

03088

5
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA
DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DESARROLLO DE UN PROCESO FERMENTATIVO
PARA LA
PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

T E S I S

que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
presenta

SUSANA SAVAL BOHORQUEZ

México, D.F.

1 9 9 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	
1. Características e importancia de la estreptomina	3
2. Biosíntesis de la estreptomina	6
3. Factores que regulan la biosíntesis de estreptomina	
3.1 Papel del fosfato	9
3.2 Papel de la fuente de nitrógeno	11
3.3 Efecto del propio antibiótico	12
3.4 Papel de la fuente de carbono	12
4. Derivados de la estreptomina	12
5. Medios de cultivo empleados para la producción de estreptomina	14
6. Producción fermentativa de estreptomina	18
7. Degeneración del cultivo	25
8. Resistencia a fagos	25
9. Mercado de la estreptomina en México	26
III. OBJETIVOS	31
IV. ESTRATEGIA	32
V. MATERIAL Y METODOS	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	
1. Elección de la cepa productora de estreptomina	46
2. Selección del medio de cultivo	48

3.	Optimización de las condiciones ambientales a nivel de matraces	
3.1	Propagación de las esporas de <u>S. griseus</u> ATCC 12475	53
3.2	Variabilidad en la producción de estreptomicina	55
3.3	Efecto del tipo de matraces y la fracción de llenado de los matraces	62
3.4	Efecto de la velocidad de agitación	73
4.	Optimización del medio de cultivo	
4.1	Efecto del agua de la llave y de los elementos traza	76
4.2	Efecto del pH inicial	79
4.3	Eliminación de nutrientes no indispensables	79
4.4	Optimización de la concentración de los ingredientes del medio	85
5.	Escalamiento y optimización del proceso a nivel de fermentadores de 14 litros	
5.1	Desarrollo del inóculo micelial	107
5.2	Uso de antiespumante	111
5.3	Efecto de la agitación y la aeración	115
5.4	Empleo de diferentes tipos de difusores	130
5.5	Efecto del coeficiente de transferencia de oxígeno sobre el crecimiento de <u>S. griseus</u>	145
5.6	Evolución de la viscosidad durante la fermentación	150
5.7	Efecto del control de pH durante la fermentación	152
6.	Utilización de materias primas alternativas para la producción de estreptomicina	152
6.1	Fuente de nitrógeno	153
6.2	Fuente de carbono	160
6.3	Fuente de fosfato	160
6.4	Cloruro de sodio	163
6.5	Posibles modificaciones al medio de cultivo	163
7.	Escalamiento de la producción de estreptomicina a nivel de planta piloto	166
8.	Análisis de los resultados obtenidos en las tres escalas de operación	171
8.1	Modelos cinéticos de crecimiento	171
8.2	Modelos cinéticos de formación de producto	174
8.3	Comparación de los parámetros de fermentación	176
8.4	Perfil de prefactibilidad del proceso fermentativo a nivel comercial	179
VII.	INTEGRACION DE LOS RESULTADOS	183

VIII. CONCLUSIONES

193

IX. RECOMENDACIONES

196

X. REFERENCIAS

198

DESARROLLO DE UN PROCESO FERMENTATIVO PARA LA
PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

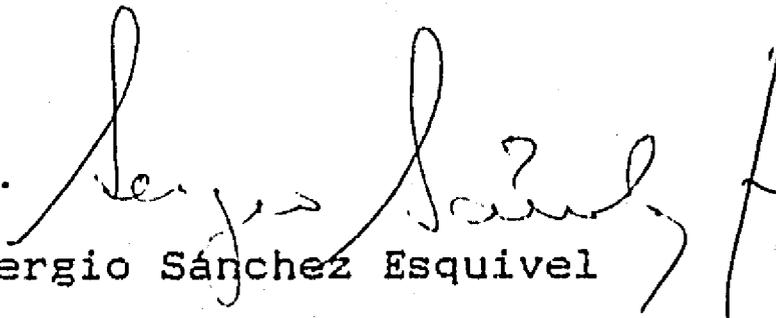
El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso fermentativo para producir estreptomicina, un antibiótico de amplia aplicación en medicina, veterinaria y agricultura, que no se produce en México. Se utilizaron materias primas grado industrial y agua de la llave para cultivar la cepa Streptomyces griseus ATCC 12475, que es insensible a la acción de fagos y resistente a su propio antibiótico. Se establecieron las condiciones de operación más adecuadas para el cultivo de la cepa en matraces y el medio de cultivo se optimizó mediante la metodología de superficie de respuesta. Con esto se logró incrementar el título de estreptomicina de 280 a 421 mg/l, esto es un 52%. Posteriormente, en fermentadores de 14 litros, se optimizaron las condiciones de oxigenación alcanzando un título de 820 mg/l. A partir de los resultados se obtuvo un modelo matemático empírico que describe el efecto conjunto de las velocidades de agitación y de aeración sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno. Adicionalmente, se obtuvieron otros modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad específica de crecimiento máxima, el título de producción, la productividad y el rendimiento de estreptomicina en función del coeficiente de transferencia de oxígeno. Al escalar el proceso a nivel de planta piloto con un volumen de operación de 1000 litros, bajo el criterio de coeficiente de transferencia de oxígeno constante, se alcanzó un título de estreptomicina de 795 mg/l. Los modelos cinéticos de

formación de producto en las tres escalas de operación que hasta la fecha no han sido descritos, indicaron que la producción de estreptomicina está parcialmente asociada al crecimiento microbiano. Se propone el uso de un modelo logístico de crecimiento para describir la cinética del modelo biológico empleado.

Dentro del campo de la Biotecnología, este trabajo se establece en el área de desarrollo de procesos microbiológicos, con un enfoque de ingeniería bioquímica. Los capítulos del escrito final más relevantes son: objetivo, estrategia, resultados y discusión, integración de los resultados, conclusiones y recomendaciones, sin dejar de mencionar que la introducción resume lo publicado hasta la fecha en relación a estreptomicina, y material y métodos describe el procedimiento experimental empleado.

Susana Saval Bohórquez

Vo.Bo.


Dr. Sergio Sánchez Esquivel

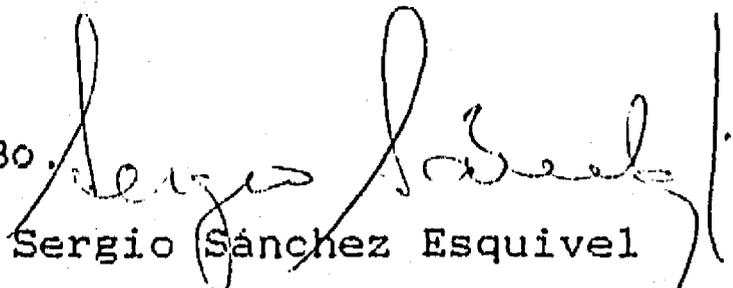
DEVELOPMENT OF A FERMENTATION PROCESS FOR STREPTOMYCIN PRODUCTION

The aim of this study was to develop a process for the fermentative production of streptomycin, an antibiotic not produced in Mexico, but widely used in human medicine, veterinary and agriculture. Industrial raw materials and tap water were used to culture Streptomyces griseus ATCC 12475, a strain resistant to phages and to its own antibiotic. After establishing the best operational conditions at shaken flasks, the culture medium was optimized applying a response surface methodology. With this procedure, the streptomycin titre was increased from 280 to 421 mg/l, i.e. 52%. When oxygenation was optimized in 14 liters fermentors, the streptomycin titre was 820 mg/l. Using the experimental results, a mathematical empirical model was obtained describing the both effect of agitation and aeration rates on oxygen transfer coefficient. In addition, other mathematical models predicting maximal specific growth rate, titre, productivity and yield as function of oxygen transfer coefficient were obtained. When the fermentation was scaled-up to pilot plant (1000 l) maintaining constant the oxygen transfer coefficient, an antibiotic titre of 795 mg/l was reached. Kinetic models of product formation indicated that streptomycin production was partially associated to growth, in the three working scales.

Inside of Biotechnology field, this work is established in the area of microbiological process development, using a bioche-

mical engineering focus. Its most relevant chapters are: objective, strategy, results and discussion, results integration, conclusions and recommendations. Introduction is a review of papers related with streptomycin and Material and Methods describes the experimental procedure employed.

Suzana Saval Bohórquez

Vo.Bo. 
Dr. Sergio Sánchez Esquivel

I. RESUMEN

La estreptomina es un antibiótico aminoglucósido que se emplea para combatir infecciones en humanos y animales, y contra plagas en diversos cultivos. A pesar de su amplio campo de aplicación, no se produce en México, por lo que es necesario importarla para cubrir su demanda. Estos hechos permitieron vislumbrar la necesidad de llevar a cabo el presente estudio cuyo objetivo fue, desarrollar un proceso fermentativo para producir estreptomina utilizando materias primas de fabricación nacional. El microorganismo elegido fue Streptomyces griseus ATCC 12475, que es insensible a la acción de fagos y es resistente a su propio antibiótico.

Como punto de partida, se seleccionó un medio de cultivo preparado con reactivos industriales y agua de la llave, conteniendo levadura de cerveza autolisada como fuente de nitrógeno. El título de estreptomina alcanzado con este medio a los 3 días, fue de 240 mg/l. Este título fue mayor a los obtenidos con los otros medios probados conteniendo extracto de levadura, sólidos de cocimiento de maíz, peptona, harina de soya, extracto de carne o triptona, como fuente de nitrógeno.

Posteriormente se estudió el efecto del tipo de matraces, la fracción de llenado de los mismos y la velocidad de agitación sobre la producción de estreptomina. Se encontró que estos tres factores, juegan un papel importante en la fermentación. El título más alto se obtuvo al emplear matraces con deflectores de 250 ml con 50 ml de medio y una velocidad de agitación de 200 rpm. El pH inicial fue otro factor importante para lograr una buena producción, el intervalo más adecuado se observó entre 5.5 y 6.5.

Se comprobó que el agua de la llave no afecta la producción de estreptomina y que no fue necesaria la adición de elementos traza (Fe^{++} , Zn^{++} y Ca^{++}). En experimentos previos a la optimización, se redujo a 4 el número de ingredientes con influencia importante sobre la producción de estreptomina: glucosa, levadura de cerveza autolisada, cloruro de sodio y fosfato dibásico de potasio. La concentración de cada uno de ellos se optimizó empleando la metodología de superficie de respuesta. Con las concentraciones óptimas de estos ingredientes se incrementó el título de estreptomina de 280 a 421 mg/l, que equivale a un 52%.

Al llevar las fermentaciones a nivel de 14 litros, se observó un efecto marcado de la velocidad de agitación, el flujo de aire y el tipo de difusor, sobre la productividad y el

rendimiento de estreptomina. El título máximo de antibiótico alcanzado a las mejores condiciones de operación fue de 820 mg/l a los 3 días.

Se obtuvo un modelo matemático empírico que describe el efecto conjunto de las velocidades de agitación y de aeración sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno. Adicionalmente, se obtuvieron otros modelos matemáticos que permiten expresar la velocidad específica de crecimiento máxima, así como la producción, la productividad y el rendimiento de estreptomina en términos del coeficiente de transferencia de oxígeno.

Se analizó la variabilidad en la producción de estreptomina, propia del sistema microbiano. Los resultados obtenidos a nivel de matraces indicaron que la variabilidad en diferentes experimentos fue mayor a la observada en un mismo experimento. Al comparar la variabilidad observada en diferentes experimentos a nivel de matraces y de fermentadores, se observó que en el primer caso fue de 10.94%, mientras que en el segundo caso fue de 6.51%. Esta diferencia posiblemente se debe un mejor control del proceso que se puede tener en fermentadores.

Se encontró que la disponibilidad de las mananas presentes en las paredes celulares de la levadura, empleada como fuente de nitrógeno, tiene un papel importante en la producción de estreptomina. Entre los productos de levadura probados, solamente el residuo de cervecera permitió una producción cercana a la obtenida con la levadura autolisada.

Al escalar el proceso a nivel de planta piloto con un volumen de operación de 1000 litros, bajo el criterio de coeficiente de transferencia de oxígeno constante, se alcanzó un título de estreptomina de 795 mg/l a las 90 horas de fermentación.

Se obtuvieron los modelos cinéticos de formación de producto en las tres escalas de operación que hasta la fecha no han sido descritos. Los resultados indicaron que la producción de estreptomina está parcialmente asociada al crecimiento microbiano.

Por otra parte, los perfiles de incremento en masa celular se ajustaron a modelos logísticos de crecimiento, que al parecer hasta la fecha no han sido utilizados en el campo de las fermentaciones.

II. INTRODUCCION

1. CARACTERISTICAS E IMPORTANCIA DE LA ESTREPTOMICINA

La estreptomina fue el primer antibiótico aminoglucósido detectado como producto de fermentación en cultivos de Streptomyces griseus, aislados de muestras de suelo. Su descubrimiento fue realizado por Waksman y sus colaboradores en 1944 (Claridge, 1979; Kirby, 1980; Okachi y Nara, 1984; Florent, 1985; Kase, 1985).

La molécula de estreptomina está constituida por tres subunidades: la estreptidina, que es un aminociclitol, unido al disacárido, estreptobiosamina, que a su vez está compuesto por estreptosa y N-metil-L-glucosamina. Su fórmula empírica es $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ y su peso molecular es de 581.58 daltons (Figura. 1).

La estreptomina presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+), Gram (-) y micobacterias (Scriban, 1985). Actúa sobre la síntesis de proteínas, al unirse a la subunidad 30S de los ribosomas 70S inhibe la iniciación o la elongación de la cadena peptídica, y también causa lecturas erróneas en la traducción. Además se sabe que la estreptomina tiene acción bactericida, alterando la permeabilidad de la membrana celular, lo que ocasiona la pérdida de los componentes celulares (Otten y Plembel, 1980; Crueger y Crueger, 1984; Florent, 1985; Davis, 1987).

La estreptomina forma sales con ácidos inorgánicos, de las cuales sólo el sulfato se utiliza clínicamente. Esta sal es un polvo blanco soluble en agua, poco soluble en etanol y prácticamente insoluble en disolventes orgánicos. El polvo seco se mantiene estable a temperatura ambiente durante varios años. Cuando se disuelve en soluciones amortiguadoras a pH entre 6 y 8 y se mantiene a temperaturas inferiores a 10°C, su actividad dura más de tres meses (Otten y Plembel, 1980).

Otras sales comercialmente importantes son el triclorhidrato de estreptomina, conocido comunmente como clorhidrato de estreptomina y la sal doble de triclorhidrato de estreptomina y cloruro de calcio, cuyo nombre común es complejo de clorhidrato de estreptomina (Centro para la Innovación Tecnológica, 1985).

La estreptomina ha sido empleada exitosamente en medicina humana y veterinaria y en la agricultura, ya sea sola o en combinación con otros compuestos (Crueger and Crueger, 1984). En medicina humana se ha utilizado para combatir la tuberculosis ya

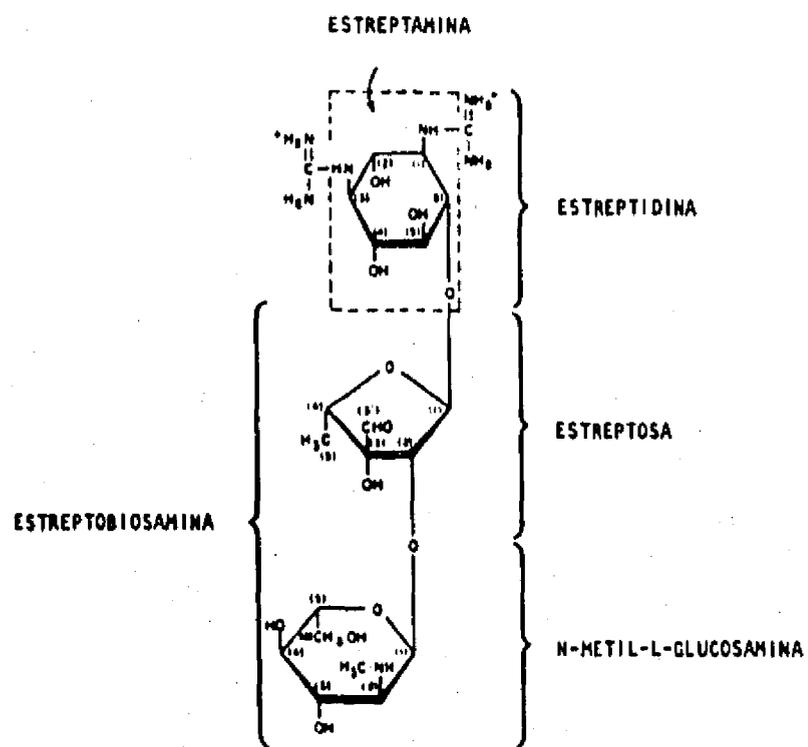


Fig. 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ESTREPTOMICINA.

que es especialmente activa contra Mycobacterium tuberculosis (Otten y Plembel, 1980; Okachi and Nara, 1984; Florent, 1985; Kase, 1985). En combinación con penicilina se usa en el tratamiento de endocarditis bacteriana, que es causante de la inflamación de la membrana interior del corazón. Junto con tetraciclina, se emplea contra la brucelosis o fiebre de malta, causada por especies de Brucella. Además se sabe que es el antibiótico más efectivo contra la peste y la tularemia, infecciones causadas por bacterias del género Pasteurella, que son transmitidas a los humanos por especies animales (Encyclopaedia Britannica, 1976; Kirby, 1980). Aunque presenta actividad antimicrobiana contra microorganismos Gram (-), comúnmente la estreptomina no se emplea para combatir infecciones producidas por este tipo de microorganismos, como la septicemia y de vías urinarias ó gastrointestinales. No es efectiva contra la salmonelosis y la mayoría de las cepas de Shigella sonnei son resistentes a este antibiótico (Kirby, 1980).

El empleo de la estreptomina por períodos prolongados causa toxicidad al riñón y al oído interno, con intensidad variable de acuerdo a la dosis empleada. La nefro-toxicidad se debe a su acumulación en el tejido renal en donde provoca alteraciones morfológicas y funcionales. Este padecimiento es reversible si se detecta a tiempo y se suspende el tratamiento o si se disminuye su dosis. La oto-toxicidad se debe al daño permanente del octavo par de los nervios craneanos. El daño a la rama coclear está asociado con la disminución de la capacidad auditiva, mientras que el daño a la rama vestibular se presenta como la pérdida del equilibrio (Kirby, 1980; Otten y Plembel, 1980; Florent, 1985; Kase, 1985).

En medicina veterinaria, la estreptomina se emplea para combatir varias infecciones causadas por microorganismos Gram (-) como la sinovitis infecciosa en pavos y pollos, así como para combatir males respiratorios crónicos en aves y en ganado (Okachi y Nara, 1984).

En la agricultura, la estreptomina sirve para combatir males infecciosos producidos por bacterias, en diversos cultivos (Okachi y Nara, 1984). No tiene efecto sobre hongos ni se convierte en algún compuesto tóxico a éstos. Se sabe que el antibiótico modifica a la planta huésped de tal manera que incrementa su resistencia a la enfermedad. Después de su aplicación, la estreptomina se absorbe y su acción persiste en los tejidos (Chattopadhyay and Bose, 1980). Entre los ejemplos de su uso están el combate de la plaga del nogal producida por Xanthomonas juglandis (Miller, 1956); contra la pudrición de la semilla de la papa, causado por Erwinia atroseptica y E. carotovora (Epps, 1957), para combatir el tizón bacteriano de la soya causado por Pseudomonas glycinea (Kaufmann and Chamberlain, 1957), la plaga del frijol pinto causada por Xanthomonas phaseoli (Marlatt, 1955), la mancha bacteriana del tomate causada por Xanthomonas vesicatoria (Coc, 1955) y el moho felpudo del haba

Phytophthora phaseoli (Zaunmeyer y Wester, 1956). La estreptomina también se emplea para combatir a Bacterium stewartii, cuya acción hace que se marchite el maíz (Rich, 1956) y a Pseudomonas tabaci, que ocasiona daños al cultivo del tabaco (Heggstad y col., 1956).

2. BIOSÍNTESIS DE LA ESTREPTOMICINA

La ruta de la biosíntesis de la estreptomina, fue propuesta por Demain e Inamine (1970). Estudios bioquímicos posteriores permitieron establecer el camino biosintético que se presenta en la Figura 2, el cual hasta la fecha ha sido generalmente aceptado (Claridge, 1979; Kniep y Grisebach, 1980; Kniep y Grisebach, 1980a; Walker, 1980; Walker y Walker, 1982; Florent, 1985).

