pathogenes a Six Antibiotiques Usueles de 1950 a 1956. L'action Comparée in vitro de L'erythromycine, de la Magnamycine, de la Spiramycine, de la noviocine (Albanycine) et de L'oleandomycine. Ann. Inst. Pasteur. 92, 778.
- Magasanik, B. (1961). Catabolite Represión. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26, 249.
- Majer, J., Martin, J.R., Egan, R.S. y Corcoran, J.W. (1977). Antibiotics Glycosides. 8. Erythromycin D, a New Macrolide Antibiotic. J. Am. Chem. Soc. 99, 1620-1622.
- Mao, J.C.H. y Putterman, M. (1969). The Intermolecular Complex of Erythromycin and Ribosome. J. Mol. Biol. 44, 347-361.
- Martín, J.F. (1977). Control of Antibiotic Synthesis by Phosphate. Advances in Biochemical Engineering Vol. 6. Springer-Verlag Nueva York, 105-125.
- Martín, J.F. (1978). Manipulation of Gene Expression in Development of Antibiotic Production. Antibiotics and Other Secondary Metabolites. Biosynthesis and Production. Academic Press. San Francisco. 19-37.
- Martín, J.F. y McDaniel, L.E. (1974). Dev. Ind. Microbiol. 15, 324-337.

- Martín, J.F. y McDaniel. L.E. (1975). Kinetics of Biosynthesis of Polyene Macrolide Antibiotics in Batch Cultures: Cell Maturation Time. *Biotechn. Bioengineering.* 17, 925-938.
- Martín J.F. y McDaniel, L.E. (1977). Production of Polyene Macrolide Antibiotics. *Advances in appl. Microbiol.* 21, 2-52.
- Martín, J.R., Egan, R.S., Goldstein. A.W. y Collum. P. (1975).-- Extension of the Erythromycin Biosynthetic Pathway: Isolation and Structure of Erythromycin E. *Tetrahedron.* 31, - - - 1958-1989.
- Martín, J.R. y Goldstein, A.W. (1970). Final Steps in Erythromycin Biosynthesis. *Progress in Antimicrobial and Anticancer - Chemotherapy. Vol. 2.* 1112-1116.
- Martín, J.R., Perun, J.T. y Girolami, L.R. (1966). Studies on the Biosynthesis of the Erythromycin. I. Isolation and Structure of an Intermediate Glycoside, 3- α -L-Mycarosylerythronolide B. *Biochemistry.* 5, 2852-2856.
- Musilek, V. y Seveik, J. (1961). Effect of Acetate, Formate and Propionate on Biosynthesis of Erythromycin. *Antibiotiki.* 6, 887-891.
- Oleinick, N.L. (1975). The Erythromycins. *Antibiotics. Vol. 3.* Springer-Verlag. Nueva York. 396-419.

- Oleinick, N.L. y Corcoran, J.W. (1969). Two Types of Binding of Erythromycin to Ribosomes from Antibiotic-Sensitive and-Resistant Bacillus subtilis, J. Biol. Chem. 244, 727.
- Oleinick, N.L., Wilhelm. J.M. y Corcoran, J.W. (1968). Nonidentity of the Site Action of Erythromycin A and Cloramphenicol on Bacillus subtilis Ribosomes. Biochem. Biophys. Acta. 155, 290-292.
- Páca, J., Ettlér. P. y Gregor, V. (1978). Oxygen Transfer Rate - in Media Used for Erythromycin Biosynthesis. J. Ferment. Technol. 56, 144-151.
- Pirt, J.S. (1975). Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific. Londres. P. 17.
- Quinto, C., Mora, J., Palacios, R. (1977). Neurospora crassa.-- Glutamine Synthetase; Role of Enzyme Synthesis and Degradation on the Regulation of Enzyme Concentration During Exponential Growth. J. Biol. Chem. 252, 8724-8727.
- Robbers. J.E., Robertson, L.W, Hornemann, K.M., Jindra, A. y -- Floss, H.G. (1972). Physiological Studies on Ergot: Further - Studies on the Induction on Alkaloid Synthesis by Tryptophan and Its Inhibition by Phosphate. J. Bacteriol. 112, 791-796.

- ánchez, S. y Smiley, K.L. (1975). Properties of D-Xilosa Isomerase from Streptomyces albus. Applied Microbiology. 29, - - 745-750.
- Sankaran. L. y Fogell, B.H. (1975). Bioynthesis of Puromycin in Streptomyces alboniger: Regulation and Properties of O-Demethylpuromycin O-Methyltransferase. Antimicrob. Agents Chemother. 8, 721-732.
- Shapiro, B.M. y Stadtman, R.E. (1970). The Regulation of Glutamine Synthesis in Microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 24, - 501-524.
- Simon. P. y Meunier, R. (1970), Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique. Masson. Paris. P. 452.
- Smith. R.L. Bungay, H.R. y Pittenger, R.C. (1962). Growth Biosynthesis Relationships in Erythromycin Fermentation. Applied Microbiology. 10, 293-296.
- Smith, C.G. y Hinman, J.W. (1963). Prog. Ind. Microbiol. 4, 137-163.
- Solomons, G.L. (1969). Materials and Methods in Fermentations. Academic Press. San Francisco.

- Sprinkmeyer, H. y Pape, H. (1977). ABSTRACTS: Fifth Symposium - of the Federation of European Microbiological Societies. Basel, Suiza.
- Stainer, Y.R., Adalberg, E.A. y Ingraham, J. (1976). The Microbial World. Prentice-Hall. Nueva Jersey. 845-847.
- Stark, W.M. y Smith, R.L. (1961). The Erythromycin Fermentation. Prog. Ind. Microbiol. 3, 211-229.
- Tanakas, S., Otaka, T. y Kaji, A. (1973). Futher Studies on the Mechanism of Erythromycin Action. Biochem. Biophys. Acta. -- 331, 128-140.
- Vygantas, A.M. y Corcoran, J.W. (1974). Fed. Proc. 33, 1233.
- Wang, H.Y. (1979). Volume Change During Aerobic Fermentations.- Biotechnol. and Bioengineerir. 21, 525-532.
- Weinberg, E.D. (1974). Dev. Ind. Microbiol. 15, 70.
- Withey, F.R., Failla, M.L. y Weinberg, E.D. (1977). Phosphate - Inhibition of Secondary Metabolism in Serratia marcescens. - Appl. Environ. Microbiol. 33, 1042-1046.
- Zähner, H. (1978). The Search for New. Secondary Metabolites. - Antibiotics and Other Secondary Metabolites. Biosynthesis and Production. Academic Press. San Francisco. 1-17.

Zähler, H. y Mass, W.K. (1972) Biology of Antibiotics. Springer
Verlag. Nueva York. 34-61.