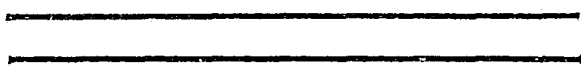


Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EVALUACION QUIMICA DE OXITETRACICLINA

EN CALDOS FERMENTADOS

TRABAJO MONOGRAFICO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A:

LINO GENARO LOPEZ LUNA

1 9 8 3



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.

DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS DE OXITETRACICLINA EN CALDOS FERMENTADOS

- 1.- Introducción
- 2.- Generalidades
- 3.- Planteamiento del Problema
- 4.- Trabajo Experimental
- 5.- Conclusiones
- 6.- Bibliografía

INTRODUCCION

El objeto de este trabajo es demostrar que se puede encontrar y desarrollar diferentes formulaciones de medios de cultivo para llevar a cabo una fermentación. Además del enfoque que tiene, que es principalmente práctico, es decir, mas que bases altamente técnicas, se trata de seguir caminos por el método de "Prueba y Error"

Partiendo de que se dispone de una gran variedad de materias primas ricas en Carbono, Nitrógeno o bien Vitaminas, se pueden intentar combinaciones con el número de componentes que se quiera. En la actualidad se tienen formulaciones optimizadas (1), (2), (3), (4), para microorganismos específicos que se pueden obtener fácilmente en el mercado.

En el presente trabajo primero se hace mención de lo que es un medio de cultivo, de sus constituyentes y en que forma intervienen, y además algunos criterios para prepararlos. Enseguida se habla de su inoculación, algunos parámetros importantes que son necesarios controlar. Posteriormente se tratan las técnicas conocidas para determinar el antibiótico, generalidades sobre la espectroscopía, técnicas aplicadas para cuantificar los antibióticos y técnica aplicada para el presente antibiótico.

En sí, lo que se quiere es proponer cualquier otra y estudiar el comportamiento de algún microorganismo en la misma.

GENERALIDADES

El tipo de fermentación que nos ocupa es del tipo no alcohólica a nivel de laboratorio, donde trabajando a esta escala, hoy en día, es muy común encontrar excelentes medios de cultivo ya preparados (1), (2), (3); para aislar un microorganismo o procurar su crecimiento en tubos de cultivo, el alto costo de estos medios queda mas que compensado por la reproducibilidad y fácil uso de los mismos. Sin embargo, cuando las fermentaciones son llevadas a cabo a nivel industrial, el querer usar los medios de cultivo antes mencionados, resulta antieconómico. Consecuentemente, cuando se requieren grandes cantidades de medio de cultivo, es necesario encontrar alternativas a las fuentes nutrientes de que se disponen, obviamente tales materiales serán mucho mas baratos pero no serán tan puros u homogéneizables como los del laboratorio (5).

La inflación, recesión y barreras comerciales, problemas de crédito o efectivos, originan una serie de dificultades para las compañías productoras. Una compañía de fermentación debe trabajar intensamente en la optimización de sus costos y economía de sus substratos.

Siempre hay presiones para encontrar un substrato mas barato o mejor, pero, ¿Qué significa más barato? El nuevo substrato o materia prima puede presentar problemas de almacenamiento, puede ser difícil su esterilización, o puede tener alguna variación no deseada en su composición. Y, ¿Qué significa mejor? El que incremente la productividad no es suficiente argumento para ser usado, ¿Tendrá el substrato algún residuo que causará problemas después de terminado el proceso de fermentación? La formulación y desarrollo de medios de cultivo es una de las etapas más importantes en los programas de fermentación; en esencia, se trata de encontrar y optimizar los parámetros metabólicos del microorganismo en estudio, pero ya que los conocimientos actualmente pueden ser muy limitados, según el microorganismo de que se trate, el desarrollo de la optimización de esos parámetros, se hace con bases ad hoc; aunque los principios o teorías que constantemente aparecen pueden incorporarse a los trabajos paralelamente.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Medios de Cultivo.- Como consecuencia de ésta revisión, se debe estar consciente de que gran cantidad de información acerca de los medios de cultivo o substratos por considerar, sus formulaciones y combinaciones son guardadas celosamente por las compañías como secretos; lo publicado es una pobre referencia para citarse. Una lectura a la literatura refuerza este punto de vista así como las muchas referencias o patentes que normalmente son de U.S.A. o de Europa Occidental. Quizas, si bien, esto refleja la nueva forma de pensar, la cual viene de aquellos países donde los conceptos de tiempo-honorarios, pueden ser un desafío y que cualquier innovación (o descubrimiento) se pruebe experimentalmente con rapidez. Sin embargo, una serie de pasos generales y por demás obvios, pueden ser llevados a cabo para obtener un medio adecuado (5).

Disponibilidad de un Medio de Cultivo.- Un substrato debe estar disponible el mayor tiempo posible en el año. Los productos que se cosechan por temporada de los cuales, los productos de desecho son frecuentemente usados, no se recomienda si la época de cosecha o abundancia es corta y los materiales para ser usados están sujetos a contaminaciones y pudieran hecharse a perder. Así, las industrias deben tener un substrato el cual sea realmente estable y pueda ser almacenado sin problemas por un tiempo razonable, de seis a nueve meses si se hace necesario. Sin embargo, algunos procesos de fermentación están concebidos como dependientes de otras industrias y la fermentación no es por lo tanto un medio de exentarse de dificultades, el producto de la fermentación es generalmente una levadura de grado alimenticio o un microhongo (6). Muchos de esos productos de desecho pueden ser usados de una manera mas productiva, pero su variabilidad en composición y la disponibilidad incierta hacen sus usos en otros procesos fermentativos en cierto modo problemáticos.

Fermentabilidad de un Cultivo.- El substrato debe ser fermentable, pero el proceso puede ser cambiado para acomodarse a un nuevo substrato. Por ejemplo, la venida de hidrocarburos baratos en los años de los 1960' s llevó

a muchas compañías a cambiar a estos tipos de sustratos. La producción de Ácido Cítrico es un ejemplo obvio de esto. El microorganismo tradicional, *Aspergillus Niger*, no puede crecer en presencia de alcanos pero una variedad de levaduras pueden hacerlo y algunas acumulan ácido cítrico lo bastante para procesos industriales como para ser usada (7). La aparente no fermentabilidad es por lo tanto no necesariamente una restricción, si los microorganismos alternativamente pueden ser encontrados.