Se demostró que la D-glucosa es el precursor común de las tres subunidades de la molécula de la estreptomina y que durante su biosíntesis participan cerca de treinta actividades enzimáticas. Los carbonos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de la D-glucosa corresponden respectivamente a los carbonos 5, 4, 3, 2, 1 y 6 de la estreptidina; a los carbonos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de la N-metil-L-glucosamina y a los carbonos 1, 2, 3', 3, 4 y 5 de la L-estreptosa.

En la Figura 2 se observa que durante la síntesis de estreptidina, la glucosa es primero convertida al inositol, el cual es transformado a través de reacciones enzimáticas de oxidación, aminación, fosforilación, carbamidinilación y desfosforilación. La primera aminación se lleva a cabo a partir de glutamina y la segunda a partir de alanina, para esto participan dos diferentes enzimas. Para las dos carbamidinilaciones, la arginina es el donador del grupo carbamidinilo, las enzimas involucradas son diferentes en ambos casos. Por otro lado, en la fosforilación de la inosamina y de la N-amidinoestreptamina participa la misma enzima, aunque la segunda fosforilación ocurre en el paso final de la síntesis de la estreptomina. En el caso de la estreptosa, la conversión se lleva a cabo mediante un rearrreglo intramolecular en el que la desoxitimidina-5'-difosfoglucosa (D-glucosa-1-dTDP), se convierte en 4-ceto-6-desoxi-D-glucosa, después en 4-ceto-L-ramnosa y finalmente en dihidroestreptosa. La formación de la N-metil-L-glucosamina a partir de D-glucosa aún no es clara, pero se sabe que ocurre una fosforilación, seguida de una transaminación para dar D-glucosamina-6-fosfato y, posteriormente, varias epimerizaciones. El grupo metilo proviene de la metionina. En algunos trabajos se ha reportado la presencia de fosfato de UDP-N-metil-D-glucosamina como intermediario. La unión de los

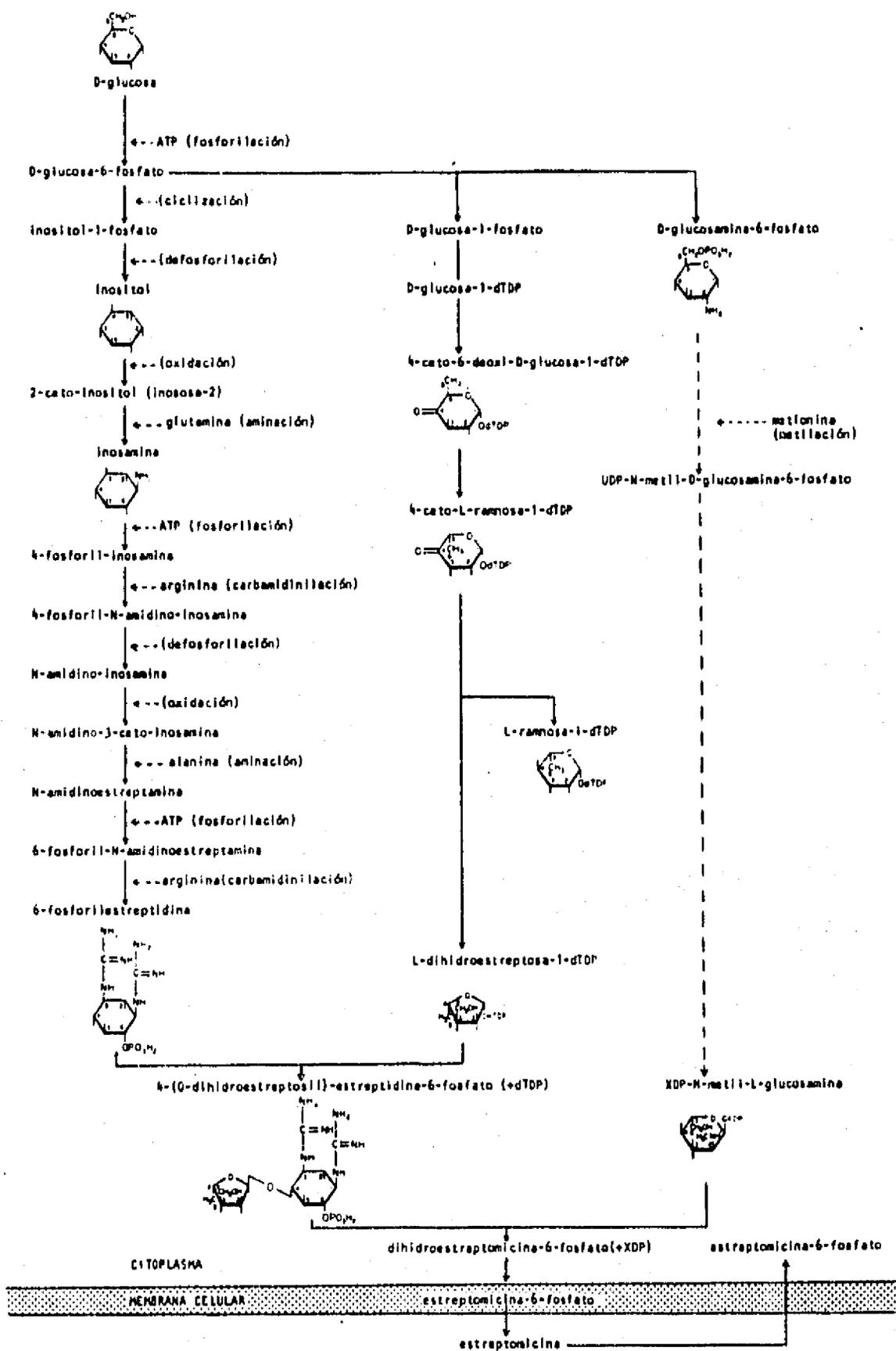


Fig. 2. CAMINO BIOSINTETICO DE LA ESTREPTOMICINA A PARTIR DE D-GLUCOSA.

elementos de la molécula de estreptomina se realiza en dos partes, primero la formación de fosfato de 4-O-(α -L-dihidroestreptosil) estreptidina a partir de fosfato de estreptidina y dTDP-L-dihidroestreptosa y después la formación de dihidroestreptomina-6-fosfato a partir de fosfato de dihidroestreptosil-estreptidina y XDP-N-metil-L-glucosamina.

Las reacciones descritas hasta este momento, ocurren en el citoplasma, la oxidación de la dihidroestreptomina-6-fosfato a estreptomina-6-fosfato se lleva a cabo en la membrana celular y la desfosforilación de la estreptomina-6-fosfato para dar estreptomina, que es el último paso del camino biosintético, se realiza en el exterior de la membrana celular (Distler, 1985a). Se encontró que la estreptomina, una vez producida se enlaza a la célula a través de un enlace iónico (Barabás y col., 1980).

Con el apoyo de la ingeniería genética varios investigadores han estudiado la genética de la producción de estreptomina (Distler y col., 1985a; Hotta e Ishikawa, 1988). Así, se encontró que las cepas productoras de estreptomina como son S. griseus y S. bikiniensis, presentan un fenotipo inestable y reversible que está relacionado con la resistencia del microorganismo al mismo antibiótico; la naturaleza cíclica de tal inestabilidad sugiere la presencia de un trasposon (elemento genético móvil) que afecta la expresión de uno o varios genes (Kirby y Lewis, 1981).

El factor A, cuyo nombre químico es 2S-isocapriloil-3R-hidroximetil- γ -butirolactona, se ha encontrado en cultivos de S. griseus. Su presencia es esencial para la biosíntesis de estreptomina y está relacionado con la resistencia del microorganismo a su propio antibiótico y con la formación de esporas (Hara y Beppu, 1982). Horinohuchi y col. (1984) encontraron que el determinante genético que codifica para la biosíntesis del factor A, al parecer esta presente en un elemento extracromosomal inestable en las cepas productoras de estreptomina.

Otros investigadores han realizado estudios sobre la resistencia a estreptomina de cepas de S. griseus, productoras del antibiótico. Tohyama y col. (1984) aislaron el gene que codifica para la estreptomina-6-fosfotransferasa, enzima que protege a la célula del efecto tóxico del antibiótico. Dado que la membrana de los microorganismos productores es permeable a la estreptomina extracelular principalmente durante la fase de crecimiento exponencial, la enzima estreptomina-6-fosfotransferasa fosforila la estreptomina presente en el caldo de cultivo convirtiéndola a estreptomina-6-fosfato en el interior de la célula (Nimi y col., 1981a). Este derivado que carece de actividad antimicrobiana y evita el efecto letal del antibiótico sobre el microorganismo productor, sale de la célula y nuevamente se hidroliza a estreptomina activa (Cella y Vining, 1975). La síntesis de la enzima estreptomina-6-

fosfotransferasa se induce por la propia estreptomicina (Shinkawa y col., 1985).

La función que realiza la fosfotransferasa, de proteger a la célula del efecto tóxico de la estreptomicina ha sido la más estudiada. Utilizando cepas de S. griseus, se detectó la existencia de dos genes que codifican para la síntesis de dos diferentes estreptomocina-6-fosfotransferasas, uno de los cuales se sobrepone con genes de función biosintética (Distler y col., 1985b). Poco después se encontró que el grupo de genes str contiene cuatro genes que están involucrados en la biosíntesis de la estreptomicina y en la resistencia a ésta; el gene strA codifica para la síntesis de estreptomocina-6-fosfotransferasa, el strB codifica para la amidinotransferasa que tiene función biosintética, al igual que el gene strC que al parecer codifica para la dihidroestreptosiltransferasa o para la estreptomocina-6-fosfohidrolasa y, finalmente, el gene strR que codifica para un elemento positivo requerido para la completa expresión de los genes strA y strB. Los genes strA y strR comparten una región común regulatoria que dirige strR (Ohnuki y col., 1985). Más tarde se determinó la secuencia de nucleótidos de strB y strR (Distler y col., 1987; Tohyama y col., 1987) y del gene strD que posiblemente codifica para una enzima biosintética (Distler y col., 1987).

Adicionalmente, otros estudios permitieron aislar el gene que dirige la síntesis de N-metil-L-glucosamina de una cepa de S. griseus (Kumada y col., 1986).

3. FACTORES QUE REGULAN LA BIOSÍNTESIS DE ESTREPTOMICINA

En términos generales, durante el cultivo de S. griseus se observa una fase de crecimiento seguida de una fase de producción, lo que sugiere la presencia de mecanismos que regulan la biosíntesis de estreptomicina. Esto significaría que la inducción o des-represión de enzimas involucradas en la biosíntesis del antibiótico se podría presentar al final de la fase de crecimiento (Demain e Inamine, 1970)

3.1 Papel del fosfato

Según la literatura, existen varios puntos de regulación importantes durante la biosíntesis de metabolitos secundarios en los cuales el nivel de fosfato inorgánico juega un papel importante. Para entender el efecto regulatorio del fosfato sobre el metabolismo secundario, es necesario considerar en principio, su participación en un gran número de reacciones enzimáticas del metabolismo primario. El nivel de fosfato en el medio controla,

por un lado, la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y, por otro, el metabolismo de la fuente de carbono, la respiración celular y los niveles de ATP (Martín, 1977).

En estudios realizados para conocer el catabolismo de la glucosa por *S. griseus*, se sugirió que el microorganismo utilizaba principalmente la vía Embden-Meyerhof y el ciclo de los ácidos tricarbónicos al metabolizar la glucosa, y que solamente una pequeña porción se degradaba vía hexosa monofosfato (Wang y col., 1958). Sin embargo, estudios posteriores indicaron que esta última vía es más importante de lo que se había considerado (Silverman y Rieder, 1960). Se estableció que el nivel de fosfato inorgánico cambia la ruta metabólica de la fuente de carbono. Altas concentraciones de fosfato en el medio disminuyen la actividad de la vía de hexosa monofosfato favoreciendo la glicólisis y, por lo tanto, la velocidad de utilización de glucosa y la acumulación de lactato y piruvato (Hockenhull y col., 1954; Hockenhull, 1960; Demain e Inamine, 1970). El cambio del camino metabólico por efecto del fosfato, podría interpretarse como un efecto regulado por ATP, ya que éste actúa como un control fino sobre las enzimas que permiten la ramificación de rutas (Martín, 1977).

Los altos niveles de fosfato al activar la velocidad de respiración, incrementan la actividad del ciclo de los ácidos tricarbónicos, disminuyendo así la concentración de inositol que es el precursor de la síntesis de estreptidina. Se cree que el fosfato es un inhibidor de la glucosa-6-P cicloaldolasa, enzima que cataliza la conversión de glucosa-6-P a inositol-1-P y parece ser la única enzima responsable de la síntesis de inositol (Martín, 1977).

De acuerdo a Martín (1977), para favorecer la síntesis de estreptomina, la concentración de fosfato inorgánico en el medio debe estar entre 1.5 y 15 mM, según la fuente de carbono empleada. Cuando la concentración de fosfato es alta, la síntesis de ácidos nucleicos se da a velocidades altas. Cuando esta velocidad disminuye, entonces toma lugar la síntesis del antibiótico. Así también se incrementa la velocidad de utilización de glucosa y el peso micelial. Al parecer, la síntesis del antibiótico es inhibida durante el crecimiento balanceado a altas velocidades y su expresión requiere de cierto grado de limitación de crecimiento que es diferente en los distintos productores de antibióticos.

Se ha establecido que, cuando el nivel de fosfato inorgánico en el medio es alto, la síntesis de la amidinotransferasa, enzima que actúa en dos pasos de la ruta biosintética de estreptidina, también se ve afectada negativamente (Demain e Inamine, 1970).

Otros estudios indican que altos niveles de fosfato regulan a los inductores de la síntesis del antibiótico. Tales efectores se reconocen por su efecto sobre la formación de producto cuando

están presentes durante la fase de crecimiento y carecen de efecto en la idiofase. Por ejemplo, el factor A induce la síntesis de estreptomina en mutantes no productoras (Martín, 1977). Se menciona que el factor A podría favorecer la síntesis de inositol a partir de glucosa-6-P al inhibir a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Walker, 1982), además, induce a la estreptomina-6-fosfotransferasa, la cual da la resistencia a la estreptomina (Hara y Beppu, 1982).

El fosfato también regula a las fosfatasas que intervienen en la síntesis de estreptidina y en el último paso de la vía de obtención de estreptomina (Demain e Inamine, 1970; Martín, 1977). Se ha reportado que durante el crecimiento de *S. griseus* en exceso de fosfato, existe acumulación de derivados de estreptomina fosforilados que no presentan actividad antimicrobiana. Utilizando dos cepas de *S. griseus*, ATCC 12475 y SC 2376, crecidas en medio complejo se observó producción del antibiótico; cuando al mismo medio se le adicionó fosfato inorgánico, a una concentración final de 0.01 M, se detectó solamente acumulación de estreptomina-6-fosfato y al mismo tiempo se encontró que la fosfatasa que actúa sobre la estreptomina-6-fosfato se inhibió por exceso de fosfato (Miller y Walker, 1970).

El balance fosfato/glucosa juega un papel importante para favorecer la formación de estreptomina. En cultivo en lote, por ejemplo, el fosfato debe consumirse durante la trofofase y para permitir la formación del antibiótico en la idiofase debe existir glucosa residual (Inoue y col., 1982a). Por otra parte, en cultivo continuo, sólo se forma estreptomina cuando hay una limitación extrema de fosfato (Inoue y col., 1982b).

Martín (1977), sugirió que el efecto del fosfato sobre la biosíntesis de la estreptomina podría estar regulado por un factor común como sería la concentración intracelular de AMP cíclico, dado que éste se forma una vez que la velocidad de crecimiento empieza a disminuir, cuando se acerca a la fase estacionaria. Estudios posteriores demostraron que la concentración intracelular de AMP cíclico en *S. griseus*, fue más alta durante la fase de crecimiento logarítmico, y se redujo poco antes de alcanzar la fase estacionaria. Al inicio de la síntesis de la estreptomina, se detectó solo una mínima cantidad de AMP cíclico, lo que sugirió que una alta concentración intracelular de éste no tuvo efecto regulatorio sobre la síntesis del antibiótico, en contraste con el efecto que se ha observado en otras bacterias (Ragan y Vining, 1978; Hu y Demain, 1979, Martín y Demain, 1980).

3.2 Papel de la fuente de nitrógeno

Se encontró que en un medio químicamente definido, a pH constante, la formación de estreptomina es estimulada por la

adición de cantidades crecientes de sulfato de amonio. En esta situación, se incrementan los niveles de ácido glutámico y glutamina debido a que estos dos sirven como donadores de grupos amino. Cuando se adicionan ácido glutámico, glutamina ó glucosamina al medio de cultivo al final de la trofofase, la síntesis del antibiótico se estimula en la idiofase (Inoue y col., 1983).

3.3 Efecto del propio antibiótico

Se sabe que la estreptomycinina tiene efecto sobre tres enzimas de la vía: la estreptomycinina-6-cinasa, que actúa sobre el C6 de estreptidina; la dihidroestreptomycinina-3'-cinasa, que presenta actividad sobre el C3' de la estreptosa y también la estreptomycinina-3"-cinasa que actúa sobre el C3" de la N-metil-L-glucosamina (Demain e Inamine, 1970; Martín, 1977).

3.4 Papel de la fuente de carbono

En algunos cultivos de S. griseus, se ha detectado la acumulación de manosidoestreptomycinina, un derivado que, al parecer, se forma a partir de estreptomycinina o de algún precursor de ésta. La conversión de este derivado a estreptomycinina es el resultado de una manosidasa que rompe el enlace glicosídico entre la molécula de manosa y la N-metil-L-glucosamina de la estreptomycinina. Esta manosidasa, que se produce durante el mismo cultivo, está sujeta a un fenómeno de represión catabólica, por lo que empieza a sintetizarse cuando la glucosa del medio ha sido completamente agotada (Inamine y col., 1969; Demain e Inamine, 1970; Hu y Demain, 1979; Martín y Demain, 1980). No se sabe que alguna otra fuente de carbono presente efecto regulatorio sobre la síntesis de estreptomycinina.

Los efectos regulatorios descritos, se resumen en la Tabla 1.

4. DERIVADOS DE LA ESTREPTOMICINA

La estreptomycinina, que también se conoce como estreptomycinina A, es producida principalmente por S. griseus, siendo solo algunas cepas las que son capaces de producir cantidades considerables del antibiótico. Otras especies de Streptomyces producen derivados de estreptomycinina como manosidoestreptomycinina o estreptomycinina B, dihidroestreptomycinina, manosidodihidro-

TABLA 1

FACTORES QUE REGULAN LA BIOSINTESIS DE ESTREPTOMICINA

Fosfato	<p>una baja concentración permite</p> <ul style="list-style-type: none"> - reducir la velocidad de utilización de glucosa - evitar la acumulación de lactato y piruvato - la acumulación de inositol que es un precursor de la estreptidina - reducir la velocidad de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas - la síntesis de aminotransferasa, enzima que participa en la biosíntesis - evitar la acumulación de derivados fosforilados que carecen de actividad antibiótica
Amonio	<p>incrementa los niveles de ácido glutámico y glutamina que son donadores de grupos amino.</p>
Estreptomicina*	<p>una alta concentración al inicio del crecimiento tiene efecto negativo sobre las enzimas biosintéticas.</p>
Glucosa	<p>en cepas que producen manosidoestreptomicina reprime la síntesis de manosidasa, enzima que libera estreptomicina a partir del derivado.</p>

estreptomina, hidroxiestreptomina y N-dimetilestreptomina (Demain e Inamine, 1970; Claridge, 1979; Okachi y Nara, 1984; Florent, 1985; Atkinson y Havituna, 1983).

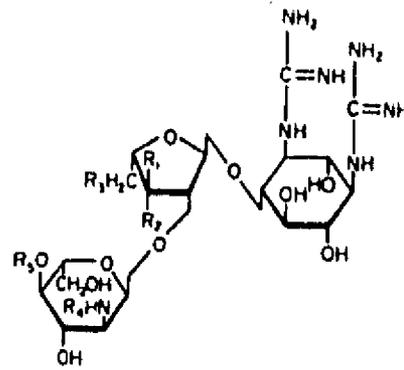
Las diferencias en la estructura química de estos derivados se muestra en la Figura 3. Solamente la hidroxiestreptomina (Benedict y col., 1951) y la dihidroestreptomina presentan una actividad antimicrobiana similar a la de la estreptomina como se observa en la Tabla 2.