Factores de Costo de un Substrato.- El precio de un sustrato es crítico. La cantidad de carbón disponible, sin embargo, debe ser tomada en consideración y estas diferencias estar de acuerdo con el sustrato que se está usando. La Tabla I enlista los contenidos relativos de carbón de un número de sustratos y se puede observar que si el cambio de un sustrato no está restringido y la productividad no cambia apreciablemente, el costo de un carbohidrato, por ejemplo: 0.10 Dólares por libra o sea 200.00 Dólares por Tonelada Corta, puede ser reemplazado por algún alcano a 400.00 Dólares por Tonelada; si el crecimiento promedio del microorganismo es el doble con el alcano que con el carbohidrato. Otros factores tienen que ser tomados en consideración antes de que el cambio propuesto sea aceptado, el incremento en la aireación y/o grado de agitación puede ser necesario con el sustrato reducido y ese incremento debe ser confrontado con el ahorro en el cambio del sustrato.

Los costos de transporte deben ser considerados, ellos pueden llegar a ser significativamente caros y entonces prácticamente prohibitivos, si por ejemplo algún material de desecho se puede usar contiene mucha agua y causa problemas de estabilidad al removerlos de su lugar de producción. Un sustrato puede ser mas atractivo para usarse que otro simplemente, porque este cause menos problemas a los equipos de fermentación antes y después del proceso. Un sustrato que es consumido enteramente es preferido a aquel que lo es sólo parcialmente, así como también aquél que cause menos problemas en los procesos posteriores al de fermentación. Uno de los problemas principales que conciernen a todas las industrias de fermentación es el control sobre el suministro (la oferta) de sustratos. Pocas compañías tienen un sustrato cautivo o acaparado; la mayoría tienen que comprar en el mercado abierto. El incremento de los precios no puede ser controlado y acontecimientos lejanos y ajenos a la compañía pueden provocar mayores revisiones a

las políticas de las mismas. El mayor incremento en el precio de los productos del petróleo en 1973 tipifica el problema; compañías que habían cambiado el uso de alcanos posiblemente ahora estén echando atras su decisión. La cuestión de la oferta y la demanda frecuentemente ha sido discutido en la Industria de la Fermentación (8). Nada es gratis; todo tiene un valor. Algunas compañías empezaron a usar substratos ó materias primas con valor cero hasta entonces y que desde ese momento empezaba a tener un valor. El precio para ser pagado, debe por lo tanto ser negociado, y, si es necesario, garantizar su suministro con un largo tiempo de anticipación entre el productor y la Compañía de Fermentación.

Finalmente cada Compañía de Fermentación es única. Cada una ve sus soluciones para sus problemas en sus propios caminos, así cada unidad de producción existe ó sale de su propio medio económico donde el costo del transporte, del combustible y de la corriente eléctrica, la disponibilidad de agua, la habilidad de aprovechar productos secundarios pueden ser apreciablemente diferentes en compañías similares que laboren en estados o países diferentes. Por lo tanto, el substrato que es mejor para una compañía no tiene que ser necesariamente el mejor para otra, obteniendo ambas el mismo producto.

Los sucesos de los últimos años han mostrado que las economías son capaces de tener cambios prácticamente instantáneos y así si la inflación mundial no cae a niveles razonables, todas las industrias van a tener que estar preparadas para lo peor. Mucha mas investigación se deberá hacer en base a: ¿Qué vamos a hacer si el precio de tal ó cuál cosa subió? Esto, de seguro se aplica al costo de los substratos de fermentación así también como a cosas comunes que normalmente las consideramos seguras. Parece ser que cada industria superará la crisis dependiendo de lo prevenida que haya estado.

Características Químicas de las Materias Primas para los Medios de Cultivo ó Substrato Fermentativo.- Además de las consideraciones anteriormente hechas, es necesario tener en cuenta la composición en porcentaje de carbono y nitrógeno disponible en la materia prima. Las materias primas que contienen una gran proporción de celulosa tienen poco uso industrial, porque es muy raro encontrar microorganismos capaces de utilizar la celulosa

Se pueden considerar dos fases en la producción de substancias por

fermentación, la fase de crecimiento del microorganismo y la fase de formación del producto por las células maduras. Rara vez ocurre que el medio y el ambiente sean los mismos para estas dos fases, si bien, puede ocurrir que el propio microorganismo altere las condiciones durante la fase de crecimiento, para producir un ambiente favorable para la formación del producto.

Todas las fermentaciones discontinuadas están sujetas a una serie de factores de control. Durante el periodo de crecimiento ó desarrollo del organismo, el medio proporciona suficiente nitrógeno y carbono, pero el volumen de células producido viene determinado, en gran medida, por la agitación y la aireación. Durante la fase de formación del producto pueden intervenir gran número de factores que afectan al rendimiento. En la fermentación de Griseo Fulvina el rendimiento puede aumentar si el aporte de nitrógeno es limitado, en la fermentación para la producción de etanol, para obtener alto rendimiento es preciso que el aporte de aire sea muy reducido y en la fermentación para la producción de estreptomycin es posible aumentar el rendimiento si se añade fosfato en exceso (9).

De la misma manera el pH del caldo ejerce una profunda influencia sobre el rendimiento del producto. Los Actinomicetos y en particular el Streptomices Griseus prefieren valores de pH comprendidos entre 6 y 8 tanto para el crecimiento como para la producción de antibióticos, pero los Hongos Superiores, tales como el Penicillium Crysogenum, aunque pueden crecer bien a pH 5.0, prefieren valores de pH entre 6.5 y 7.5 para la producción de la mayor parte de los antibióticos.

También la aireación y la agitación intervienen haciendo sentir su influencia sobre las concentraciones óptimas de los ingredientes. En una fermentación en la que el nitrógeno está limitado, el nivel óptimo del mismo a veces depende linealmente del grado de aireación o agitación, mientras este último está limitado a su vez, por el aumento en la naturaleza Tixotrópica del caldo producido por el aumento en el volumen de las células. Por ello las fermentaciones están gobernadas por relaciones complejas entre factores, tales como la concentración de nitrógeno en el medio, el diseño del fermentador, el grado de aireación o agitación y el número de células producidas por unidad de volumen.

Los medios para las fermentaciones industriales, generalmente son com-

plejos. Su composición se formula y se controla tan cuidadosamente, que a menudo, entra en el terreno de lo confidencial y hasta puede ocurrir que el secreto solamente encubra la profunda ignorancia imperante, en lo que se refiere a la bioquímica fundamental de las fermentaciones.