La dihidroestreptomina también se usa clínicamente y se produce de manera comercial por reducción catalítica de la estreptomina a pesar de que se ha mencionado que su producción por fermentación directa presenta ciertas ventajas económicas (Kavanagh y col., 1960). Se sabe que este derivado aunque afecta en menor grado al sistema vestibular, muestra una mayor toxicidad sobre la rama auditiva (Otten y Plembel, 1980; Florent, 1985). Otro derivado semisintético que fue utilizado clínicamente en Japón hace algunos años, es la deoxidihidroestreptomina cuya actividad es similar a la de estreptomina y parece ser menos tóxico. Aunque la actividad antimicrobiana de estos dos derivados semisintéticos es similar, el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico que presentan es diferente (Otten y Plembel, 1980).

La manosidoestreptomina o estreptomina B, se sintetiza de manera simultánea a la estreptomina. Este derivado se encuentra hasta en un 40% del total de la estreptomina producida en la fermentación (Hockenhull, 1960). Ya que la actividad antibiótica de este derivado es entre 20 y 25% de la que presenta la estreptomina, su hidrólisis enzimática tiene gran importancia económica (Demain e Inamine, 1970).

5. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS PARA LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

Los medios de cultivo que se han descrito para la producción de estreptomina han sido desarrollados empíricamente. En la primera formulación que se describió, destacaba la presencia de extracto de carne o agua de cocimiento de maíz como fuente de nitrógeno (Garner y col., 1953; Hockenhull, 1960; Demain e Inamine, 1970). En estudios posteriores, se definió un medio que llegó a ser clásico para la producción del antibiótico el cual contenía glucosa, harina de soya y cloruro de sodio (Rake y Donovik, 1946). Más tarde, Dulaney (1948a) utilizó este mismo medio para seleccionar cepas de S. griseus que produjeran altos niveles de estreptomina. Cuando obtuvo las mutantes



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Estreptomicina	CHO	OH	H	CH ₃	H
Dihidroestreptomicina	CH ₂ OH	OH	H	CH ₃	H
Hidroestreptomicina	CHO	OH	OH	CH ₃	H
N-Demetilestreptomicina	CHO	OH	H	H	H
Deoxidihidroestreptomicina	CH ₂ OH	H	H	CH ₃	H
Manosidoestreptomicina	CHO	OH	H	CH ₃	M ^A
Manosidodihidroestreptomicina	CH ₂ OH	OH	H	CH ₃	M ^A

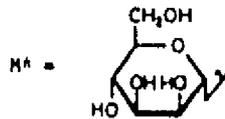


Fig. 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS DIFERENTES DERIVADOS DE LA ESTREPTOMICINA.

TABLA 2

DERIVADOS DE LA ESTREPTOMICINA PRODUCIDOS POR ESPECIES DE *Streptomyces*

Derivado	Microorganismo productor	Actividad antibiótica relativa
Estreptomicina	<i>S. griseus</i> <i>S. bikiniensis</i>	1.0
Manosidoestreptomicina	<i>S. griseus</i>	0.20-0.25
Dihidroestreptomicina	<i>S. humidus</i>	1.0
Hidroxiestreptomicina	<i>S. griseocarneus</i> <i>S. glaucescens</i> <i>S. subbrutilus</i>	1.0
N-demetilestreptomicina	<i>S. griseus</i>	0.10
Manosidohidroxiestreptomicina	<i>Streptomyces</i> sp.	menor a 1.0

hiperproductoras, modificó la composición del medio por adición de destilados solubles (Dulaney, 1951).

Otros estudios también citan el empleo de la harina de soya como fuente de nitrógeno (Rake y Donovan, 1946; Perlman y col., 1954; Shirato y Motoyama, 1966; Singh y col., 1976;). Su efectividad en la producción de estreptomycin al parecer se debe a su lenta degradación, lo que permite un suministro continuo de nitrógeno orgánico a lo largo de la fermentación (Rake y Donovan, 1946; Aharonowitz, 1980).

El empleo de materiales como agua de cocimiento de maíz, hidrolizado enzimático de caseína, preparaciones de levadura y destilados solubles es común, dada su efectividad como fuentes de nitrógeno (Dulaney, 1948b; Mc Daniel, 1950; Hockenull, 1960; Nomi, 1963; Demain e Inamine, 1970; Miller y Walker, 1970; Cella y Vining, 1975; Inoue y col., 1982a). Ocasionalmente estos compuestos son adicionados para propósitos específicos, como por ejemplo, para estimular la producción de la manosidasa, enzima que libera estreptomycin a partir de su derivado unido a manosa (Hockenull, 1960; Demain e Inamine, 1970).

Varios aminoácidos han sido evaluados como fuente de nitrógeno. Entre ellos, la prolina es la más efectiva a pesar de que se observa una fase de adaptación muy larga (Dulaney, 1948b). Esta puede reducirse si se adicionan trazas de fosfato de amonio al medio de cultivo (Woodruff y Ruger, 1948). Otros aminoácidos que han dado buenos resultados son glicina, β -alanina, histidina, asparagina, arginina, glutamato (Dulaney, 1948b), glutamina y glucosamina (Inoue y col., 1983).

La estreptomycin puede ser sintetizada cuando una sal de amonio como fosfato, sulfato o cloruro, es utilizada como única fuente de nitrógeno en presencia de carbonato de calcio, aunque el título de producción es menor a la que se alcanza con nitrógeno orgánico. Los nitratos o nitritos no son capaces de soportar el crecimiento del microorganismo, mucho menos la producción del metabolito (Dulaney, 1948b). La combinación de citrato de amonio y sulfato de amonio resultó benéfica para la producción del antibiótico (Shirato y Motoyama, 1966).

Para la producción de estreptomycin, la glucosa es la fuente de carbono mas utilizada aunque otros compuestos como la manosa, maltosa, glicerol, manitol, almidón, dextrinas y fructosa pueden soportar el crecimiento del microorganismo y la producción del metabolito. Sacarosa, sorbosa, sorbitol, ácidos orgánicos o pentosas, empleadas como única fuente de carbono, no soportan el crecimiento y en medios complejos dan una mínima producción del antibiótico (Dulaney, 1949). También se describió un medio conteniendo una mezcla de dextrinas y glucosa como fuente de carbono para cultivar una mutante de S. griseus resistente a fagos (Carvajal, 1957).

Aceites de maíz, de soya, de semilla de algodón, de linaza, de oliva, de cacahuete, de coco, de sésamo y de ballena, sebo y otros ácidos grasos como triesteamín, trilaurín, esteárico, oléico, palmítico y sus glicéridos, pueden reemplazar a la glucosa con excelentes resultados (Perlman y Wagman, 1952).

Algunos iones también son necesarios para asegurar buen crecimiento y biosíntesis de estreptomina, tal es el caso de Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} y Ca^{++} . Por lo general todos ellos, a excepción del Na^+ , pueden ser omitidos cuando se tiene un medio complejo. El papel del calcio como estimulante en la producción de estreptomina al parecer se debe a que revierte los efectos de una alta concentración de fosfato que se tiene al emplear compuestos complejos. También se ha citado que el calcio incrementa la reproducibilidad de los experimentos, debido a un retraso en la lisis del micelio (Demain e Inamine, 1970).

Al parecer, la presencia de los iones Na^+ podría estar involucrada en la liberación de la estreptomina, la cual se encuentra unida al micelio por enlace iónico (Demain e Inamine, 1970; Barabás y Szabo, 1980).

El barbital y otros compuestos relacionados presentan un efecto estimulador sobre la producción de estreptomina, ya que tienden a incrementar la resistencia del micelio a la autólisis (Ferguson y col., 1957).

En la Tabla 3 se enlistan los compuestos estimuladores de la producción de estreptomina que han sido descritos hasta ahora.

6. PRODUCCION FERMENTATIVA DE ESTREPTOMICINA

La estreptomina fue el primer antibiótico sintetizado por un actinomiceto que se produjo en forma comercial (Claridge, 1979; Okachi y Nara, 1984). Desde su descubrimiento se realizaron varios estudios para definir las condiciones de pH, temperatura y nivel de oxigenación que favorecen su producción (Tabla 4).

Las fermentaciones de estreptomina por lo general se llevan a cabo a un pH inicial alrededor de 7, el cual es también el pH óptimo para la utilización de la glucosa y del fosfato inorgánico (Demain e Inamine, 1970). Algunos estudios realizados por Inoue y col. (1982a) demostraron que el pH tiene efecto

TABLA 3

COMPUESTOS QUE ESTIMULAN LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

cloruro de sodio	favorece la liberación del antibiótico al medio
glucosa	a partir de ésta se sintetizan las tres subunidades de la estreptomicina
harina de soya	por su lenta degradación, proporciona nitrógeno durante toda la fermentación
levadura	estimula la producción de manosidasa, enzima que libera estreptomicina a partir de la manosidoestrep <u>tomicina</u>
calcio	revierte el efecto inhibitorio causado por altos niveles de fosfato
elementos traza	magnesio, zinc, cobre y potasio aseguran buen crecimiento y biosíntesis de la estreptomicina
glutamato	precursor de glutamina
glutamina	donador de grupos amino para la síntesis de glucosa <u>mina-6-P</u> , precursor de la estreptomicina
glucosamina	precursor de la estreptomicina
factor A	induce a la estreptomicina-6-fosfotransferasa que da la resistencia a estreptomicina
barbital	incrementa la resistencia del micelio a la autólisis

TABLA 4

CONDICIONES DE FERMENTACION QUE FAVORECEN
LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

temperatura	entre 24 y 30°C
pH inicial	entre 6.0 y 7.0
oxigenación	se recomiendan altos niveles de transferencia de oxígeno; el consumo de potencia por unidad de volumen (Pg/v) para fermentadores de 5 l se ha reportado del orden de 0.37 w/l (Karow y col., 1953) y de 1.89 w/l (Dulaney, 1951); para fermentadores de 57,000 l, 0.26 w/l (Karow y col., 1953).

crítico sobre la formación de estreptomicina, especialmente en la idiofase. Utilizando la cepa de S. griseus HUT 6037, estos autores encontraron que a un pH constante entre 6.0 y 6.5, la formación del antibiótico ocurre en la trofofase y en la idiofase, mientras que a 7.0 y 8.0 solo se detecta durante la idiofase.

La temperatura óptima para la producción de estreptomicina varía entre 24 y 30°C, dependiendo de la cepa (Bartholomew y col., 1950; Hockenhull, 1960). A más de 30°C se observa buen crecimiento incluso a 37°C, pero hay una brusca caída en la producción (Thornberry y Anderson, 1948; Dulaney, 1951).

Para favorecer la producción de estreptomicina se requieren altos niveles de transferencia de oxígeno, ya que una oxigenación restringida incrementa la velocidad de utilización de glucosa, lo que resulta en la acumulación de lactato y piruvato en el medio (Hockenhull, 1954, 1960; Demain e Inamine, 1970; Scriban, 1985). Utilizando un medio con extracto de carne, se encontró que al incrementar la velocidad de aeración en fermentadores, se favoreció la producción del antibiótico; a 1 vvm se obtuvieron menos de 50 mg/l, mientras que entre 2 y 6 vvm se incrementó a 75 mg/l (Kempf y Sayles, 1946).

Utilizando dos mutantes hiperproductoras, se describió el efecto de la transferencia de oxígeno sobre la producción de estreptomicina en fermentadores con diferentes valores de consumo de potencia por unidad de volumen, manteniendo constante la velocidad superficial del aire. Con la mutante Z-38, se obtuvieron 1656 mg/l con un consumo de potencia de 0.97 W/l, al aumentar éste a 1.89 W/l la producción aumentó a 2051 mg/l, la respuesta ya no fué la misma al incrementarse la potencia a 4.53 W/l ya que solo se alcanzaron 2077 mg/l. La mutante L-118 mostró un comportamiento similar aunque el título de producción alcanzado fué de 980 mg/l a la máxima potencia estudiada de 18.12 W/l, con esto se demostró la necesidad de tener altos niveles de transferencia de oxígeno para favorecer la producción del antibiótico, aunque cada cepa tiene sus propios requerimientos (Dulaney, 1951).

Estudios realizados por Karow y col. (1953), demostraron que al incrementar la transferencia de oxígeno en el cultivo a través de un aumento en el consumo de potencia, se favoreció la producción de estreptomicina. En fermentadores de 5 litros el aumento de 0.18 a 0.37 W/l, incrementó 5 veces el título de antibiótico. En reactores de 57,000 litros el aumento en el consumo de potencia de 0.14 a 0.26 W/l, duplicó la producción.

Los títulos de estreptomicina obtenidos con las diferentes cepas de S. griseus que se citan en la literatura, se enlistan en la Tabla 5. Las cepas, los tiempos en que se alcanza la máxima producción así como los títulos de estreptomicina alcanzados, son

TABLA 5

TITULOS MAXIMOS DE ESTREPTOMICINA ALCANZADOS POR DIFERENTES CEPAS DE S. griseus

Cepa	Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno	mg EM [*] /l	días [‡]	Referencia
	glucosa	harina de soya	237	7	Rake y Donovick, 1946.
	glucosa	fosfato de amonio	155	6	Dulaney, 1948.
	glucosa	sólidos de cocimiento de maíz	303	5	Dulaney, 1948.
	glucosa	prolina	800	9	Dulaney, 1948.
E15-1	glucosa	extracto de carne + peptona	1000	4	Garner y col., 1953.
K-1	glucosa	harina de soya + levadura seca + sulfato de amonio	3000	5-10	Shirato y Motoyama, 1966.
ATCC 12475	glucosa	soytone + sólidos de cocimiento de maíz	450	6	Miller y Walker, 1970.
SC 2376	glucosa	soytone + sólidos de cocimiento de maíz	700	5	Miller y Walker, 1970.
DTH-2	glucosa + dextrinas	harina de soya + sulfato de amonio + sólidos de cocimiento de maíz	5650	8	Singh y col., 1976.
HUT 6037	glucosa	sulfato de amonio + asparagina	200	4	Inoue y col., 1982.

* EM significa estreptomicina
[‡] días en que se alcanzó la máxima producción

muy variados. El título más bajo es de 155 mg/l (Dulaney, 1948b) y el más alto de 5,650 mg/l (Singh y col., 1976). Asimismo, puede observarse que por lo general se utilizó glucosa como única fuente de carbono, a excepción de Singh y col. (1976) quienes utilizaron una mezcla de glucosa y dextrinas. En relación a la fuente de nitrógeno se observa una preferencia por el uso de materiales complejos, como fue indicado por Demain e Inamine (1970).

La información acerca de los aspectos prácticos involucrados en la producción de estreptomicina a escala comercial es muy limitada, dado que ésta se mantiene en secrecía (Okachi y Nara, 1984). No obstante, es posible tener un panorama de la evolución que ha tenido la tecnología patentada a nivel mundial, el cual se presenta en la Figura 4.

El título de estreptomicina que se reportó en la primera patente aparecida, en 1948, fue de 250 mg/l. Esta cepa fue sometida a mejoramiento genético con lo cual el título se incrementó a 800 mg/l (Dulaney, 1948a). De las 8 patentes que aparecieron entre 1950 y 1951, 7 de ellas se enfocaron a la formulación de medios de cultivo sin que esto mejorara de manera notable el título de antibiótico. En su mayoría se reportó el uso de materiales complejos como destilados solubles (Colingsworth, 1950; McDaniel, 1951; McDaniel y Hendlin, 1951) levadura de cerveza (McDaniel, 1950), harina de soya (Donovick y col., 1950; McDaniel, 1951; Trussell, 1951), hidrolizado de caseína (McDaniel y Hendlin, 1951) y agua de cocimiento de maíz (Trussell, 1951).

En 1951 apareció la patente de una mutante sobreproductora capaz de alcanzar títulos de 2,000 mg/l en un medio con harina de soya y destilados solubles (Dulaney, 1951). Posteriormente, se sugirió el empleo de pasta de soya y malta en el medio de cultivo (Kawasaki, 1957), o una mezcla de levadura de cerveza y extracto de pescado (Nakayama, 1960). En 1957, Dulaney (1957) obtuvo una mutante sobreproductora con nuevas características atractivas para un proceso industrial, tales como insensibilidad a la acción de fagos y resistencia a su propio antibiótico, que alcanzó un título de producción de 3,700 mg/l, en un medio con sulfato de amonio y nitrato de sodio. A partir de ese año varias patentes reportaron el uso de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Kubo y col., 1962; Bormann y col., 1980; Monteanu y col., 1982; Bormann y col., 1984) ya que hasta entonces solo una patente había reportado el empleo de una sal inorgánica como fuente de nitrógeno, que fue nitrato de amonio (Baron, 1950).

Fue hasta 1979 cuando se obtuvo una mutante capaz de alcanzar títulos de producción considerablemente más altos, de 10,000 mg/l (Bormann y col., 1980). Para 1981 el incremento fue aún mayor, de 13,000 mg/l (Monteanu y col., 1982). En la última patente reportada se habla de un título de 5,800 mg/l (Bormann y col., 1984).

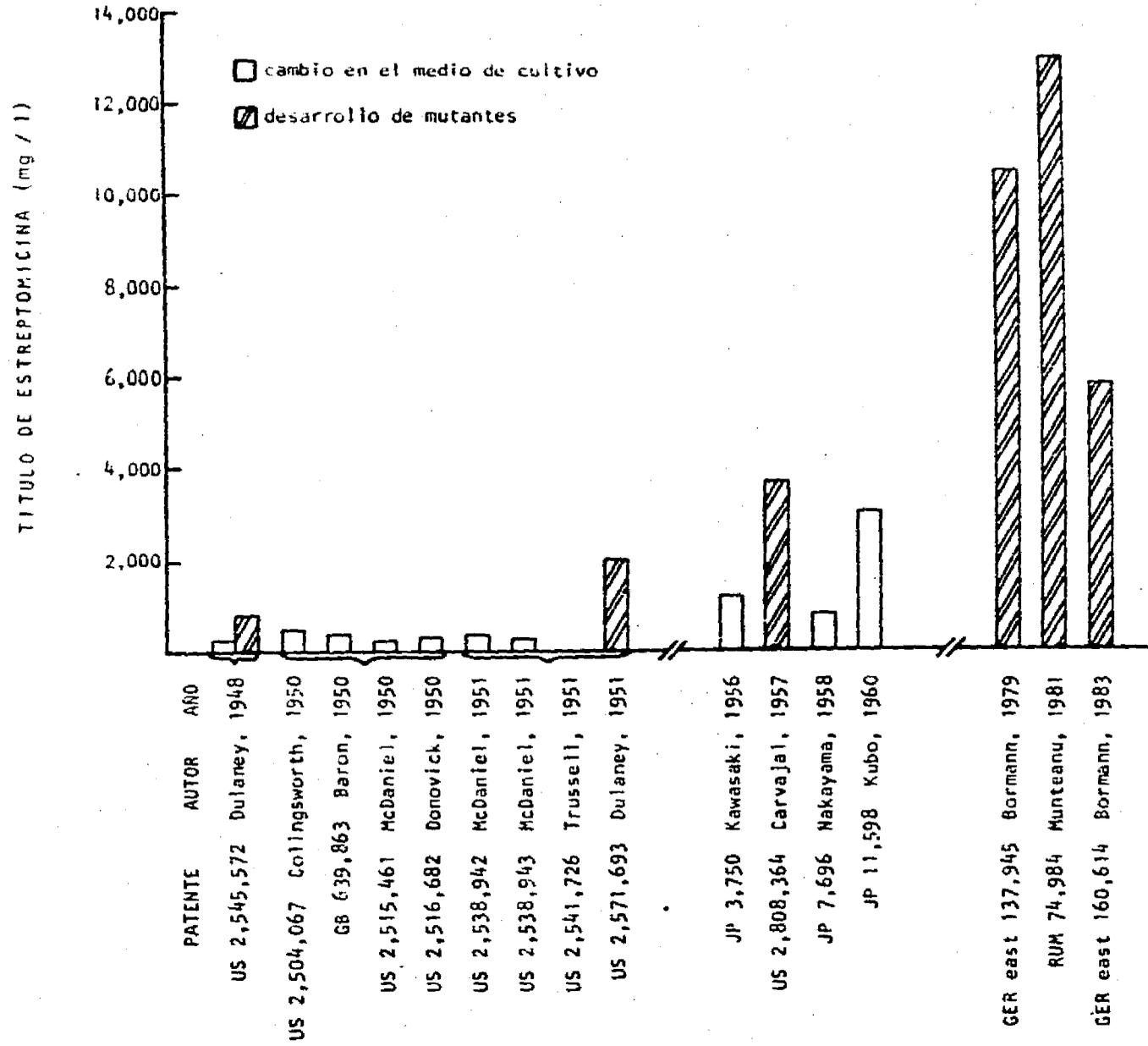


Fig. 4. Evolución de la tecnología para la producción de estreptomicina

Como pudo observarse en la Figura 4, los más altos títulos de producción corresponden a los obtenidos con cepas que han sido mejoradas genéticamente. Este, es un reflejo de la importancia de contar con microorganismos altamente productores para el establecimiento de procesos de producción a escala industrial. Al respecto, Florent (1985) menciona que a partir del descubrimiento de la estreptomicina por Waksman y su grupo, la productividad de las cepas de S. griseus usadas en la industria hasta la fecha se ha incrementado por arriba de 100 veces a través de programas de obtención de mutantes mediante el uso de agentes físicos, químicos y también biológicos.

7. DEGENERACION DEL CULTIVO

La degeneración del cultivo es otro de los principales problemas que han requerido atención en la producción industrial de estreptomicina. Perlman y col. (1954) encontraron que la producción de estreptomicina por una mutante de S. griseus disminuyó notablemente en subcultivos sucesivos de la cepa. La pérdida de la capacidad de producción fue correlacionada con un cambio en la morfología de la población.

El metabolismo del fierro también parece jugar un papel importante en la degeneración del cultivo. Esta degeneración es acompañada de la inhibición de la síntesis de un citocromo y la producción de un pigmento del tipo cuproporfirina enlazado al micelio. La transferencia de S. griseus a un medio sin fierro retarda la degeneración del cultivo (Musílek, 1963).

Entre las características que acompañan a los cultivos degenerados incluyen el incremento en la velocidad de crecimiento y la velocidad de utilización de la fuente de carbono, aumento en la capacidad de usar arabinosa para el crecimiento, cambios en la proporción de carbohidratos en la pared celular, incremento en la susceptibilidad a la lisozima, formación de esporas en cultivo sumergido y pérdida de la capacidad de producir un pigmento amarillo soluble (Perlman y col., 1954; Musílek, 1963; Nomi, 1963; Demain e Inamine, 1970).

8. RESISTENCIA A FAGOS

Desde las primeras fermentaciones de estreptomicina que se llevaron a cabo, se detectó la existencia de fagos (Saudek y

Colingsworth, 1947). Las características de un cultivo de estreptomycinina infectado por fagos, son la pérdida de viscosidad, la disminución o aumento del crecimiento micelial, muy baja o nula cantidad de antibiótico en el medio y la presencia de un pigmento café oscuro soluble.

El mecanismo de acción que determina la lisis del micelio de S. griseus y la formación de placas es dependiente de la disponibilidad de agua libre en el medio, que ayuda a la difusión del fago y a su penetración en las células, con la consecuente lisis. Algunos estudios realizados demostraron que la multiplicación del fago puede limitarse por la adición de citrato, oxalato y fitato los cuales son capaces de secuestrar el calcio en el medio antes de que la infección de las células por fagos tome lugar (Carvajal, 1953).

Después de muchos estudios se demostró que los fagos atacan solamente a las cepas productoras de estreptomycinina y no afectan otros microorganismos productores del antibiótico como S. bikiniensis o sobre otras especies de Streptomyces. Los fagos se multiplican solamente en células vivas a una temperatura óptima de 28°C (Carvajal, 1953).

A través del desarrollo de cepas de S. griseus inmunes a fagos, no solo fue eliminado el problema de este tipo de infección, también se logró aumentar el rendimiento de estreptomycinina (Carvajal, 1953; 1957).

9. MERCADO DE LA ESTREPTOMICINA EN MEXICO

En México la estreptomycinina se encuentra dentro del Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud (1986). Cada año se ha incrementado su consumo por parte de los organismos de seguridad social del estado así como las ventas del antibiótico al público en general. Aunque no se tienen cifras específicas del consumo de estreptomycinina para usos agrícola y veterinario, el sector industrial ha identificado un mercado considerable de aplicación en agricultura (Centro para la Innovación Tecnológica, 1985).

En virtud de que la estreptomycinina no se produce en México, se hace necesaria su importación de otros países para satisfacer el total de la demanda. Un análisis del comportamiento de las compras del antibiótico al extranjero en los últimos 10 años muestra un incremento de tipo exponencial en el valor de las importaciones así como en el precio medio unitario, ambos expresados en moneda nacional (pesos corrientes), como se muestra

en la Figura 5. El volumen de estreptomocina importada de 1979 a 1989 presenta un comportamiento irregular. En los años 1981 y 1985 se observan cifras por arriba de las 100 toneladas que son muy altas comparadas con el volumen importado en los otros años que fue en promedio de 55 toneladas. De 1987 a 1989, la cantidad de estreptomocina importada presentó un incremento paulatino, lo que podría sugerir que para los siguientes años será mayor a las 70 toneladas.

Durante el análisis realizado se detectó la influencia de dos factores que junto con la devaluación de la moneda nacional, influyeron el comportamiento irregular observado en el volumen de importación. Estos factores son: 1) la estreptomocina como producto comercial se encuentra en forma de sales, que en el mercado comunmente se conocen como sulfato de estreptomocina, clorhidrato de estreptomocina y complejo clorhidrato de estreptomocina-cloruro de calcio, siendo el costo de cada uno de ellos diferente, y 2) el costo unitario del producto en cada uno de los países donde se adquiere, es muy variable como se muestra en la Tabla 6. Por ejemplo, en 1989 la estreptomocina se importó de 12 diferentes países, el costo más bajo fue de \$32,839 M.N./kg para el producto de Hong Kong mientras que el más alto fue de \$547,114 M.N./kg para el de España. Es de esperarse que estas diferencias se deban no solo al tipo de sal, sino también al grado de pureza de la misma.

No obstante que la cantidad de estreptomocina importada ha presentado variaciones en la pasada década, el mínimo valor observado de acuerdo a la Figura 5 sobrepasa las 40 toneladas anuales, cifra que podría ser cubierta si se contara con una tecnología para su producción comercial en México. A pesar de que la estreptomocina se produce comercialmente en otros países desde 1948 (Florent, 1985), en México no se han desarrollado hasta la fecha, proyectos tendientes a implementar una tecnología propia.

Un estudio realizado sobre la evaluación tecnológica de la producción de estreptomocina (Centro para la Innovación Tecnológica, 1985), establece la necesidad de iniciar proyectos de desarrollo tecnológico en nuestro país que conduzcan a su producción en escala comercial, utilizando materias primas nacionales y cepas altamente productoras. Esto es posible llevarlo a cabo ya que se cuenta con la infraestructura física necesaria y la experiencia de los investigadores que se han dedicado al estudio del proceso fermentativo, conocimiento que ha quedado resumido en la introducción de este trabajo.

Los antecedentes expuestos hasta este momento, crearon el interés por realizar el presente proyecto como un reto por demostrar que el proceso puede ser dominado técnicamente con base en el conocimiento fundamental de cada uno de los factores involucrados en la fermentación, y que puede ser escalado del laboratorio a nivel de planta piloto.

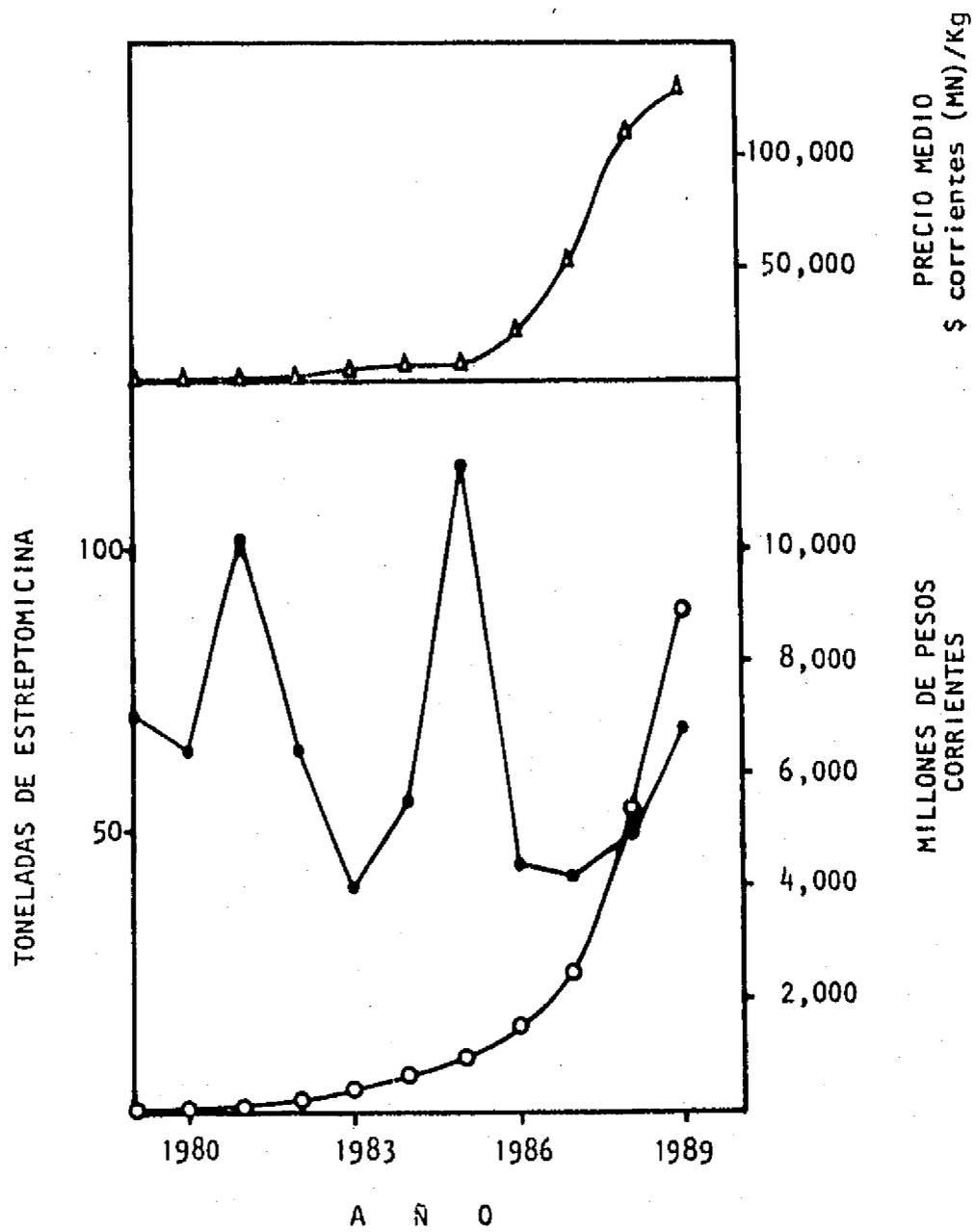


Fig. 5. Importación de estreptomicina: volumen (●), costo (○) y precio medio (Δ). (Fuente: Anuarios Estadísticos de Comercio Exterior, SPP).

TABLA 6

CIFRAS DE IMPORTACION DE SALES DE ESTREPTOMICINA EN 1989

PAIS	MONTO (MILLONES DE PESOS CORRIENTES)	VOLUMEN (kg)	PRECIO MEDIO \$ corrientes (MN) / kg
República Federal de Alemania	948.50	12,837	73,894
Japón	1,370.57	8,662	158,228
Panamá	635.75	6,856	92,729
Estados Unidos	1,627.26	6,494	250,580
Países Bajos	543.48	5,172	105,081
España	2,775.51	5,073	547,114
China	323.38	3,637	88,913
Francia	211.80	3,367	62,906
Dinamarca	224.59	2,461	91,258
Hong Kong	49.06	1,494	32,839
U.R.S.S.	99.53	1,299	76,617
Reino Unido	16.38	300	54,594
T O T A L	8,825.90	67,652	130,448

Fuente: Anuarios Estadísticos de Comercio Exterior, SPP.
 El precio medio en moneda nacional se estimó considerando
 1 US Dolar = \$2,512.00 mexicanos.

La experiencia práctica que se adquiriera podrá servir como base de un desarrollo tecnológico con intereses meramente comerciales, además de que podrán estudiarse muchos aspectos que poco se han dado a conocer de esta fermentación en particular, la cual se podría catalogar como tradicional.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar un proceso fermentativo para la producción de estreptomicina utilizando la cepa de Streptomyces griseus ATCC 12475.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar un medio de cultivo, preparado con reactivos industriales y agua de la llave, que favorezca la producción de estreptomicina.
2. Establecer las condiciones de cultivo que permitan la obtención de los más altos títulos de estreptomicina a nivel de matraces.
3. Optimizar el medio de cultivo para la máxima producción de estreptomicina utilizando el mínimo número de ingredientes.
4. Optimizar las condiciones de operación para obtener la máxima producción de estreptomicina en fermentadores de 14 litros.
5. Escalar el proceso fermentativo a planta piloto con un volumen de operación de 1000 litros.
6. Estimar el título de estreptomicina mínimo necesario para que el proceso sea comercialmente atractivo.

IV. ESTRATEGIA

Para cumplir con los objetivos planteados se estableció la estrategia que se muestra en la Figura 6 en forma de diagrama. Se eligió una cepa productora de estreptomina cuyas características permitieran llevar a buen término las corridas de fermentación.

La experimentación propiamente se inició al probar diferentes formulaciones de medio para seleccionar uno que favoreciera la producción del antibiótico. En todo momento a lo largo del estudio, se buscaron las condiciones más apropiadas para obtener los máximos títulos de estreptomina (EM).

Los criterios de evaluación que se establecieron en el estudio fueron:

- el título de estreptomina (mg EM/l),
- el rendimiento de producto en base a sustrato (mg EM/g glucosa),
- la productividad volumétrica (mg EM/l x h),
- el incremento en masa celular (g células/l),
- la producción específica (mg EM/g células), y
- la productividad específica (mg EM/g células x h)

De éstos, a nivel de matraces preferentemente se emplearon los dos primeros, mientras que a nivel de fermentadores como se tenía la facilidad de tomar muestras de mayor volumen, se utilizaron adicionalmente, los otros criterios.

En escala de laboratorio, se evaluó el efecto de los parámetros que determinan las condiciones de cultivo como son: el tipo de matraces, la fracción de llenado de los mismos y la velocidad de agitación. Una vez establecidas las condiciones óptimas, se eliminaron del medio de cultivo aquellos nutrientes que no fueron utilizados por el microorganismo y se optimizó la concentración de los nutrientes indispensables.

Posteriormente, se escaló el proceso a fermentadores de 14 litros, donde se optimizaron las condiciones de operación a través de evaluar el efecto de la velocidad de agitación, el flujo de aire y el tipo de difusor sobre la producción de estreptomina. Los resultados obtenidos a este nivel, sirvieron como base para escalar el proceso fermentativo a planta piloto con un volumen de operación de 1000 litros.

Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos en las tres escalas de operación con el fin de detectar problemas que se presentaron durante el escalamiento del proceso fermentativo.

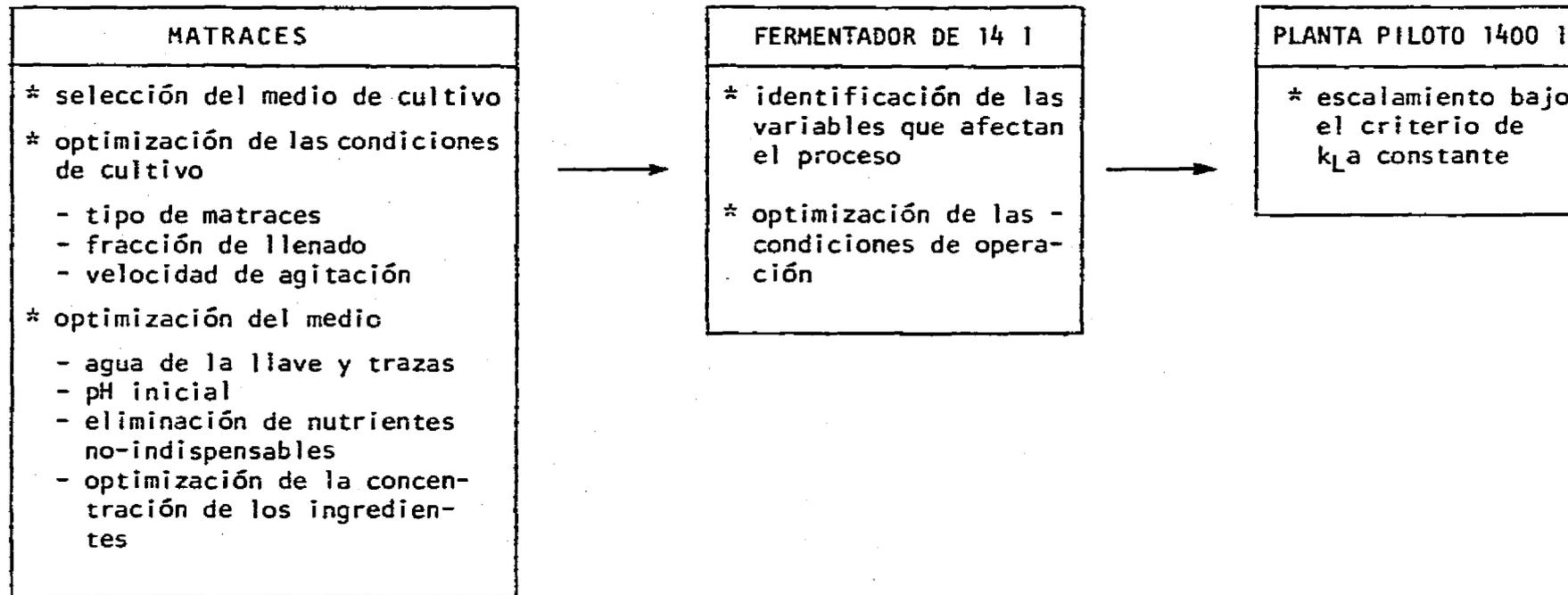


Fig. 6. Desarrollo del proceso fermentativo para la producción de estreptomicina.

V. MATERIAL Y METODOS

REACTIVOS ANALITICOS

Hidróxido de sodio, tartrato doble de sodio y potasio, fenol, metabisulfito de sodio, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, sulfito de sodio, cloruro de sodio, sulfato de amonio, glicerol y glucosa se obtuvieron de J.T. Baker de México, S.A.

Sulfato de estreptomicina de Sigma Chemical Company. Acido 3,5-dinitrosalicílico de Aldrich Chemical Company, Inc., de Estados Unidos.

Extracto de levadura, peptona, extracto de malta, extracto de carne, triptona y agar de Difco Laboratories de Estados Unidos de Norteamérica.

REACTIVOS INDUSTRIALES GRADO ALIMENTICIO

Cloruro de sodio, dextrinas, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, nitrato de sodio, fosfato dibásico de potasio y carbonato de calcio adquiridas en la Droguería Cosmopolita, S.A. de C.V.

Dextrosa monohidratada, maltodextrina (Amidex 30), extracto de levadura (Yestal 400), sólidos de cocimiento de maíz (Nutriferm) y peptona (Peptamin C), obsequiados por Arancia Comercial, S.A. de C.V.

Hidrolizado enzimático de proteína de pescado (CPSP 90 ANOREL) fabricado por la compañía Sopropêche, de Boulogne-sur-Mer, Francia.

La harina de camarón se preparó moliendo camarón seco adquirido en un mercado popular.

Harina de soya integral cruda de Industrial de Alimentos, S.A.

Levadura de cerveza autolisada desamargada en polvo de Pharm Yeast de México, S.A., con las siguientes especificaciones: proteína 45-55%, tiamina 120 ug/g, riboflavina 30 ug/g y ácido nicotínico 400 ug/g.

Residuo sólido de cervecería, obtenido después de la filtración de la cerveza, conteniendo levadura y lúpulo principalmente, obsequiado por la Cervecería Cuauhtemoc, S.A.

Muestras de levadura de panificación, marca Nevada, obsequiada por Panadis, S.A.