Líquido de Macerar Maíz (Cornsteep Liquor).- Durante mucho tiempo el líquido de macerar maíz ha constituido un aditivo muy útil para conseguir mejorar el crecimiento de los microorganismos o para aumentar los rendimientos de los productos buscados en los medios sintéticos. Se da la circunstancia de que constituye una fuente equilibrada de carbono, nitrógeno, azufre y sales minerales.

El líquido de macerar maíz constituye un producto secundario en la producción de almidón y azúcar a partir del maíz. Se extrae del maíz mediante una infusión (steeping) o por flujo a contracorriente de una solución diluida de dióxido de azufre que ejerce las dos funciones paralelas de establecer un pH ácido y de impedir la putrefacción, al controlar la población bacteriana del maíz. Esta extracción disuelve las sustancias ricas en nitrógeno y sales minerales. El maíz macerado se escurre y se filtra antes de que el filtrado se concentre mediante aplicación de calor hasta que contiene cerca de 50 o/o p/v de sólidos. Así se consigue un producto que se vende por su contenido en sólidos o en nitrógeno, el cual generalmente contiene alrededor de 4 o/o de nitrógeno p/v; el carbono se encuentra presente en forma de ácido láctico y de polisacáridos complejos; además contiene 1 o/o de calcio, 2,5 o/o de fósforo y de potasio el 1.5 o/o de su peso seco. De todas formas la composición exacta del producto depende de las condiciones en que se cultivó la planta y de la manera en que se llevó a cabo el proceso de extracción. La naturaleza ácida del líquido de macerar maíz hace necesario introducir en el medio, hasta 1 o/o p/v de carbonato de calcio para conseguir un pH adecuado para el organismo fermentador.

Carbonato Cálcico.- Existe una incertidumbre en la acción del carbonato de calcio sobre los procesos de fermentación por los efectos que se derivan de que sea un álcali. En ocasiones el carbonato de calcio se usa para neutralizar la acidez del líquido de macerar maíz en algunos procesos fermentativos, y no obstante, el mismo efecto no se logra usando en su lugar hidróxido de potasio

o de sodio.

El carbonato de calcio tiene dos formas cristalinas, la Calcita ó Caliza y el Aragonito. Cada una de estas formas influencia diferente en los procesos fermentativos. La caliza con una gran área y un tamaño de partícula muy pequeño puede dar un pH excesivamente alto bajo las mismas condiciones en que una forma cristalográfica análoga, pero de tamaño de partícula mucho mayor, puede aceptar un pH lógico. Lo mismo ocurre si se aumenta la agitación durante la esterilización porque al hacerlo se acelera la reacción entre la caliza y los diferentes constituyentes del medio, de manera que un medio que se esteriliza sin agitación de pH 7.0 y con agitación de un pH de 8.0 (9).

Soya.- La semilla de Soya tiene normalmente la siguiente composición: (10)

Proteína	40 o/o p/p
Aceite	18.5 a 22 o/o p/p
Hidratos de Carbono	15 o/o p/p
Cenizas y Agua	5 o/o p/p
(Potasio, Fósforo, Azufre, Magnesio y Fierro)	

La semilla se muele y se le extrae el aceite; el residuo se puede emplear como forraje para animales, como fertilizante, o bien como un ingrediente en los medios de fermentación:

Substancias Solubles de las Destilerías.- Los residuos que se obtienen después de la destilación del alcohol procedente de cereales o maíz fermentado contiene de un 6 a 8 o/o de sólidos totales, siendo rico en proteína y en el complejo vitamínico B. Los sólidos, una vez suspendidos, se eliminan por Cribado y el efluente se concentra hasta que tenga un contenido del 35 o/o p/v de sólidos y constituya un "Jarabe de Evaporador" que se seca entonces sobre un tambor dando como resultado la preparación de lo que se denomina "Substancias Solubles de Destilería". Estas se emplean como ingredientes de medios de fermentación a los que proporciona nitrógeno en forma de proteína junto con muchos factores accesorios de la alimentación (9).

Aceites.- Los aceites vegetales comerciales (por ejemplo: el aceite de maíz, de soya, etc.) son generalmente mezclas de ésteres glicéricos de los ácidos grasos. Pueden desempeñar dos cometidos en las fermentaciones industriales. Se pueden utilizar junto con agentes surfactantes como antiespumantes, o bien, ellos solos como fuente de carbono.

Los aceites tienen una proporción más alta de carbono e hidrógeno que los hidratos de carbono. Las grasas proporcionan aproximadamente el doble de energía y de agua metabólica, que una cantidad equivalente de hidrato de carbono, cuando son oxidadas por completo.

Los aceites minerales, con frecuencia constituidos por hidrocarburos de peso molecular alto, se pueden usar a veces como antiespumantes, pero en general no son metabolizados por los microorganismos, los aceites minerales tienden a acumularse, por eso mismo, en los caldos de cultivo, y su adición se debe regular para que no pueda interferir con las etapas subsiguientes de extracción.

Pharmamedia.- Es un polvo fino, limpio y finamente dividido, preparado a partir del embrión de la semilla de algodón; contiene un 56 o/o p/p de proteína; 24 o/o de hidratos de carbono; 5 o/o de aceite, y 5 o/o de cenizas (que contienen calcio, hierro, cloruro, fósforo y sulfato). Se utiliza comercialmente en la producción de tetraciclinas y en la de las nuevas penicilinas.

Cebada.- Es la principal materia prima en la producción de cerveza. La cebada tiene un alto contenido en carbono, principalmente como almidón, pero la cantidad de nitrógeno es relativamente pequeña; la cebada de calidad adecuada para hacer malta no contiene más de 1.5 o/o de nitrógeno. Si el contenido fuera mayor se produciría una turbidez ligera debido a la formación de un depósito de proteínas en la cerveza.

Uvas.- Se produce vino por medio de la fermentación de las uvas. Las uvas completamente maduras se vendimian y se obtiene el mosto o jugo de las mismas por prensado. El mosto se hace fermentar con las levaduras, ya presentes en la piel de los granos de uva ó bien añadiendo una cepa seleccionada de levadura, para producir vino. El mosto contiene: 17 o/o p/p de azúcar

(glucosa mas fructosa), y un 1 o/o de ácido (principalmente el ácido D-tartárico con algo de ácido Málico) y un 0.3 o/o de cenizas que predominantemente contienen potasio y fósforo.

El azúcar de la uva se fermenta a alcohol casi por completo, mientras algo de pectina residual se supone que confiere suavidad al vino. Se cumple que las mejores uvas son aquellas que tienen un bajo contenido en nitrógeno, porque un exceso puede conducir a fermentaciones indeseables.