Antiespumantes Mazu-DF-7911 y Mazu-DF-40 obsequiados por Mazer de México, S.A.

AGUA DE LA LLAVE

De acuerdo al análisis fisicoquímico tenía un pH de 6.88 a 7.0. La dureza total y permanente, medida como CaCO_3 , fue de 130 ppm y 23 ppm, respectivamente. Las sales encontradas fueron: bicarbonatos de calcio y magnesio, sulfatos de magnesio y sodio, y cloruro de sodio.

MICROORGANISMOS

Para las fermentaciones de estreptomicina se utilizó la cepa Streptomyces griseus ATCC 12475. En la cuantificación microbiológica de estreptomicina se utilizó Bacillus subtilis ATCC 6633 como microorganismo de prueba.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio 1: de conservación de B. subtilis.

Las esporas se mantuvieron en suspensión a 4°C bajo cero, en tubos con tapón de rosca con el siguiente medio: peptona, 2.0%; extracto de levadura, 1.0% y glicerol, 40% (v/v) disueltos en agua destilada.

Medio 2: Medio de propagación de B. subtilis.

Se prepararon cajas con el siguiente medio: extracto de carne, 0.3%; peptona, 0.5% y agar, 1.5% disueltos en agua destilada.

Medio 3: Medio para la cuantificación de estreptomicina por ensayo microbiológico.

Extracto de carne, 0.15%; extracto de levadura, 0.3%; peptona, 0.6% y agar, 1.5% disueltos en solución amortiguadora de fosfatos 0.01M a pH 7.9 (Kirshbaum y Arret, 1967).

Medio 4: Medio de conservación de S. griseus.

Las esporas del microorganismo se mantuvieron en suspensión a 4°C bajo cero, en tubos con tapón de rosca con el siguiente medio: extracto de malta, 1.0%; extracto de levadura, 0.4% y glicerol, 40% (v/v) disueltos en agua destilada.

Medio 5. Medio de propagación de S. griseus

Se prepararon placas con medio que contenía: extracto de malta, 0.3%; extracto de levadura, 0.3%; glucosa, 1.0% y agar, 1.5% disueltos en agua destilada (The American Type Culture Collection, 1978).

Todos los medios de conservación y propagación se esterilizaron a 121°C durante 15 min.

Medios para la producción de estreptomicina:

Medio 6: Glucosa, 4.0%; dextrina, 1.0%; sulfato de amonio, 1.0%; nitrato de sodio, 0.2%; cloruro de sodio, 0.3%; fosfato dibásico de potasio, 0.1%; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.02%. El pH se ajustó a 7.5 y se adicionó enseguida 1.0% de carbonato de calcio (Carvajal, 1957).

Medio 7: Glucosa, 1.0%; cloruro de sodio, 1.0%; levadura de cerveza seca, 2.5%; nitrato de sodio, 0.5%; fosfato dibásico de potasio, 0.1%; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.1% (McDaniel, 1950).

Medio 8: Glucosa, 1.0%; harina de soya, 1.0%; cloruro de sodio, 0.5% (Rake y Donovan, 1946).

Medio 9: Glucosa, 2.0%; extracto de levadura, 0.2%; harina de soya, 2.0%; sólidos de cocimiento de maíz, 1.0%; fosfato de potasio, 0.17% (Miller y Walker, 1970).

Medio 10: Glucosa, 0.1%; maltodextrina, 2.4%; extracto de levadura, 0.5%; extracto de carne, 0.3%; triptona, 0.5%; carbonato de calcio, 0.4% (Rowlands, 1987).

Medio 11: Glucosa, 2.5%; harina de soya, 4.0%; cloruro de sodio, 0.25% (Dulaney, 1951).

Medio 12: Glucosa, 1.0%; extracto de levadura, 0.2%; peptona, 0.4%; extracto de carne, 0.2%; cloruro de sodio 0.5%; sulfato de magnesio, 0.025% (Hara y Beppu, 1982).

Medio 13: Glucosa, 6.0%; sólidos de cocimiento de maíz, 4.0%; harina de soya, 3.0%; sulfato de amonio, 0.9%; cloruro de sodio, 0.25%; fosfato dibásico de potasio, 0.0025%; carbonato de calcio, 0.9% (Singh y col., 1976).

Medio 14: Glucosa, 1.0%; cloruro de sodio, 1.0%; levadura de cerveza autolisada, 2.5%; fosfato dibásico de potasio, 0.1%.

Medio 15: Glucosa, 2.3%; cloruro de sodio, 0.8%; levadura de cerveza autolisada, 2.69%; fosfato dibásico de potasio, 0.1%.

Todos los medios de producción se esterilizaron a 121°C durante 20 min.

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE ESPORAS

S. griseus se propagó a 26-27°C, en cajas con medio 5 durante 4 días, o con medio 7 durante 6 días, según se indica en el texto. Después de este tiempo se preparó una suspensión de esporas en medio 4 hasta tener una densidad óptica de 15 leída a 540 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb). Para inocular se emplearon 0.2 ml de esta suspensión por cada 100 ml de medio de cultivo.

PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA EN MATRACES

Los matraces se incubaron a 28±2°C en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific, Co.). El tipo y volumen de los matraces empleados, así como la velocidad de agitación empleada se indican en el texto. Durante la fermentación se tomaron muestras en forma aséptica, de éstas se tomó una alícuota para confirmar la pureza del cultivo, sembrando en placas con medio 5 las cuales se incubaron a 28°C durante 3 días. El volumen restante de cada muestra se utilizó inmediatamente para medir la viscosidad. Una alícuota de 3 ml de cada muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min en una centrífuga clínica. En el sobrenadante se midió el pH y se determinaron el título de estreptomicina y glucosa residual. El precipitado se resuspendió en solución de cloruro de sodio para determinar el crecimiento celular.

PRODUCCION DEL INOCULO MICELIAL EN FERMENTADOR

El inóculo de los fermentadores se obtuvo a 28⁰C, en un fermentador Multigen de 2 litros (New Brunswick Scientific, Co.), equipado con 4 deflectores y 3 impulsores tipo turbina de paleta plana con diámetro (D_i) de 4.9 cm. El diámetro de la jarra (D_t) fue de 11 cm. La altura del líquido (H_L) fue de 14.5 cm, cuando el volumen de medio fue de 1.4 litros, lo que corresponde al 70% de la capacidad de la jarra. La velocidad de agitación se estableció a 625 rpm, el aire se suministró a una presión de 2 kg/cm² y un flujo de 1.4 l/min (1 vvm).

PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA EN FERMENTADORES DE 14 LITROS

Los experimentos se llevaron a cabo en un módulo Labroferm, para 3 jarras de fermentación de 14 litros (New Brunswick Scientific Co.) a una temperatura constante de 28⁰C. Las jarras con un diámetro (D_t) de 21 cm, estaban equipadas con 4 deflectores y 3 impulsores de 7.2 cm de diámetro (D_i). El tipo de difusores, la velocidad de agitación y las condiciones de suministro de aire empleados, se indican en el texto. El volumen de medio en todos los casos fue de 10 litros (70% de la capacidad), lo que dió una altura de líquido de 30 cm.

Durante las corridas de fermentación se tomaron muestras, las cuales fueron procesadas de la manera que se describió anteriormente.

DETERMINACION DE LA VISCOSIDAD RELATIVA

Los valores de viscosidad de las muestras de fermentación se determinaron en relación al agua, debido a limitaciones de equipo. El método consistió en medir el tiempo que un volumen medido de fluido tarda en cruzar dos puntos marcados en un viscosímetro de Ostwald, tipo Cannon-Fenske tamaño 300.

A muestras de fermentación recién tomadas, se les midió el tiempo de flujo en el viscosímetro sumergido en un baño a temperatura constante de 28⁰C. Se tomaron 3 lecturas por cada muestra y se calculó el promedio. Los valores obtenidos fueron referidos al tiempo de flujo del agua medido a las mismas condiciones. Los resultados de viscosidad relativa que se presentan deberán interpretarse como el número de veces que la viscosidad de cada muestra, es mayor al del agua.

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR

El precipitado obtenido después de la centrifugación de cada muestra, se resuspendió en la cantidad necesaria de una solución de cloruro de sodio al 0.85%, para llevarla a su volumen original. Se centrifugó durante 30 seg en una centrífuga clínica a 500 rpm para favorecer la precipitación de las partículas provenientes del medio de cultivo. El sobrenadante se separó y el precipitado nuevamente se resuspendió en solución salina, dicha operación se repitió hasta completar 5 veces. Los sobrenadantes se reunieron cada vez y se tomaron lecturas de densidad óptica a 540 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb). Los valores obtenidos se refirieron a una curva de calibración de densidad óptica contra peso seco micelial, la cual se muestra en la Figura 7.

DETERMINACION DE LA GLUCOSA RESIDUAL

A una alícuota de 0.5 ml de caldo libre de células se le adicionaron 1.5 ml de agua y 3.0 ml del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). De acuerdo con Miller (1959), se llevó a ebullición en baño maría durante 5 min, se dejó enfriar y se adicionaron 15 ml de agua para completar 20 ml de volumen final. Se leyó densidad óptica a 550 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb). La concentración de glucosa se calculó a partir de la curva de calibración que se presenta en la Figura 8.

El reactivo de DNS contenía: hidróxido de sodio, 1.4%; ácido 3,5-dinitrosalicílico, 0.75%; tartrato doble de sodio y potasio, 21.6%; fenol, 0.56% y metabisulfito de sodio, 0.59%. Los componentes se adicionaron en ese orden, permitiendo la disolución completa cada vez, se aforó al volumen correspondiente y se guardó en un frasco color ambar.

DETERMINACION DE ESTREPTOMICINA POR ENSAYO MICROBIOLÓGICO

Se procedió de acuerdo con Kirshbaum y Arret (1967), Simon y Ying (1970) y Difco (Manual, 1972). 1.0 ml de una suspensión de Bacillus subtilis con una densidad óptica de 0.409 medida a 580 nm, se utilizó para inocular 100 ml de medio 3. Las cajas de Petri de 10 cm x 15 mm, fueron llenadas cada una con 15 ml del medio inoculado, se dejaron solidificar y se guardaron en refrigeración mientras se prepararon los discos. En cada disco de papel filtro analítico de 1/4 pulg de diámetro (marca Schleicher & Schuell, Inc., USA), se aplicaron 20 ul de muestra o de soluciones estándar del antibiótico a diferentes concentraciones preparadas en amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 7.9. Cuando

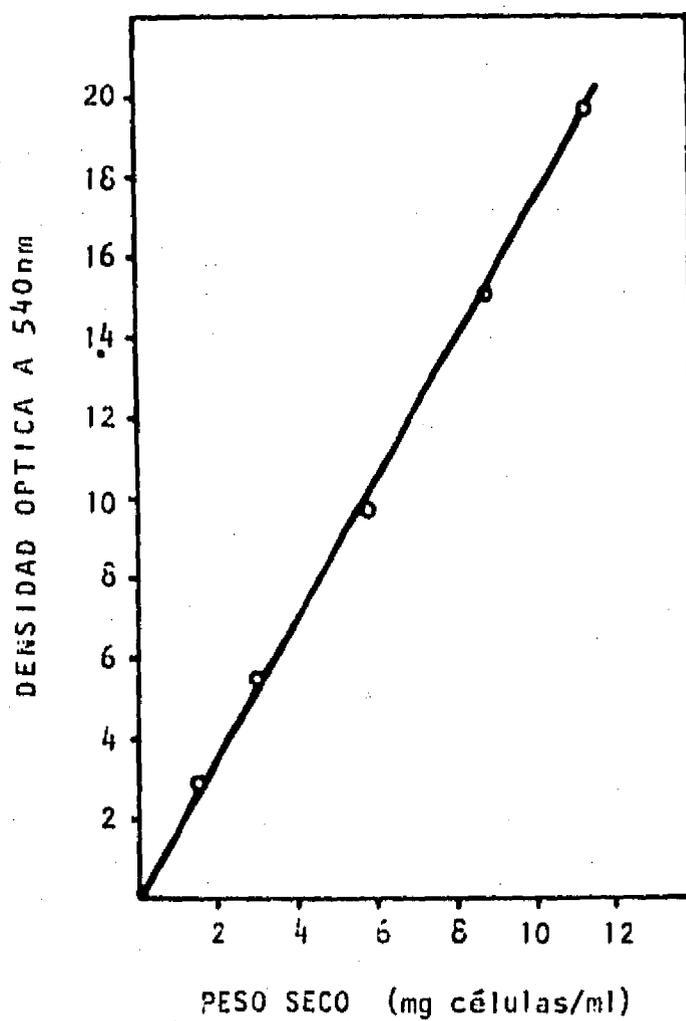


Fig. 7. Curva de calibración para la determinación del crecimiento celular por peso seco.

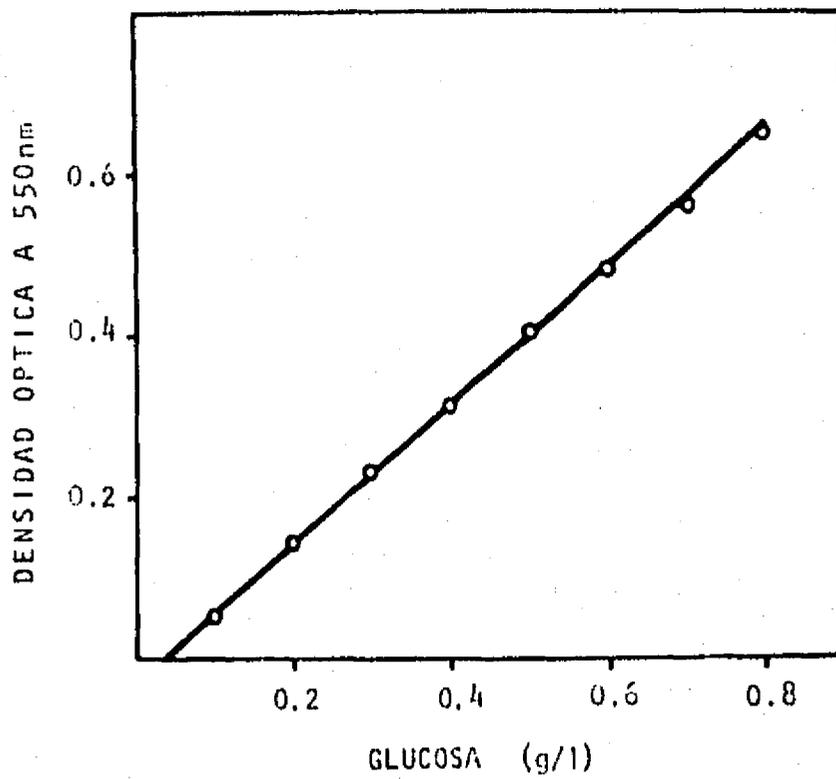


Fig. 8. Curva de calibración para la determinación de glucosa.

fue necesario diluir las muestras, se hizo con la misma solución amortiguadora. Se aplicaron los discos en las cajas y se permitió la difusión a 4°C durante 90 min, pasado este tiempo se incubaron a 37°C. Después de 24 h se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento. Con las lecturas obtenidas de los estándares se construyó la curva de calibración mostrada en la Figura 9. Los intervalos de confianza se calcularon de acuerdo con Hewitt (1977), utilizando el paquete estadístico Statgraphics (1987).

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL

De acuerdo con el método de Kjeldahl (JAOAC, 1970), muestras de los diferentes materiales complejos de 200 mg, se mezclaron con 800 mg de mezcla reactiva de selenio y 7 ml de ácido sulfúrico concentrado, se pusieron a ebullición hasta digestión completa de la materia orgánica. Se dejaron enfriar y se diluyeron con agua a un volumen de 100 ml. Se tomó una alícuota de 40 ml, se llevó el pH a un valor entre 2.5 y 3.5 con una solución de hidróxido de sodio al 40% y nuevamente se aforó a 100 ml con agua destilada. Se determinó la concentración de amonio de acuerdo a Weatherburn (1967). A cada alícuota llevada a un volumen final de 1.0 ml se le adicionaron 5.0 ml de una solución de fenol-nitroprusiato y 5.0 ml de una solución alcalina de hipoclorito, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min, para leer densidad óptica a 625 nm en un colorímetro Spectronic 20 (Baush & Lomb). La concentración de amonio se calculó a partir de la curva de calibración mostrada en la Figura 10 y se refirió al peso inicial de la muestra.

La solución de fenol-nitroprusiato se preparó disolviendo 10 g de fenol y 50 mg de nitroprusiato de sodio en agua a un volumen de 1 litro. Para preparar la solución alcalina de hipoclorito, se disolvieron 5.0 g de hidróxido de sodio y 7.4 ml de hipoclorito de sodio al 12% en agua hasta un volumen final de 1 litro.

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO ($k_L a$) EN FERMENTADORES CON AGUA

Se midió por el método de eliminación de oxígeno de acuerdo a Quintero (1983), utilizando sulfito de sodio para abatir el oxígeno presente en el agua. Las determinaciones se realizaron a 28°C, bajo diferentes condiciones de aeración y agitación como se hace referencia en el texto. El porcentaje de saturación del oxígeno disuelto se cuantificó por medio de un electrodo galvánico marca Ingold. El porcentaje de saturación fue

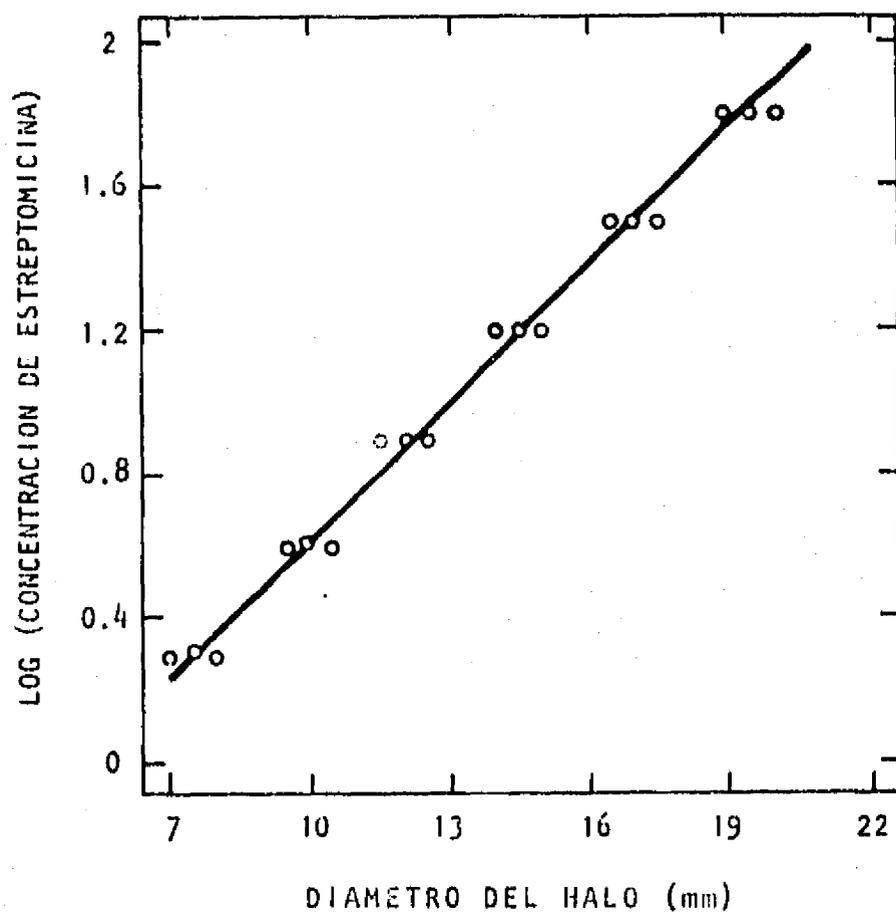


Fig. 9. Curva de calibración para la determinación de estreptomina por ensayo microbiológico.