Lactosa.- La Lactosa ó Azúcar de la leche, constituye un valioso hidrato de carbono derivado de los animales. Este azúcar se metaboliza lentamente, de allí que aunque se halle en exceso no haga bajar el pH del medio. Por eso Lactosa sin purificar, en forma de polvo de suero de leche (que además contiene un 4 o/o p/de nitrógeno), se puede utilizar para reemplazar la lactosa pura. A pesar de todo esto y debido a su precio y disponibilidad limitada, no se puede conseguir normalmente que compita con los hidratos de carbono producidos mediante fotosíntesis.

Por ello la lactosa es una fuente de hiratós de carbono, útil para fermentaciones de laboratorio, pero la tendencia actual es hacia reemplazarla en las fermentaciones industriales, por glucosa o sacarosa administrada de forma semi-continua.

Sacarosa.- La Sacarosa es el Azúcar dulce común, que se encuentra en la caña de azúcar (*saccharum officinarum*) y en la remolacha (*beta alba*). Muchas calidades de sacarosa son adecuadas para la inclusión en los medios fermentativos.

- 1).- Azúcar Blanca Pura ó Azúcar de Mesa.
- 2).- Azúcar Morena que normalmente es más barata que la blanca. El azúcar morena resulta, por lo general, como producto de las fábricas de azúcar crudo, y cuando se refina éste se tiene azúcar blanco.
- 3).- Las Melazas constituyen la forma más cruda de la sacarosa y no son otra cosa que las aguas madres que resultan de la cristalización del azúcar, a partir de sus soluciones. Las Melazas de remolacha tienen la composición aproximada si-

guiente: 48.5 o/o p/v de sucrosa; 1.0 o/o de rafinosa; 1.0 o/o de azúcar invertido; 10.8 o/o de cenizas; 20.7 o/o de sustancias orgánicas que no son azúcares; 18.4 o/o de agua y de 1.5 a 2.0 o/o de nitrógeno.

Las Melazas de caña difieren de las Melazas de remolacha en su contenido de azúcar invertido, su composición es: 33.4 o/o p/v de sacarosa; 21.2 o/o de azúcar invertido; 10.8 o/o de cenizas; 19.6 o/o de sustancias orgánicas que no son azúcares; 16.0 o/o de agua y carecen de rafinosa.

Almidón.- El almidón constituye la principal reserva de hidratos de carbono en las plantas, y por ello está ampliamente distribuido en el reino vegetal. El hidrato de carbono presente en harina de soya, en harina de frutos secos, en harina de avena, harina de centeno, de maíz, de trigo y de cebada, es en su mayor parte almidón. La mayor parte del almidón comercial se prepara a partir de maíz indio, y de su preparación resulta como producto secundario líquido de macerar maíz (agua de cocimiento de maíz). Son fuentes menos importantes de almidón, la planta Casava de la que proviene el almidón de Tapioca, y la Patata, de la que procede el almidón de Patata. Estos dos almidones son difíciles de preparar, debido al alto contenido de humedad de los materiales de partida y su tendencia a deteriorarse.

El almidón es difícil de manejar debido a su insolubilidad en el agua, pero se le puede hidrolizar fácilmente con ácidos diluidos ó empleando enzimas, para producir con alto rendimiento, glucosa soluble en agua, muy adecuada para medios de fermentación.

Es común esterilizar la glucosa por separado, y no en presencia de los demás componentes del medio, porque posee una marcada tendencia a reaccionar con los iones amonio y muchos aminoácidos para formar compuestos pardos que contienen nitrógeno. Otros azúcares corrientes como la Sucrosa no sufren esta limitación.

Las Dextrinas que poseen un peso molecular intermedio entre el del almidón y el de la glucosa, se pueden preparar mediante hidrólisis incompleta y bien controlada, del almidón, catalizada por ácidos ó por enzimas. Para fermentaciones en pequeña escala las dextrinas pueden hacer el papel de almi-

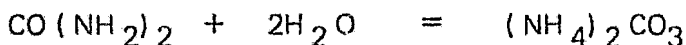
dón soluble.

Agua.- Para preparar los medios de fermentación es esencial disponer de agua limpia y de composición bien establecida en grandes cantidades (350 000 litros al menos por semana para las plantas industriales). Los factores que se han de normalizar son, entre otros, el pH, la dureza temporal ó permanente, los sólidos totales disueltos, el color, la limpidez y el contenido en cloruros y ácidos orgánicos.

Ingredientes Sintéticos que incluyen Oligoelementos.- Por lo común, ya se encuentran presentes los Oligoelementos en cantidades adecuadas, cuando los caldos se preparan a partir de ingredientes naturales complejos, pero si se emplean medios sintéticos, es preciso añadirlos.

Muchas fermentaciones necesitan un aporte continuo de nitrógeno adicional en forma de gas amoníaco, sulfato de amonio, acetato de amonio, nitrato de amonio ó urea, y se puede incluir carbono adicional en forma de glucosa, lactato, acetato ó alcohol. Pero es preciso tener cuidado con estas adiciones. Todas ellas producen un marcado efecto sobre el pH. El gas amoniaco se puede añadir como álcali para aumentar el pH, mientras las fuentes de carbono sencillas, que se utilizan rápidamente, se pueden emplear para bajar el pH. El sulfato amónico se puede emplear para proporcionar nitrógeno, sin afectar casi el pH, si se metabolizan a la vez tanto el amonio como el sulfato, pero se producirá un descenso en el pH, si el ión amonio se metaboliza preferentemente.

El ión acetato se metaboliza con gran rapidez, pero en cambio el nitrato se tiene que reducir primero a amoníaco. De ahí que el acetato amónico puede actuar como un álcali, en tanto que el nitrato amónico puede comportarse como ácido. El uso de urea se puede considerar como una manera neutra de añadir amoníaco. Se metaboliza con suma facilidad por los microorganismos, pero tiene el inconveniente de que durante la esterilización por vapor, se convierte en amoníaco libre.

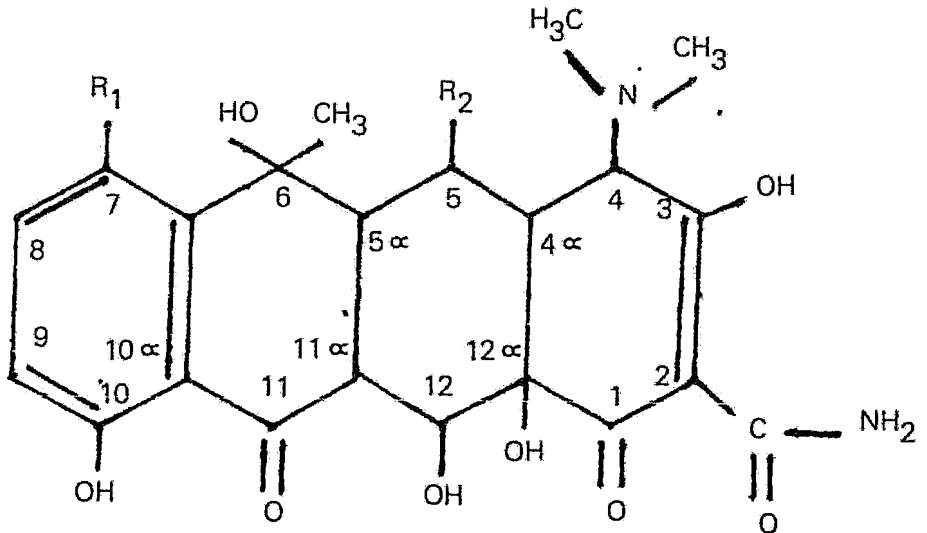


Fuentes de Factores accesorios de la Alimentación (Vitaminas).- En la Tabla Número IV se incluyen algunos de los factores accesorios de la alimentación más importantes, cuya presencia se ha demostrado que es indispensable para el crecimiento de ciertos microorganismos muy exigentes.

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LA OXITETRACICLINA.

Estructura Química.- Los antibióticos del grupo de las Tetraciclínas, constituyen un conjunto de compuestos de amplio espectro que están estrechamente emparentados y poseen una importancia comercial inmensa (9). Las tetraciclínas tienen la siguiente estructura general:

FIGURA I.



- Tetraciclina (R₁ = R₂ = H)
- Oxitetraciclina (Terramicina) (R₁ = H ; R₂ = OH)
- Clorotetraciclina (Aureomicina) (R₁ = Cl ; R₂ = H)
- Bromotetraciclina (R₁ = Br ; R₂ = H)

El grupo carbozamida en la posición 2, se halla presente en todas las tetraciclinas que tienen importancia comercial como antibióticos.

Una tabla comparativa de las propiedades físicas de la familia de las tetraciclinas se tiene en la Tabla V. (10).

La Oxitetraciclina, que proviene del *Streptomyces rimosus*, puede ser aislada por varios métodos (11). Uno de ellos comprende la extracción con butanol, formación de sales ácidas ó bien por separación cromatográfica. Una posterior purificación produce unos cristales dihidratados de oxitetraciclina, con un punto de fusión de 181° - 182° C; (α)_D²⁵ + 26.5° (en alcohol metílico), con una solubilidad en el agua de alrededor de 0.5 mg/ml a 25° C. Esta base anfotérica forma sales muy bien definidas con ácidos ó bases, además, a 23 ° C tiene un mínimo de solubilidad a pH 5 como se muestra en la tabla V.

T A B L A V
TABLA DE SOLUBILIDAD DE OXITETRACICLINA EN
SOLUCIONES ACUOSAS A 23° C.

p H	Solubilidad (mcg/ml)	p H	Solubilidad (mcg/ml)
1.2	31 400	6.0	700
2.0	4 600	7.0	1 100
3.0	1 400	8.0	28 000
4.0	850	9.0	38 000
5.0	500		

El clorhidrato de oxitetraciclina es una sustancia amarilla cristalina con un sabor amargo, su punto de fusión es de 190° a 194° C; $(\alpha)_D^{25} = -196.6^{\circ}$ (en HCl 0.1 N); $pK_a' = 3.5, 7.6$ y 9.2 . Es fácilmente soluble en agua, pero en soluciones a pH: 2.5 se precipita la base anfotérica. Las formas cristalinas de la oxitetraciclina son de color amarillo, tanto las de sodio como las de potasio. La sal de sodio se obtiene usando el alcohol metílico como deshidratante. El antibiótico también forma mezclas de sales insolubles con iones metálicos divalentes, tales como el Bario y el Magnesio.

Las preparaciones secas de la base anfotérica ó el clorhidrato son estables almacenadas largo tiempo. Las soluciones ácidas a pH: 2.5 tienen una vida media de 12 días; las soluciones alcalinas a pH: 8.5 tienen una vida media de 33 hrs. a 37° C. La oxitetraciclina es ligeramente soluble en solventes orgánicos comunes tales como el metanol, etanol, acetona o dioxano; pequeñas cantidades de agua decrecen la solubilidad. El clorhidrato es bastante soluble en agua y en los solventes orgánicos; en cambio la sal de sodio es menos soluble en dichos solventes.

La oxitetraciclina es la 4 dimetil amino, 1,4,4 ,5,5 ,6,11,12 octahidro, 3,5,6,10,12,12 hexahidroxi, 6 metil, 1,11 dioxi, 2 naftacen carboxamida. La fórmula estructural está representada en la figura 1, su fórmula empírica es: $C_{22} H_{24} N_2 O_9$, su peso molecular: 466 y fue desarrollada por esfuerzos combinados tanto de Chas. Pfizer & Co. como de los Laboratorios de la Universidad de Harvard (11).

La determinación de su estructura resulta de la aplicación de muchas técnicas analíticas como son: Espectroscopía en ultravioleta y en Infrarojo, degradaciones ácidas y alcalinas, pruebas químicas (pruebas positivas incluyendo la del cloruro férrico, Pauly, Friedel-Crafts, Fehling, y reacciones de Molish), y otras síntesis. Los cuatro anillos hidronaftacénicos y los grupos laterales, son comunes a los tres miembros de la familia de las tetraciclinas. La oxitetraciclina tiene un grupo hidroxilo en el carbono 5, y la clortetraciclina tiene un átomo de cloro en el carbono 7; en tanto la tetraciclina tiene un átomo de hidrógeno en cada una de las dos posiciones.

La estructura de la oxitetraciclina, dada anteriormente, ha sido determinada por varias degradaciones y síntesis. Regna (12), ha encontrado que ninguno de los productos de la degradación posee actividad biológica, a

menos que ellos contengan los anillos tetracíclicos hidroaromáticos que podemos encontrar en la oxitetraciclina.