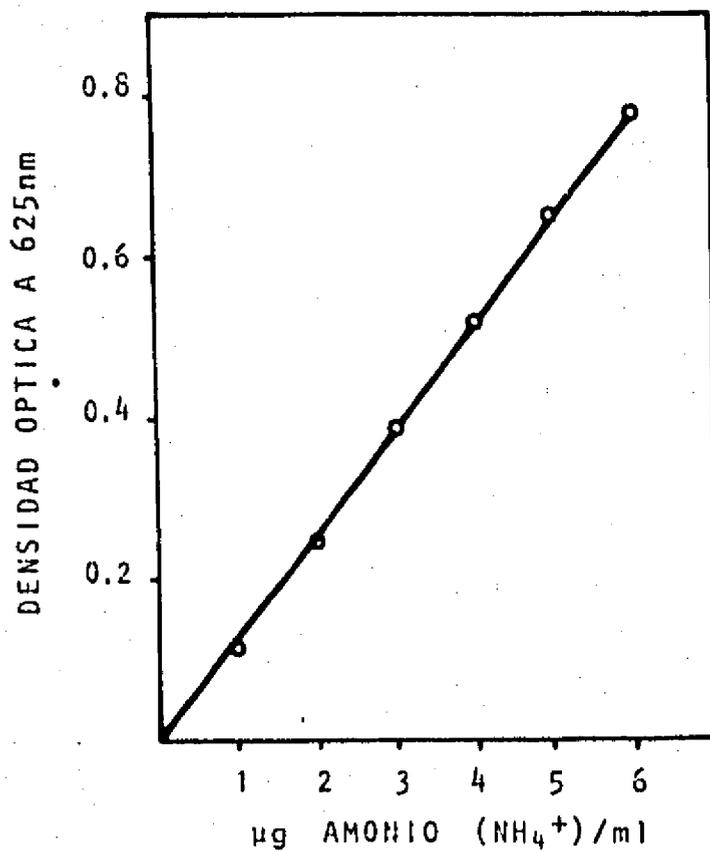


Fig. 10. Curva de calibración para la determinación de nitrógeno total.

convertido a unidades de concentración considerando que, en la Ciudad de México, la máxima saturación de oxígeno en el agua a 28°C es de 6.76 ppm (mg/l) de acuerdo a Bailey y Ollins (1977). Los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno se calcularon de manera tradicional a través de las pendientes de la gráfica C_L (ppm de O_2) contra t (tiempo). Los valores referidos en el texto deberán entenderse como $(k_{La})_{\text{agua}}$ a las condiciones de agitación y aeración indicadas.

Las velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) se calcularon a partir de los valores de k_{La} obtenidos, mediante la relación:

$$VTO = (k_{La})_{\text{agua}} (C^* - C_L)$$

asumiendo que $C_L = 0$ y que $C^* = 6.76 \text{ mg } O_2/l$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

1. ELECCION DE LA CEPA PRODUCTORA DE ESTREPTOMICINA

Para llevar a cabo el presente estudio se decidió utilizar la cepa de Streptomyces griseus ATCC 12475 (The American Type Culture Collection, 1978), que es una mutante obtenida por Carvajal (1957) después de varias exposiciones a radiaciones de luz ultravioleta. De acuerdo a Carvajal (1957), esta cepa posee las siguientes características: 1) es sobreproductora de estreptomicina, alcanza títulos promedio de 3,700 mg/l a los 5 días de incubación; 2) es insensible a la acción de fagos y 3) es capaz de crecer en presencia de estreptomicina a una concentración de 50 mg/l.

La cepa fue probada en el laboratorio con el fin de confirmar sus características y conocer su comportamiento. Cuando se cultivó en el medio 6 preparado con reactivos analíticos y agua destilada, de acuerdo a lo sugerido por Carvajal (1957), se observó un título máximo de 300 mg/l a las 72 horas de incubación (Segura, 1990). Llama la atención el hecho de que la cepa haya alcanzado títulos de producción menores a los que Carvajal (1957) estableció. Como antecedente, es conveniente citar que Miller y Walker (1970) utilizando la misma cepa cultivada en el medio 9 obtuvieron 450 mg/l a los 6 días de fermentación. Este título es del mismo orden de magnitud al obtenido por Segura (1990) en el laboratorio, y también está lejos del establecido por Carvajal (1957).

Para comprobar que el cultivo no tenía fagos, se obtuvo un cultivo micelial de 120 horas el cual fue transferido sucesivamente hasta 6 veces, manteniendo el mismo tiempo de incubación cada vez. Al finalizar cada uno de los cultivos, se tomaron muestras asépticas para sembrar en cajas con medio 5, las cuales fueron incubadas a 28°C durante 5 días para observar el crecimiento. Dada la ausencia de placas líticas en las cajas, se asumió que la cepa no contenía fagos, por lo que las fermentaciones podrían llegar a buen término.

Posteriormente se evaluó la resistencia de la cepa a su propio antibiótico. Para esto se prepararon placas con medio 5, adicionando diferentes concentraciones de estreptomicina previamente esterilizada por filtración. En cada placa se sembró 0.1 ml de una suspensión de esporas de S. griseus y se incubaron durante 4 días a 28°C. Pasado este tiempo, se contaron las colonias, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 11. Como se observa, la resistencia a estreptomicina

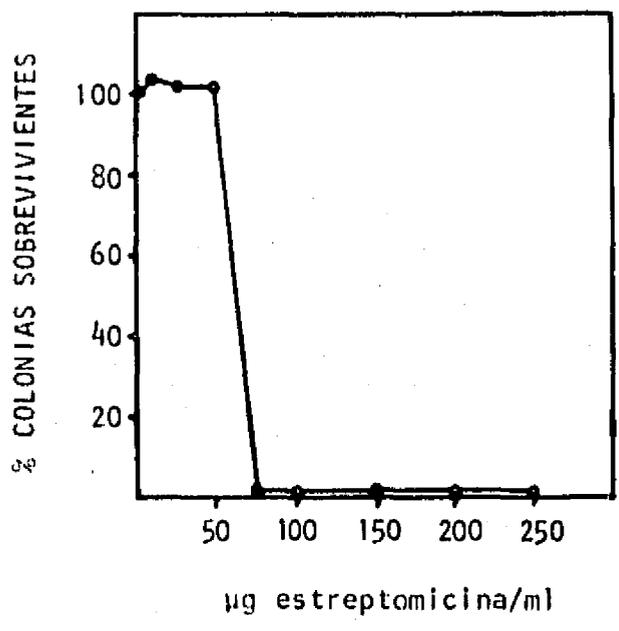


Fig. 11. Resistencia de S. griseus ATCC 12475 a estreptomicina.

obtenida es de 50 mg/l. Aunque no se probaron concentraciones intermedias entre 50 y 75 mg/l, este resultado coincide con la concentración a la que Carvajal (1957) aisló esta mutante de S. griseus, lo que confirma la resistencia a su propio antibiótico.

De acuerdo a estos resultados, la ausencia de fagos en el cultivo y la resistencia al propio antibiótico fueron comprobadas satisfactoriamente. El título de producción está muy abajo del esperado, tal vez la cepa perdió o no expresó la característica de hiperproducción. Al respecto, es común que cualquier cepa presente un comportamiento diferente al reportado por un autor, cuando es cultivada en otra localidad. Esto puede deberse a varios factores, por ejemplo el cambio en las condiciones ambientales como la humedad relativa y la presión atmosférica, incluso el origen de los reactivos empleados en la preparación del medio o la ausencia de compuestos que protegen las características de cepas modificadas genéticamente, los cuales no siempre se reportan. No obstante, es claro que una cepa industrial altamente productora difícilmente se puede adquirir para llevar a cabo una investigación como ésta, ese tipo de cepas están accesibles sólo cuando se compran paquetes tecnológicos. Por eso la alternativa más viable para llevar a cabo un estudio, es adquirir cepas en las colecciones microbianas, identificar las variables que afectan su comportamiento para poder controlarlas y someterlas a intensos programas de mejoramiento genético, de la misma manera que esta situación se ha dado en el terreno industrial.

2. SELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO

Para tener el medio industrial de fermentación, se eligieron diferentes formulaciones reportadas por otros autores para la producción de estreptomycin, cuyos ingredientes pudieran sustituirse por reactivos industriales de fabricación nacional. De estos medios, se seleccionó aquél que permitió el mayor título de producción en el menor tiempo posible.

Los medios de cultivo utilizados, del 6 al 13, se presentan en forma comparativa en la Tabla 7. El número asignado a cada uno es el mismo que se indica en el capítulo "Material y Métodos".

El medio 6 (Carvajal, 1957) contenía una mezcla de sulfato de amonio y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. En los medios 7 a 12 resalta la presencia de por lo menos una fuente

TABLA 7

COMPOSICION DE LOS MEDIOS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

INGREDIENTE (%)	M E D I O								
	6	7	8	9	10	11	12	13	
glucosa	4.0	1.0	1.0	2.0	0.1	1.0	1.0	6.0	
dextrina	1.0	-	-	-	-	-	-	-	
malto dextrina ¹	-	-	-	-	2.4	-	-	-	
levadura de cerveza autolisada ²	-	2.5	-	-	-	-	-	-	
sólidos de cocimiento de maíz ³	-	-	-	1.0	-	-	-	4.0	
extracto de levadura ⁴	-	-	-	0.2	0.5	-	0.2	-	
peptona ⁵	-	-	-	-	-	-	0.4	-	
harina de soya ⁶	-	-	1.0	2.0	-	2.0	-	3.0	
extracto de carne	-	-	-	-	0.3	-	0.2	-	
triptona	-	-	-	-	0.5	-	-	-	
sulfato de amonio	1.0	-	-	-	-	-	-	0.9	
nitrato de sodio	0.2	0.5	-	-	-	-	-	-	
cloruro de sodio	0.3	1.0	0.5	-	-	1.0	0.5	0.25	
fosfato dipotásico	0.1	0.1	-	0.17	-	-	-	0.002	
sulfato de magnesio	0.02	0.1	-	-	-	-	0.025	-	
carbonato de calcio	1.0	-	-	-	0.4	-	-	0.9	

¹Amidex 30; ³Nutriferin; ⁴Yestal 400; ⁵Peptamín C; Arancia Comercial, S.A. de C.V., México, D.F.
⁶Industrial de Alimentos, S.A., México, D.F.; ²Pharm Yeast de México, S.A.

orgánica de nitrógeno. El medio 7 (McDaniel, 1950) contenía una mezcla de levadura de cerveza autolisada y nitrato de sodio, y el 13 (Singh y col., 1976) una mezcla de harina de soya y sulfato de amonio. Los medios 8 (Rake y Donovick, 1946) y 11 (Dulaney, 1948a) contenían harina de soya y los restantes, 9 (Miller y Walker, 1971), 10 (Rowlands, 1987) y 12 (Hara y Beppu, 1982), mezclas de tres diferentes materiales. Entre los materiales orgánicos empleados destacan, los sólidos de cocimiento de maíz, extracto de levadura, peptona, extracto de carne y triptona.

La fuente de carbono en todos los medios fue glucosa, a excepción de los medios 6 y 10 en los que se adicionó dextrina y maltodextrina, respectivamente.

Para la preparación de los diferentes medios se emplearon reactivos industriales grado alimenticio y agua de la llave. Dichos reactivos fueron adquiridos en casas comerciales que distribuyen materias primas a la industria fermentativa y alimentaria, según se indicó en el capítulo de "Material y Métodos". El experimento se corrió por triplicado en matraces de 250 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio. Los matraces se inocularon con una suspensión de esporas y se incubaron a 200 rpm, durante 6 días. Se tomaron muestras cada 24 horas para evaluar la cantidad de estreptomocina producida, el consumo de glucosa como un indicativo de la actividad microbiana y el incremento de la viscosidad relativa.

Con base en la experiencia de diversos autores, quienes han encontrado que para favorecer la producción de estreptomocina se requieren altos niveles de transferencia de oxígeno (Hockenhull y col, 1954, Hockenhull, 1960; Demain e Inamine, 1970 y Scriban, 1985), se decidió utilizar matraces con deflectores ya que de acuerdo a Freedman (1969) y a Van Suijdam y col. (1978), con éstos se alcanzan niveles de transferencia de oxígeno mayores a los que se logran en matraces erlenmeyer lisos.

Como se observa en la Figura 12A, con el medio 7 se alcanzó el más alto título de estreptomocina que fue de 240 mg/l a los 3 días. Con el medio 13 se alcanzaron 120 mg/l a los 6 días de incubación. Al utilizar el medio 6 el título alcanzado fue de 16 mg/l a los 4 días y con los medios 9 y 12 solamente 5 mg/l. En los medios 8, 10 y 11 no se observó producción del antibiótico.

Es importante resaltar que el mayor título de estreptomocina, 240 mg/l, se obtuvo a los 3 días con el medio 7 que fue el único que contenía levadura como fuente orgánica de nitrógeno. El rendimiento obtenido con este medio fue de 24 mg/g glucosa y la productividad de 3.33 mg/l x h. Otro aspecto interesante, es el haber alcanzado en menor tiempo y utilizando reactivos industriales y agua de la llave, un título cercano al reportado por Segura (1990), quien obtuvo 300 mg/l a los 5 días de fermentación en el medio 6, preparado con reactivos analíticos y agua destilada.

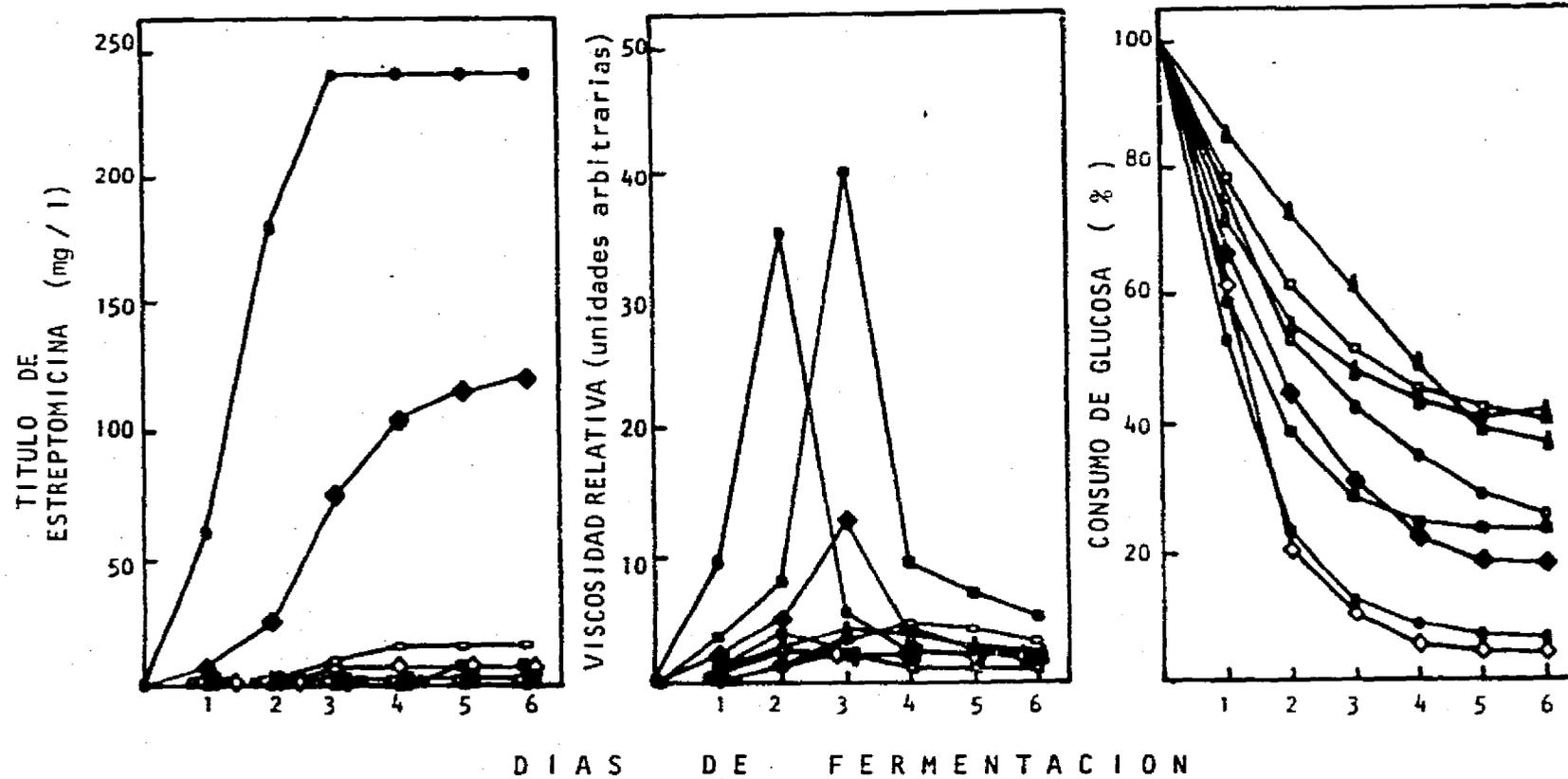


Fig. 12. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en diferentes medios preparados con reactivos industriales grado alimenticio y agua de la llave: 6(o); 7(●); 8(□); 9(■); 10 (Δ); 11(▲); 12(◇); 13(♠).

En las fermentaciones para la obtención de estreptomicina, generalmente se observa que la producción se inicia dentro de los primeros dos días y el título máximo se alcanza cuando más a los seis días. Bartholomew y col. (1950c), detectaron estreptomicina desde el primer día de fermentación y el máximo título se alcanzó a los tres días. Garner y col., (1953), Hockenhull (1960) y Singh y col. (1976) detectaron estreptomicina en el medio a los dos días de fermentación, alcanzando el máximo título de producción entre los cuatro y seis días. En el presente estudio, utilizando el medio 7, la producción se inició desde el primer día y el máximo título se obtuvo a los tres días de fermentación.

El crecimiento celular no pudo ser evaluado a través de mediciones de densidad óptica ya que algunos medios presentaron turbiedad, principalmente aquellos que contenían harina de soya, sólidos de cocimiento de maíz o carbonato de calcio. Por esta razón se decidió medir la viscosidad relativa como un indicativo del incremento en masa celular. En la Figura 12B, se observa un aumento considerable de la viscosidad solamente con los medios 7, 9 y 13, que fue de 35, 40 y 12.5 veces en relación al agua, respectivamente. Aparentemente, el crecimiento fue más rápido en el medio 7, ya que a los 2 días alcanzó el máximo valor de viscosidad relativa, mientras que en los medios 9 y 13, lo alcanzó hasta los 3 días. Se puede apreciar, en todos los casos, la brusca caída en la viscosidad relativa después de alcanzar su máximo valor, debido a la lisis celular que ocurre en todos los cultivos de Streptomyces. En la misma Figura 12B se observa que en los medios 6, 8, 10, 11 y 12 el incremento en la viscosidad relativa fue muy ligero, por abajo de 5.

Con respecto al consumo de glucosa, como se observa en la Figura 12C, en los medios 7 y 12 se detectó el máximo consumo, alrededor del 95%. En el medio 13 se consumió el 81% de la glucosa inicial y en los medios 6 y 9 alrededor del 75%, siendo mayor la velocidad de utilización de glucosa con el medio 9 que con el 6. Al utilizar los medios 8, 10 y 11 se consumió solo el 60% de la glucosa inicial. Con el medio 11 se observó la más lenta utilización del carbohidrato.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó el medio 7, ya que con éste se alcanzó el máximo título de estreptomicina y los más altos valores de rendimiento y productividad. Como se indicó anteriormente este medio fue preparado con reactivos industriales de fabricación nacional y agua de la llave, aspecto que hace interesante considerarlo como un buen punto de partida para su optimización y utilización durante el estudio del proceso en fermentadores de 14 litros.

3. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES A NIVEL DE MATRACES

3.1 Propagación de las esporas de S. griseus ATCC 12475

Antes de evaluar el efecto de diversos factores sobre la producción de estreptomycin, se consideró conveniente definir el medio para la propagación de esporas de la cepa de S. griseus.

Se probaron dos medios con agar en cajas de Petri. Uno de ellos fue el medio 5 recomendado por la colección microbiana a que pertenece la cepa (The American Type Culture Collection, 1978) que contiene extracto de malta, extracto de levadura y glucosa disueltos en agua destilada. El otro fue el medio 7, seleccionado anteriormente para la producción del antibiótico. Este último tendría 2 ventajas: 1) ser más económico que el primero ya que está preparado con reactivos industriales y agua de la llave, y 2) al tener la misma formulación que el medio de producción, se podría reducir la fase de adaptación del microorganismo.