El grupo dimetil amino, es un constituyente esencial de otros productos farmacéuticos, tales como varios de los anestésicos comunmente usados, analgesicos y muchos de los antiestamínicos. La carboxamida o grupo amídico, contiene el otro nitrógeno que está presente también en los aminoácidos contenidos en forma natural en la asparagina y glutamina, los cuales son esenciales en el metabolismo de las plantas y los animales.

MÉTODOS Y ANÁLISIS DE LA OXITETRACICLINA

Los principales métodos usados para el análisis de oxitetraciclina están basados en el grado de inhibición de crecimiento en los microorganismos susceptibles.

Un número diverso de técnicas han sido aplicadas basadas en éste principio por varios investigadores (13), (14). Generalmente se habla de tres métodos microbiológicos empleados: el método turbidimétrico, el método de diluciones seriadas y el método de difusión usando cilindros en placas con agar.

Además de los métodos microbiológicos anteriores, se tiene el Método Colorimétrico del Cloruro férrico adaptado de Monastero y colaboradores (15) y el Método Espectrofotométrico al ultravioleta para oxitetraciclina. Otro investigador, Perlman (16) ha empleado el arsenomolibdato como reactivo para desarrollar color con oxitetraciclina y medir la intensidad de color a través de un filtro a 660 micras. Este método depende de la capacidad reductora del antibiótico. Hiscox (17), usa un método espectroscópico de absorción en el ultravioleta a 249 y 312 micras para cuantear la oxitetraciclina.

El método usado en el presente trabajo es semejante al de Hiscox, cuantandose la oxitetraciclina a 320 micras en soluciones acuosas, límpidas, provenientes de la filtración del caldo fermentado.

TRABAJO EXPERIMENTAL

Al comenzar a optimizar un medio de cultivo, partimos de la siguiente formulación de acuerdo a la propuesta por una patente de Pfizer, pero sustituyendo el N-Z amina con Harina de carne de res y aceite de soya como el aceite vegetal indicado en la fórmula publicado en su artículo A. Di Marco y P. Pennella (12). La fórmula usada es:

<u>Constituyente</u>	<u>o/o (p/v)</u>
Aceite de soya	0.4
Harina de carne	0.1
Harina de maíz	0.5
Harina de soya	3.0
Nitrato de sodio R. A.	0.3
Carbonato de calcio	0.5
Agua c.b.p.	100 ml

Se empleó, como cepa un *Streptomyces Rimosus* facilitado por la Escuela de Estudios Biomédicos de la UNAM y en la misma fue llevado a cabo éste trabajo.

Se empleó el sistema de Frascos Agitados, es decir, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón sujetos con cinta adhesiva; estos frascos van sujetos a una plataforma que a su vez es agitada circularmente con una frecuencia de 50 ciclos/minuto. Esta plataforma a su vez se encuentra en un cuarto al cual se le controla su temperatura a 27°C y su humedad al 50 o/o. La cantidad de medio de cultivo al iniciarse el experimento es de 100 ml.

La duración de cada experimento fue de 120 hrs., el método y resultados son los siguientes detallados a continuación.

Se probó originalmente la fórmula anteriormente descrita y a través de las experiencias se fue modificando hasta llegar a la siguiente:

	<u>Constituyente</u>	<u>o/o (p/v)</u>
A	Aceite de soya	2.0
B	Harina de Carne	1.1.
C	Harina de Maíz	1.5
D	Harina de Soya	4.5
E	NaNO ₃	0.35
F	CoSO ₄	0.0005
G	Agua	100 ml.

Pero como para conocer más rápidamente cual es la formulación óptima, ya que cada cambio ocasionaba un retroceso ó un paso hacia adelante, se aplicó un método estadístico para avanzar más rápido. Este método es el llamado, De Box y Willson (18).

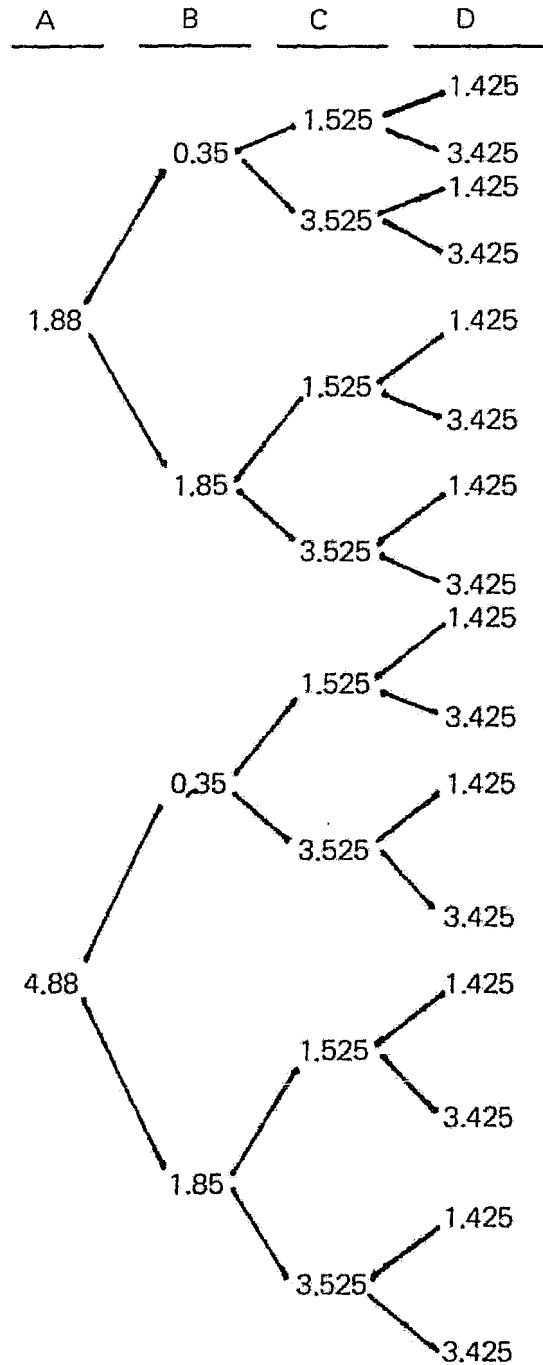
De acuerdo a este método, debemos de hacer las siguientes variaciones a la última fórmula:

Considerando que los constituyentes A,B,C y D tienen mayor influencia en la formulación tenemos los siguientes rearrreglos en las cantidades de los constituyentes del Medio de Cultivo.

<u>Parámetro</u>	<u>Nivel Base</u>	<u>Nivel Inferior</u>	<u>Nivel Superior</u>	<u>Unidad de Variación</u>
A	3.38	1.88	4.88	1.5
B	1.10	0.35	1.85	0.75
C	2.525	1.525	3.525	1.0
D	2.425	1.425	3.425	1.0

Se hacen por lo tanto, las pruebas de fermentación con todas las combinaciones posibles, y se prepara un esquema como el que sigue:

Parámetro:



De este esquema resultan 16 nuevos medios a probar, los cuales, calculados en la forma anterior nos permitirán encontrar la relación óptima con mayor rapidez. Las composiciones ó fórmulas de los 16 medios son las siguientes:

Medio de Cultivo	Aceite de Soya	Harina de Carne	Harina de Maíz	Harina de Soya	NaNO ₃	CoSO ₄	Agua Soya
Control	3.38	1.10	2.525	2.425	0.35	0.0005	100
I	1.88	0.35	1.525	1.425	0.35	0.0005	100
II	1.88	0.35	1.525	3.425	0.35	0.0005	100
III	1.88	0.35	3.525	1.425	0.35	0.0005	100
IV	1.88	0.35	3.525	3.425	0.35	0.0005	100
V	1.88	1.85	1.525	1.425	0.35	0.0005	100
VI	1.88	1.85	1.525	3.425	0.35	0.0005	100
VII	1.88	1.85	3.525	1.425	0.35	0.0005	100
VIII	1.88	1.85	3.525	3.425	0.35	0.0005	100
IX	4.88	0.35	1.525	1.425	0.35	0.0005	100
X	4.88	0.35	1.525	3.425	0.35	0.0005	100
XI	4.88	0.35	3.525	1.425	0.35	0.0005	100
XII	4.88	1.85	3.525	3.425	0.35	0.0005	100
XIII	4.88	1.85	1.525	1.425	0.35	0.0005	100
XIV	4.88	1.85	1.525	3.425	0.35	0.0005	100
XV	4.88	1.85	3.525	1.425	0.35	0.0005	100
XVI	4.88	1.85	3.525	3.425	0.35	0.0005	100

Nota: Todas las cantidades son dadas en gramos excepto el agua, cuyas cantidades son ml.

Para cada medio se hicieron 5 Erlenmeyer y se obtuvieron los siguientes resultados (cada uno de ellos es el promedio de cinco matraces) los cuales se analizaron estadísticamente obteniéndose las conclusiones que se exponen mas adelante.

Para calcular el coeficiente de regresión, se indica con (-1) el caso en que el componente se encuentre en el nivel inferior al control y con (+1), cuando se encuentra en el nivel superior; en esta forma se tiene la siguiente tabla:

Medio de Cultivo Número	C O M P O N E N T E S				Potencias u/ml
	A	B	C	D	
I	-1	-1	-1	-1	163
II	-1	-1	-1	+1	171
III	-1	-1	+1	-1	770
IV	-1	-1	+1	+1	793
V	-1	+1	-1	-1	780
VI	-1	+1	-1	+1	886
VII	-1	+1	+1	-1	784
VIII	-1	+1	+1	+1	620
IX	+1	-1	-1	-1	101
X	+1	-1	-1	+1	637
XI	+1	-1	+1	-1	455
XII	+1	-1	+1	+1	580
XIII	+1	+1	-1	-1	337
XIV	+1	+1	-1	+1	671
XV	+1	+1	+1	-1	612
XVI	+1	+1	+1	+1	455

Promedio 588.4

Se calculan los coeficientes de regresion para cada componente haciendo la suma algebraica de los rendimientos obtenidos correspondientes a los niveles inferiores (-1) y de aquellos obtenidos en los niveles superiores (+ 1) dividiendo a su vez el resultado, por el número total de pruebas, es decir, por 16.

A (= X ₁)		B (= X ₂)		C (= X ₃)		D (= X ₄)	
(-1)	(+ 1)	(-1)	(+1)	(-1)	(+ 1)	(-1)	(+1)
163	101	163	780	163	770	163	771
771	637	771	886	771	793	770	793
770	455	770	784	780	784	780	886
793	580	793	620	886	620	784	620
780	337	101	337	101	455	101	637
886	671	637	671	637	580	455	580
784	612	455	612	337	612	337	671
620	455	580	455	671	455	612	455
-5567	+3848	-4270	+5145	-4346	+5069	-4002	+5413
+3848		+5145		+5069		+5413	
<u>-1719</u>		<u>+875</u>		<u>+723</u>		<u>+1411</u>	
-1719/16 = <u>-107.4</u>		875/16 = <u>+54.7</u>		723/16 = <u>+45.2</u>		+1411/16 = <u>+88.2</u>	

De estos últimos resultados se deduce que:

1o.- Ya que A y D tienen los coeficientes de regresión más altos, son los que influyen mayormente en el rendimiento.

2o.- El coeficiente de regresión negativo de A indica que éste parámetro se debe reducir para obtener un aumento en los rendimientos, mientras que B, C y D se deben aumentar.

Con los coeficientes de regresión encontrados bien puede construirse una ecuación que nos permita relacionarlos y tratar de optimizar aun más la formulación.

$$T (\text{rendimiento}) = 588.4 - 107.4X_1 + 54.7X_2 + 45.2X_3 + 88.2X_4$$

	<u>X₁(A)</u>	<u>X₂(B)</u>	<u>X₃(C)</u>	<u>X₄(D)</u>
I Coeficiente de Regresión	-107.4	54.7	45.2	88.2
II Unidad de Variación	1.5	0.75	1.0	1.0
III (Coeficiente) (U. de Var)	-161.1	41.0	45.2	88.2

Y si se calcula que modificación se debe hacer a cada uno de los otros tres parámetros para una variación de 0.1 en el primer parámetro, sobre la base de la proposición resultante en el renglón III de la última tabla se tiene lo siguiente:

Si $X_1 = 0.1$ entonces:

X_1 es a X_2 como (-107.4) es a 54.7

$$\text{por lo tanto: } X_2 = \frac{(-0.1) (54.7)}{(-107.4)} = 0.0509 \approx 0.05$$

En la misma forma:

X_1 es a X_3 como (-107.4) es a 45.2

$$\text{por lo tanto: } X_3 = \frac{(-0.1) (45.2)}{(-107.4)} = 0.042 \approx 0.04$$

y por último también:

X_1 es a X_4 como (-107.4) es a 88.2

$$\text{por lo tanto: } X_4 = \frac{(-0.1) (88.2)}{(-107.4)} = 0.082 \approx 0.08$$

Los nuevos valores de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 dan inmediatamente la directriz de la nueva prueba. Los valores de X_1 deberán decrecer a razón de -0.1 a partir de las cantidades del medio de cultivo base; en igual forma los valores de X_2 aumentarán a razón de 0.05 ; los de X_3 aumentarán a razón de 0.04 y los de X_4 ,aumentarán a razón de 0.08

Se hace en consecuencia otra serie de pruebas aplicando las últimas consecuencias obtenidas.