Las cajas conteniendo los dos medios fueron inoculadas distribuyendo con una asa de vidrio, 0.1 ml de una suspensión de esporas, e incubadas a 28°C al mismo tiempo. Con el medio 7 se observó un crecimiento y formación de esporas más abundante que con el medio 5. Por apreciaciones visuales, se encontró que después de 4 días ya no hay más esporulación en las cajas conteniendo medio 5, mientras que para el medio 7 se necesitaron 6 días. Al finalizar el tiempo de incubación, se prepararon por separado las dos suspensiones de esporas ajustando a 15 la densidad óptica leída a 540 nm. Al preparar las suspensiones se confirmó que con el medio 7 se alcanzó la densidad óptica deseada con las esporas provenientes de una sola caja, mientras que fueron necesarias más de 4 cajas del medio 5, para ajustar la suspensión a la misma densidad óptica. En ambos casos se utilizó el mismo volumen del medio para la resuspensión de esporas. Asimismo, se observó que las esporas obtenidas con el medio 7 tenían la característica de desprenderse muy fácilmente con el asa lo cual favoreció su recolección, en cambio las esporas obtenidas en el medio 5, se desprendieron con dificultad.

Posteriormente, con las dos suspensiones de esporas se inocularon por triplicado, matraces de 250 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio 7. Los matraces se incubaron durante 5 días a 200 rpm, se tomaron muestras cada 24 h para evaluar la producción del antibiótico y el crecimiento. Los resultados que se muestran en la Figura 13A, indican que no hay diferencia significativa en la producción de estreptomycin al utilizar esporas propagadas en los dos medios, ya que los títulos

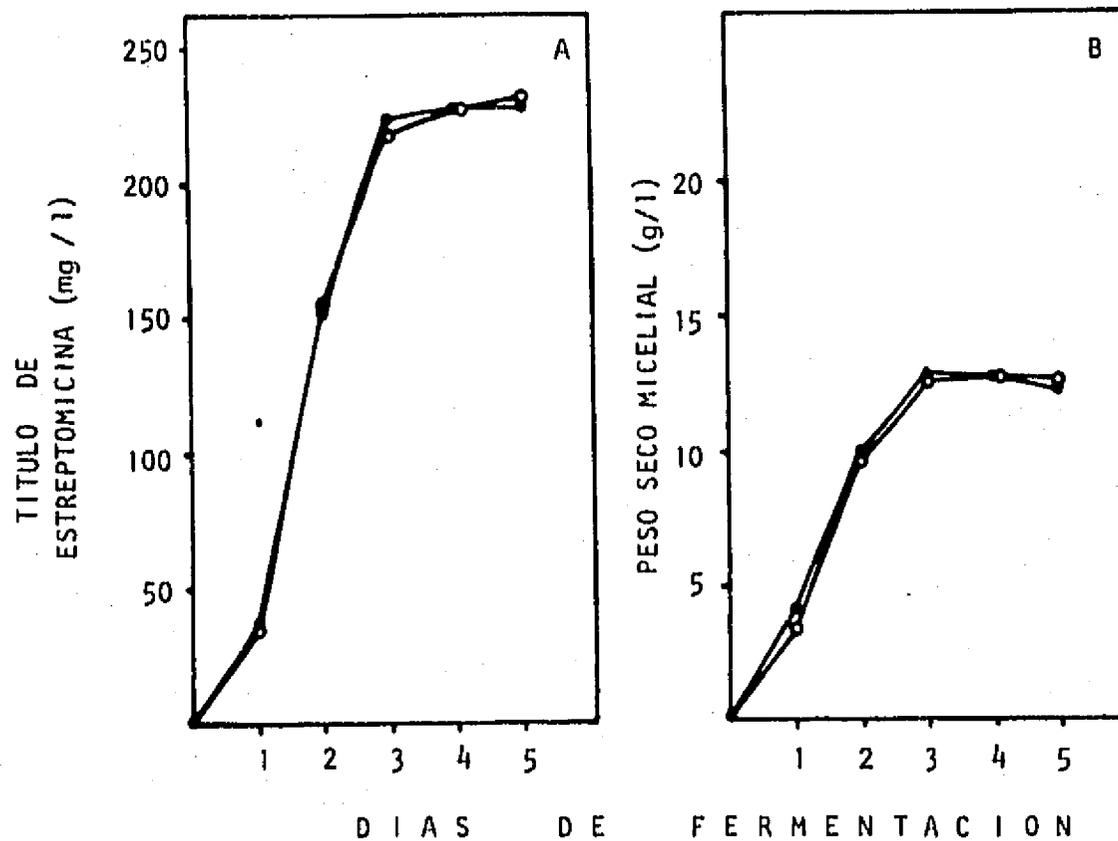


Fig. 13. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en matraces inoculados con esporas obtenidas de medio 5 (o) y de medio 7 (●).

alcanzados a los 5 días fueron de 228 ± 10.4 y de 235 ± 9.05 mg/l para los medios 5 y 7, respectivamente. El crecimiento también fue similar en los dos casos, sin presentarse fase de adaptación como se muestra en la Figura 13B, se alcanzó una concentración celular de 12.4 g/l a los 3 días.

Con base en las observaciones realizadas durante la incubación de las cajas con medio sólido, la recolección de esporas y los resultados obtenidos, se decidió utilizar el medio 7 para la propagación de esporas de S. griseus ATCC 12475, preparado con reactivos industriales y agua de la llave.

3.2 Variabilidad en la producción de estreptomina

En la práctica se sabe que en la producción de antibióticos los títulos obtenidos varían de una fermentación a otra. Schultz y col. (1960), advirtieron que las fermentaciones para la producción de estreptomina no son una excepción y sugirieron la necesidad de conocer la magnitud de tal variación a escala industrial, ya que un cambio en el título de producción se refleja directamente en la economía del proceso.

A pesar de que el presente trabajo no se está realizando a escala industrial, este antecedente debe tomarse en consideración ya que se busca optimizar la producción de estreptomina a través de la modificación de diversos parámetros de la fermentación. Por tanto, es necesario saber si las diferencias en los títulos de producción se deben al efecto de dichos parámetros sobre el proceso, o si se deben al error experimental asociado de manera natural al propio experimento.

Con el fin de conocer la magnitud de la variabilidad en el título de producción con la cepa empleada y bajo las condiciones experimentales establecidas hasta ahora, se revisaron dos aspectos. Primero la variabilidad en un mismo experimento que dará la magnitud del error experimental y el segundo la variabilidad en diferentes experimentos, que permitirá conocer el intervalo dentro del cual varía la producción en fermentaciones realizadas en diferentes fechas.

Para evaluar la variabilidad en un mismo experimento, se utilizaron 10 matraces de 250 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio 7 preparado en un solo lote. A todos los matraces se les dió el mismo tratamiento y fueron inoculados e incubados a las mismas condiciones, con el fin de eliminar la influencia de factores ambientales o de manipulación que pudieran afectar el comportamiento de la cepa. Incluso la determinación de la estreptomina que, de acuerdo con Garner y col. (1953) tiene

su propia variación, fue realizada al mismo tiempo para evaluar exclusivamente la magnitud del error experimental.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 8 muestran la variabilidad en la producción de estreptomycin en un mismo experimento. La diferencia entre el valor más bajo y el más alto fue de 31 mg/l, esta variación estadísticamente representa el 4.28% del promedio y corresponde a la variación natural de este proceso biológico. Este resultado refleja la necesidad de realizar repeticiones de cada condición a estudiar, para incluir la variación natural propia.

Para analizar la variabilidad de un experimento a otro se llevaron a cabo 10 corridas por triplicado en fechas diferentes, preparando el medio de cultivo cada vez. El lote de reactivos, los tratamientos y las condiciones utilizadas para cada corrida, fueron los mismos. Los 30 títulos de producción obtenidos en los 10 experimentos se presentan en la Tabla 9. Con estos resultados se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%. Los resultados, mostrados en la Tabla 10 indican que la variabilidad en la producción en diferentes experimentos es mayor que la que se tiene en un mismo experimento y es altamente significativa (indicado por **). Esto significa que cuando se está evaluando el efecto de diversas variables no se deben comparar los títulos de producción obtenidos en diferentes experimentos, sino que será necesario incluirlas en un mismo experimento, con el fin de hacer un análisis más objetivo de los resultados.

En la Figura 14 se presenta la comparación múltiple de medias utilizando los títulos de producción obtenidos en diferentes experimentos. La línea punteada corresponde al promedio de los 30 títulos de producción. Al comparar éste con los promedios de cada uno de los experimentos se puede apreciar que 4 de los experimentos muestran una variación extrema. Los experimentos 1, 4 y 8 están por abajo del promedio, mientras que el experimento 2 está por arriba. Esta comparación viene a reforzar la inconveniencia de comparar los títulos de producción provenientes de diferentes experimentos, como se estableció anteriormente.

En el caso específico de este trabajo el número de repeticiones se definió en función de la disponibilidad del equipo. Dado que el coeficiente de variabilidad obtenido con 3 repeticiones (Tabla 9) fue del mismo orden de magnitud que el obtenido con 10 repeticiones (Tabla 8), se decidió trabajar triplicados de cada condición a evaluar, para así incluir en un mismo experimento el efecto de hasta 10 condiciones diferentes cada vez.

En la Tabla 11 se presentan en forma comparativa los títulos de producción obtenidos en los 10 diferentes experimentos con resultados obtenidos por otros autores.

TABLA 8

VARIABILIDAD DE LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA
EN UN MISMO EXPERIMENTO

Matraz No.	Título de Estreptomicina mg / l
1	260
2	242
3	265
4	268
5	273
6	255
7	271
8	248
9	245
10	254
Promedio	258
Desviación estándar	±11.04
Coefficiente de variabilidad	4.28%

TABLA 9

VARIABILIDAD DE LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA
EN DIFERENTES EXPERIMENTOS

Experimento No.	Título de Estreptomicina mg / l			TITULO PROMEDIO (mg / l)	COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (%)
1	231	225	246	234 ± 10.82	4.62
2	328	333	315	325 ± 9.89	2.86
3	275	263	298	279 ± 17.78	6.37
4	240	227	252	240 ± 12.50	5.21
5	285	295	315	298 ± 15.28	5.13
6	296	318	322	312 ± 14.0	4.49
7	271	298	280	283 ± 13.74	4.86
8	250	245	272	256 ± 14.36	5.61
9	258	275	272	268 ± 9.07	3.38
10	316	304	295	305 ± 10.54	3.46

TABLA 10

ANALISIS DE VARIANZA DE LA VARIABILIDAD EN LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significancia (P<0.05)
Diferentes experimentos	(10-1) 9	25566	2840.7	16.77	**
En un mismo experimento	(10x3)-9-1 20	3388	169.4		

El análisis se hizo utilizando la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

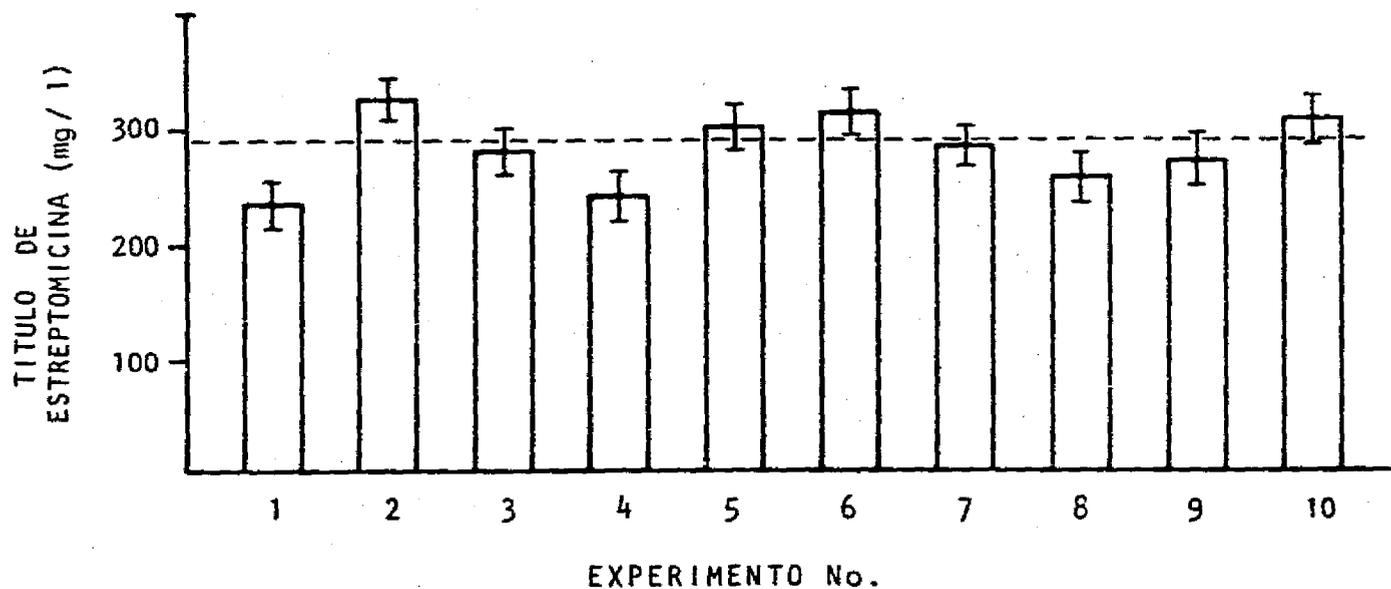


Fig. 14. Comparación múltiple de medias y error estándar de la producción de estreptomina en diferentes experimentos realizados a nivel de matraz. La línea punteada permite detectar los valores promedio que muestran una variación extrema en relación a los restantes.

TABLA 11

VARIABILIDAD EN LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA CON DIFERENTES
CEPAS DE S. griseus

EXPERIMENTO No.	McDaniel, 1950 ($\mu\text{g/ml}$) ¹	Bartholomew y col., 1950c (actividad relativa) ²	Este estudio (mg / l) ³
1	168	1.07	234
2	240	1.12	325
3	223	1.05	279
4	268	0.82	240
5	220	0.90	298
6	246	1.04	312
7			283
8			256
9			268
10			305
promedio	227.5	1.0	280
desviación estándar	± 33.93	± 0.115	± 30.63
coeficiente de variabilidad (%)	14.88	11.5	10.94

¹ Los datos provienen de corridas diferentes.

² Cada dato es promedio de 2 ó 3 fermentaciones por semana.

³ Cada dato es promedio de 3 fermentaciones de fechas diferentes.

El coeficiente de variabilidad obtenido con los datos de Bartholomew y col. (1950c), de 6 corridas en fermentador utilizando un medio con harina de soya, fue de 11.5%. Los autores consideran tener una buena reproducibilidad debida al rígido control de diversas variables durante el proceso, particularmente edad del inóculo, composición del medio y su esterilización, temperatura de incubación y oxigenación.

McDaniel (1950), utilizando un medio con levadura de cerveza seca, llevó a cabo 6 experimentos manteniendo constantes todas las condiciones de cultivo. El coeficiente de variabilidad que obtuvo fue 14.88% y aunque no lo discute, parece considerarlo como un valor razonable.

Carvajal (1957) menciona que en varios experimentos realizados con S. griseus ATCC 12475 en un medio con dextrinas y sulfato de amonio, un total de 16 matraces dieron títulos de estreptomycin entre 3000 y 4300 mg/l. El promedio fue de 3700 mg/l y aunque el autor no da el valor de la desviación estándar que obtuvo, se podría estimar que el coeficiente de variabilidad es del mismo orden de magnitud que los reportados por McDaniel (1950) y Bartholomew y col. (1950c)

La variabilidad obtenida en los 10 diferentes experimentos del presente trabajo fue de 10.94%. Este valor es comparable a los obtenidos por McDaniel (1950) y Bartholomew y col. (1950c).

Las razones por las que varían los títulos de producción en un proceso fermentativo es un aspecto sobre el cual fácilmente se puede especular. En este trabajo posiblemente la temperatura de incubación jugó un papel importante pues, como se indicó en el capítulo de "Material y Métodos", varió de 26 a 30°C ya que la temperatura del cuarto de incubación se ve seriamente afectada por la temperatura ambiente. Esta posibilidad se plantea con base en estudios realizados por otros autores como Bartholomew y col. (1950), quienes encontraron que la producción del antibiótico alcanzó el título más alto entre 25 y 27°C, pero disminuyó en un 18% a 29°C y en 40% a 31°C. Asimismo, Dulaney (1951) obtuvo el máximo título de producción a 28.5°C con la cepa S. griseus Z-38, por arriba de esta temperatura, la producción cayó bruscamente.

3.3 Efecto del tipo de matraces y la fracción de llenado

Existe una amplia variedad de las condiciones de cultivo que han utilizado otros autores para evaluar la producción de estreptomycin o sus derivados en matraces agitados. Entre estas condiciones resaltan el volumen de los matraces, el volumen del medio y la velocidad de agitación.

Como se observa en la Tabla 12, la variedad más marcada se presenta en la combinación del volumen del medio y el volumen del matraz empleados, cuya relación da un valor que se conoce como fracción de llenado. Este aspecto que pareciera ser poco importante debe ser considerado, ya que de acuerdo a Freedman (1969), la fracción de llenado determina la capacidad de transferencia de oxígeno en matraces agitados.

Entre los pocos autores que han considerado este parámetro como una variable en un proceso fermentativo están Remmers y Dunn (1961), quienes maximizaron el crecimiento de Aspergillus niger y Moresi y col. (1979), que optimizaron el crecimiento de Kluyveromyces fragilis en un medio con suero de leche.

De acuerdo a la Tabla 12, la fracción de llenado encontrada con mayor frecuencia para la producción de estreptomicina ha sido 0.2, utilizando matraces de 500 ml con 100 ml de medio. Otros autores han empleado matraces de menor capacidad, 125, 250 y 300 ml, con diferentes volúmenes de medio, lo que da una diversidad de valores de la fracción de llenado que va de 0.10 a 0.32. Se presenta también el caso en que Shirato y col. (1966), utilizaron frascos de boca ancha de 500 ml como recipientes de fermentación con solo 25 ml de medio, lo que corresponde a una fracción de llenado de 0.05.

Rake y Donovick (1946) al cultivar una cepa de S. griseus en un medio con glucosa, harina de soya extracto de carne y cloruro de sodio, observaron que el volumen de medio en el matraz fue sumamente importante para la producción de estreptomicina. Estos autores al emplear 200 ml de medio en un matraz de 500 ml, obtuvieron 73.2 mg/l. Cuando disminuyeron el volumen de medio a 100 ml, el título alcanzado fue de 181 mg/l. Esto significa que al disminuir la fracción de llenado de 0.4 a 0.2, el título del antibiótico mejoró en 1.5 veces más. Este aspecto, indica la importancia de la oxigenación durante la fermentación de estreptomicina

Con base en estos antecedentes, se consideró conveniente definir el tipo de matraces a utilizar y la fracción de llenado adecuados para lograr la máxima producción de estreptomicina. Para esto se llevó a cabo un experimento con diferentes tipos de matraces conteniendo diferentes volúmenes de medio. Se eligieron matraces Erlenmeyer lisos de 250 y de 500 ml, matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml con deflectores y matraces Fernbach de 2.8 litros. Para definir la más baja fracción de llenado se tomó en cuenta que el volumen de medio se reduciría al tomar muestras cada día y se debía tomar el mínimo volumen para no alterar sustancialmente el valor de la fracción de llenado. El valor más alto se eligió después de confirmar que no se mojaran los tapones de algodón durante la agitación. Al revisar este aspecto en los matraces de 500 ml con deflectores se observó que aún con la más baja fracción de llenado (0.1), se mojaron los tapones de algodón por lo que se eliminaron del experimento. En la Tabla 13

TABLA 12

CONDICIONES REPORTADAS EN LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA Y SUS DERIVADOS A NIVEL DE MATRACES

ANTIBIOTICO	VOLUMEN DE MATRAZ (ml)	VOLUMEN DE MEDIO (ml)	FRACCION DE LLENADO	VELOCIDAD DE AGITACION ¹	REFERENCIA
Estreptomicina	500	100	0.20	100 opm	Rake y Donovick, 1946.
	500	100	0.20	90 opm	Garner y col., 1953.
	500	100	0.20	120 opm	Periman y col., 1954.
	500 ²	25	0.05		Shirato y Motoyama, 1966.
	300	30	0.10		Ferguson y col., 1957.
	250	25	0.10	220 rpm	Woodroff y Ruger, 1948.
	250	40	0.16	220 rpm	Dulaney, 1951.
	125	40	0.32	220 rpm	Dulaney, 1948b, 1949.
	125	30	0.24	240 rpm	Miller y Walker, 1970.
	125	25	0.20		Cella y Vining, 1975.
Hidroxiestreptomicina	500	100	0.20	200 rpm	Benedict y col., 1951.
Dihidroestreptomicina	500	100	0.20	245 rpm	Kavanagh y col., 1960.