En la siguiente tabla podemos observar los nuevos medio se cultivo que se probarán.

Materias Primas	A	B	C	D
Medio Base	3.38	1.10	2.525	2.425
Unidad de Variación	-0.1	0.05	0.04	0.08
Medio XVII	3.28	1.15	2.565	2.505
XVIII	3.18	1.20	2.605	2.585
XIX	3.08	1.25	2.645	2.665
XX	2.98	1.30	2.685	2.745
XXI	2.88	1.35	2.725	2.825
XXII	2.78	1.40	2.725	2.825
XXIII	2.68	1.45	2.805	2.985
XXIV	2.58	1.50	2.845	3.065
XXV	2.48	1.55	2.885	3.145
XXVI	2.38	1.60	2.925	3.225
XXVII	2.28	1.65	2.965	3.305

Nota: Los componentes E, F y G se siguen empleando en la misma proporción, es decir, no varían.

Las actividades o potencias obtenidas después de probar los últimos once medios propuestos son las siguientes:

<u>Medio</u>	<u>Potencia u/ml</u>
Control	257
XVII	305
XVIII	301
XIX	385
XX	510
XXI	463
XXII	509
XXIII	610
XXIV	699
XXV	716
XXVI	637
XXVII	425

Por lo que se puede observar, aparentemente el medio XXV es el óptimo en las condiciones experimentales que se tuvieron.

Es obvio que la variación elegida, 0.1 para el factor X_1 , es arbitraria y la elección debe basarse sobre conocimientos personales de los hechos y sobre la experiencia específica. De todos modos, una elección "no óptima", no perjudica el resultado final, pero significa que se empleará algo más de tiempo para alcanzar las condiciones óptimas.

Una vez obtenida la combinación óptima, es posible repetir el procedimiento con otro Box-Wilson, partiendo esta vez de toda información y de la formulación con la cual se obtuvo el mejor resultado en la última serie. Es claro que no se puede mejorar hasta el infinito; cuando se hayan agotado las potencialidades de los medios, cada trabajo posterior será en vano y para obtener nuevas mejoras se deberá pensar en cambiar la fórmula, ó bien, modificar otros parámetros (por ejemplo: temperatura, agitación, aereación, cepa, etc.).

CONCLUSIONES

Independientemente de las formulaciones recomendadas por los libros y publicaciones científicas en general, cualquier persona puede optimizar un medio de cultivo, siguiendo el método de Box-Wilson y partiendo de las materias primas más económicas.

Lo anterior, conciviéndolo mas ampliamente, nos lleva a prescindir de tecnologías ya establecidas y nos hace desarrollar la propia, la que se avenga a nuestras cordiciones de trabajo y a nuestros recursos naturales locales. Una de las condiciones que requiere el método expuesto para alcanzar el éxito es disciplina en el trabajo y una condición bastante buena del mismo es que se puede partir de materias primas tan baratas ó abundantes como se tenga en la localidad.

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Difco Laboratorie Inc. Detroit, Michigan, U.S. A.
U.K. Agent: Barid and Tatlock (London) Ltd, Chadwell Heath,
Essex.
- 2).- Oxoid Laboratories. Oxoid Ltd, Southwark Bridge Road. London,
S.E.1.
- 3).- B B L. Baltimor Biological Laboratory, Rutherford, New Jersey,
U. S. A.
- 4).- Material and Methods in Fermentation. G.L. Solomon, Academic
Press. 1969. 115-132.
- 5).- Colin Retledge. Annuals Reports of Fermentation Process. Chapter 3,
Editado por: D. Perlman Academic Press Inc. 1977. 49-71.
- 6).- Birck G. G., Parker K. J., and Worgan J. T., "Foord from Waste".
Applied Science Publications, London, 1975.
- 7).- Shennan L. and Levi J. D. "Prog. Industr. Microbiol. 13, 3. 1974.
- 8).- Hasting J. J. H. Adv. Appl. Microbiol. 14, 1 (1971).
- 9).- A. Rhodes y D. L. Fletcher. Príncipeios de Microbiología Industrial.
Editorial ACRIBIA. España. 1969. 60-79 y 231-232.
- 10).- A. Di marco and P. Pennela. Fermentation of the tetracycline.
Laboratori Ricerche. Farmitalia, Milano. 1960.
- 11).- Merle M. Musselman. Terramycin. (Oxytetracycline). Antibiotics
Monographs No. 6. Medical Encyclopedia. Inc., New York, N.Y.
1956. 11-17.
- 12).- Terramycin VII. The structure of Terramycin. Hochstein F.A.;
Stephens C. R.; Conover L. H.; Regna P.P.; Pasternack R.; Brunings
K.J. and Woodward R.B. J. Am. Chem. Soc. 74: 3708, 1952.

- 13).— Regna P. P. Chemical Structure of Terramycin in relation to mode of action. Book: Tr. N.Y. Acad. Sc. 15:12, 1952.
- 14).— Grove D. C. and Randall W. A. Assay Methods of Antibiotics Laboratory Manual. Medical Encyclopedia Inc. New York. 1955.
- 15).— Hobby G. L.; Reed W.; Rinne D.; Powers M. and D' Ambrosía A. Absorción y Excreción de Terramicina en animales. Proc. Soc. Exper Biol. & Med. 73: 511, 1950.
- 16).— Monastero F.; Means J.A.; Grenfell T.C. and Hedger F.H. Terramycin: Chemical Methods of Assay and Identification. Scient Ed. 40: 241. 1951.
- 17).— Clorimetric Methods for Determination of Aureomycin, Carbomycin, Erythromycin and Terramycin in aqueous solutions. Science. 118: 628. 1953.
- 18).— Hiscox D. The Ultraviolet determination of Aureomycin and Terramycin. J. Am. Pharm. A. (Scient Ed.). 49: 237. 1951.
- 19).— Neurith S. I. and Naphtali D. M. New Statistical Methods Rapidly Determines Optimum Process Condition. Chem. Eng. June 1957. 238 - 242.