¹ Oscilatoria: opm, oscilaciones por minuto. Rotatoria: rpm, revoluciones por minuto.

² Matrices tipo frasco de boca ancha.

TABLA 13

TIPO DE MATRACES Y FRACCIÓN DE LLENADO UTILIZADAS PARA
EVALUAR LA PRODUCCIÓN DE ESTREPTOMICINA

Tipo de Matraz	Volumen de Matraz (ml)	Volumen de Medio (ml)	Fracción de llenado
Erlenmeyer liso	250	50	0.2
		100	0.4
		150	0.6
Erlenmeyer con deflectores	250	25	0.1
		50	0.2
		100	0.4
		150	0.6
Erlenmeyer liso	500	50	0.1
		100	0.2
		200	0.4
Fernbach	2800	300	0.11
		600	0.21
		900	0.32

se indican las condiciones que se utilizaron para realizar el experimento.

Los matraces se inocularon y se incubaron simultáneamente a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 160 rpm. Se tomaron muestras cada día para evaluar el título de estreptomina, el consumo de glucosa y la evolución de la viscosidad. Los resultados obtenidos a lo largo de la fermentación, se presentan en las Figuras 15, 16, 17 y 18.

Con una fracción de llenado de 0.4 en los matraces de 500 ml, se obtuvo un título de estreptomina de 12 mg/l (Fig. 17A), mientras que en los lisos de 250 ml no se observó producción (Fig. 15A). Al disminuir la fracción de llenado de 0.4 a 0.2, en los matraces de 500 ml el título fue de 55 mg/l (Fig. 17A) y 58 mg/l en los de 250 ml (Fig. 15A) a pesar de que en ambos la producción se inició a los 3 días. En todos los casos el título de producción y el rendimiento alcanzado en los matraces de 500 ml fue mayor al observado en los lisos de 250 ml. En los matraces Fernbach, a una fracción de llenado de 0.11 (Fig. 18A) el título de estreptomina alcanzada fue 1.5 veces mayor que el obtenido con los matraces Erlenmeyer de 500 ml (Fig. 17A). Freedman (1969) encontró que la capacidad de transferencia de oxígeno detectada en los matraces Fernbach con una fracción de llenado de 0.1, fue 1.6 veces mayor a la observada con los de 500 ml.

El título de estreptomina obtenido en los matraces de 250 ml con deflectores a una fracción de llenado de 0.2, fue significativamente mayor al obtenido con el resto de las condiciones probadas. La producción se observó desde el primer día, alcanzando el título máximo, de 225 mg/l, entre los 3 y 4 días de incubación, lo que dió los más altos valores de rendimiento y productividad. En los matraces con deflectores, al igual que en los otros casos, fue notoria la disminución del título del antibiótico al aumentar la fracción de llenado. En el experimento se incluyeron matraces con deflectores de 250 ml con una fracción de llenado de 0.1, pero sin tomar muestras cada día, para no alterar el volumen del cultivo. Solamente se tomó una muestra al final de los 6 días de incubación y se determinó la cantidad de estreptomina producida. El título promedio obtenido, de 243 ± 12.22 mg/l, aunque fue ligeramente mayor que el alcanzado al utilizar una fracción de 0.2, no presentó diferencias significativas al ser comparado con esta última condición, como se observa en la Figura 19.

De todos los casos analizados los más altos niveles de viscosidad relativa, que son indicativos del crecimiento celular, se observaron en la más baja fracción de llenado, la cual corresponde a la más alta capacidad de transferencia de oxígeno (Figs. 15B, 16B, 17B y 18B). Asimismo, el consumo de glucosa fue más rápido en la menor fracción de llenado, observándose el máximo consumo a los 4 días de fermentación (Figs. 15D, 16D, 17D y 18D). Los perfiles de consumo de glucosa obtenidos en los

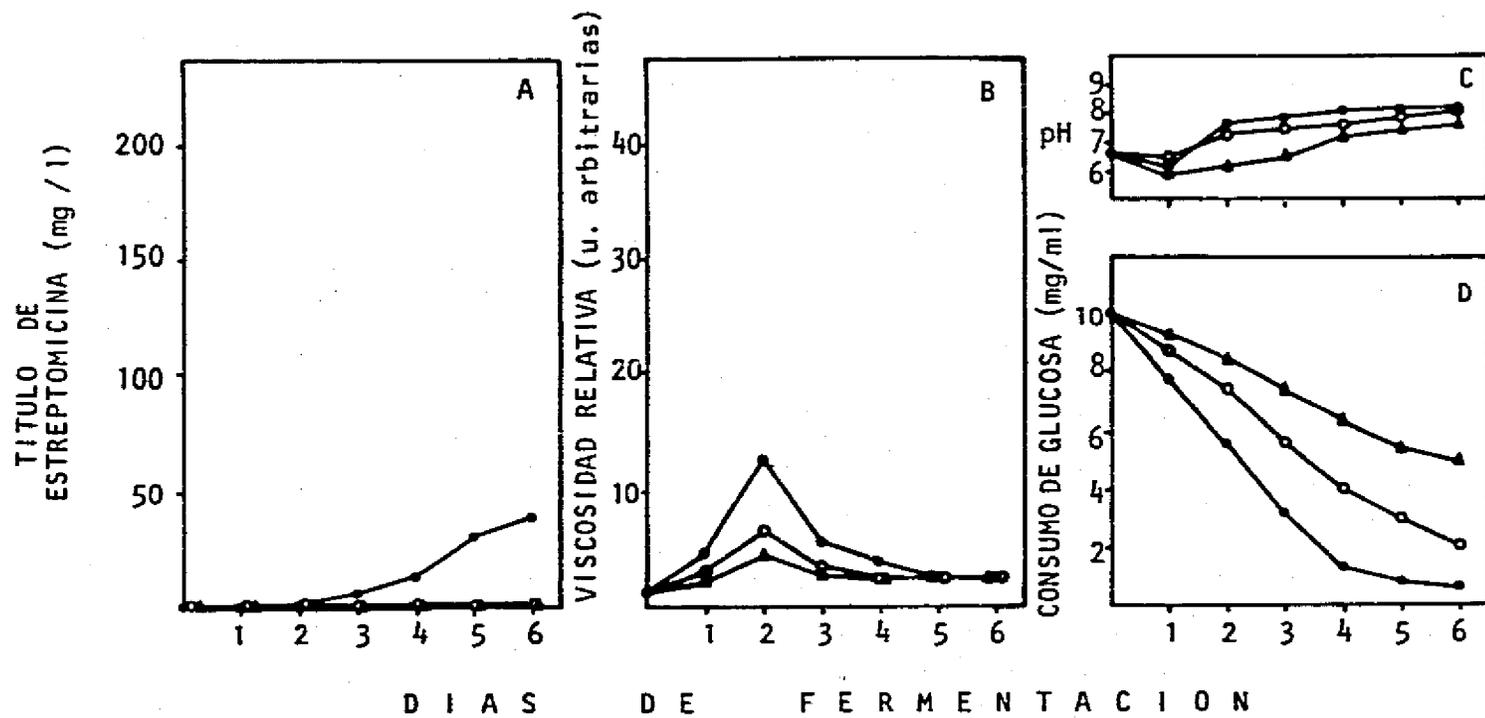


Fig. 15. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en matraces erlenmeyer de 250 ml con 50 (●), 100 (○) y 150 (Δ) ml de medio 7, incubados a 28°C y 200 rpm. (A) Producción de estreptomina, (B) viscosidad relativa, (C) pH y (D) consumo de glucosa.

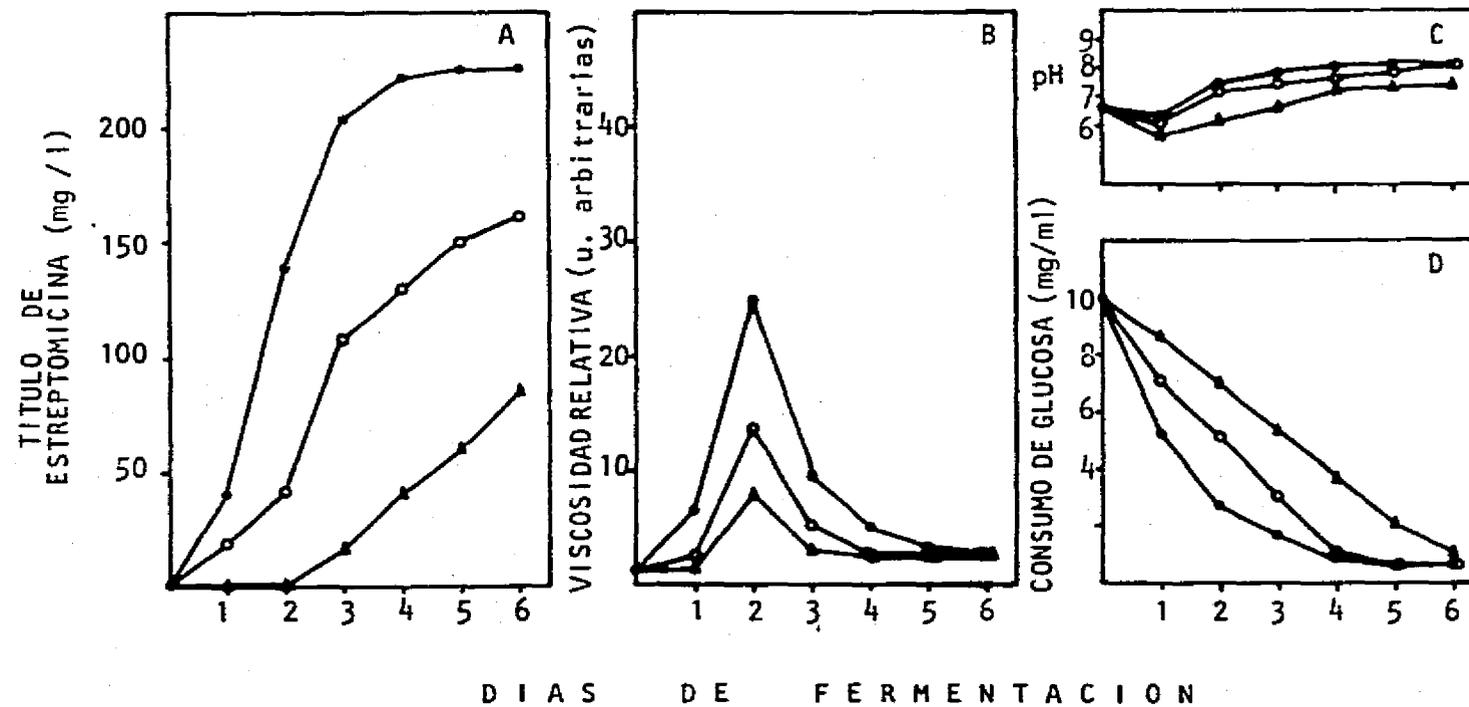


Fig. 16. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en matraces con deflectores de 250 ml y 50 (●), 100 (○) y 150 (Δ) ml de medio 7, incubados a 28°C y 200 rpm. (A) Producción de estreptomina, (B) viscosidad relativa, (C) pH y (D) consumo de glucosa.

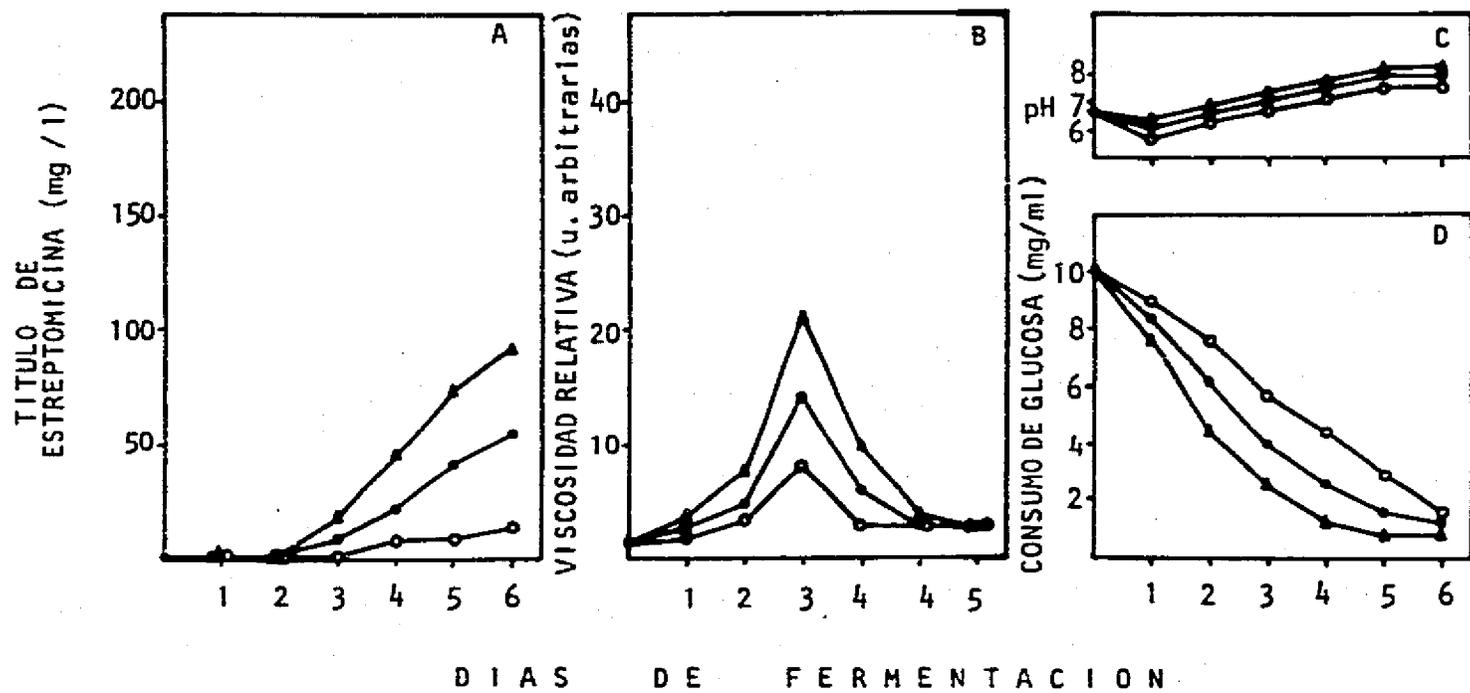


Fig. 17. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en matraces erlenmeyer de 500 ml con 50 (Δ); 100 (\bullet) y 200 (\square) ml de medio 7, incubados a 28°C y 200 rpm. (A) Producción de estreptomina; (B) viscosidad relativa, (C) pH y (D) consumo de glucosa.

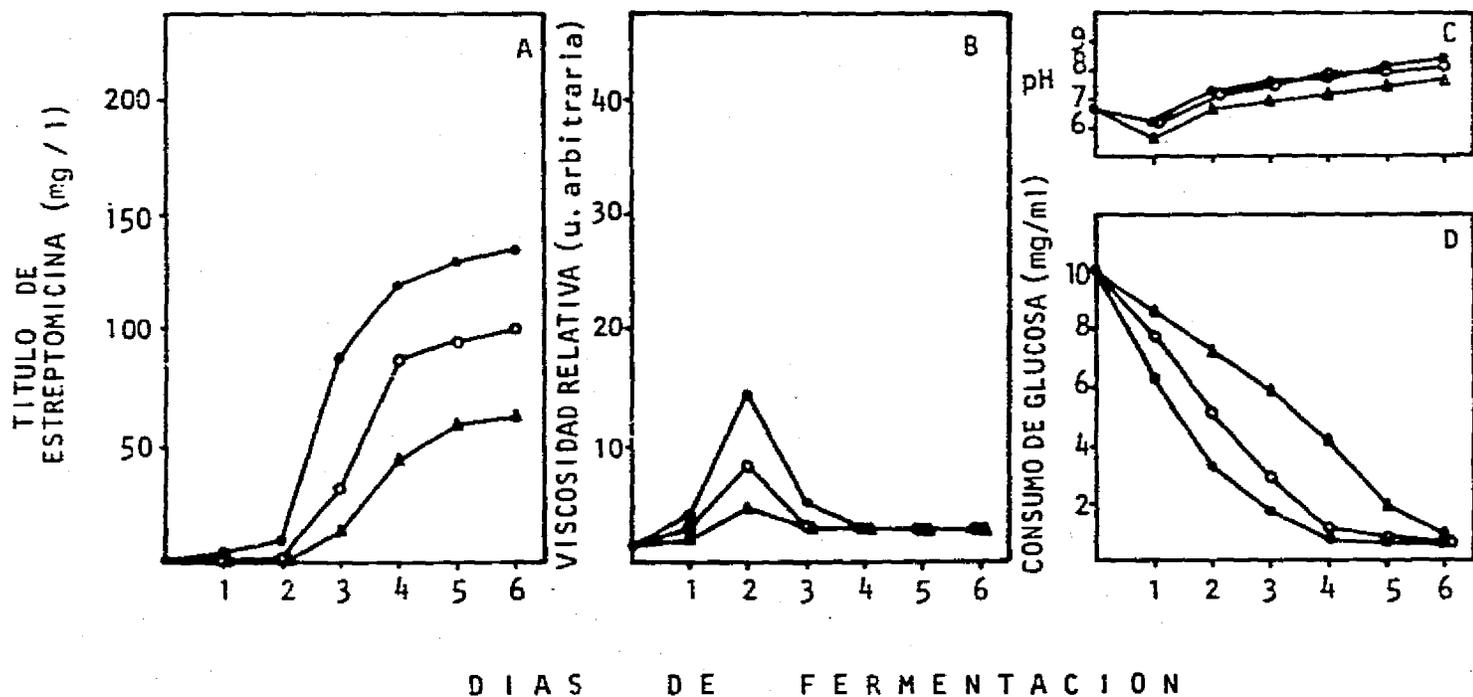


Fig. 18. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en matraces Fernbach de 2.8 litros con 300 (●); 600 (○) y 900 (△) ml de medio 7, incubados a 28°C y 160 rpm. (A) Producción de estreptomicina, (B) viscosidad relativa, (C) pH y (D) consumo de glucosa.

matraces con deflectores y en los Fernbach, a la más baja fracción de llenado fueron muy similares (Figs. 16D y 18D).

El perfil del pH observado en todas las fracciones de llenado empleadas, también fue indicativo de las condiciones de oxigenación existentes en los matraces. Cuando la capacidad de oxigenación se vió disminuída, los valores de pH que se registraron fueron más bajos (Figs. 15C, 16C, 17C y 18C), como consecuencia de la acumulación de lactato y piruvato en el medio de acuerdo a Hockenhull y col. (1954), Hockenhull (1960) y Demain e Inamine (1970).

En la Figura 19 se presentan los títulos de producción de estreptomycin obtenidos al final de los 6 días de fermentación, en función de la fracción de llenado. Las curvas fueron trazadas tratando de tener el mejor ajuste. En todos los casos, el aumento en la fracción de llenado fue asociado a una disminución en el título de estreptomycin.

Los más bajos títulos de producción alcanzados en este estudio fueron los obtenidos con los matraces lisos de 250 ml. Estos resultados podrían explicarse con base en los estudios de Freedman (1969), quien encontró que en los matraces de 250 ml se logran los más bajos niveles de transferencia de oxígeno en comparación con las otras capacidades comerciales existentes en este tipo de matraces, que van desde 10 hasta 2000 ml. El mismo autor destaca que a pesar de ésto, los matraces Erlenmeyer de 250 ml son los que más se utilizan en todo el mundo en el campo de las fermentaciones.

El mayor título de estreptomycin se alcanzó en los matraces con deflectores. Con una fracción de llenado de 0.2, se encontró que el título del antibiótico fue 3.88 veces mayor que el obtenido en los matraces lisos de 250 ml. Esto se debe a la presencia de los deflectores que ocasionan turbulencia en el cultivo, la cual favorece la oxigenación. Freedman (1969), demostró que en los matraces con deflectores laterales se alcanzan velocidades de transferencia de oxígeno considerablemente mayores a las que se tienen en matraces lisos, con deflectores en el fondo o en la esquina. Van Suijdam y col. (1978), encontraron que la transferencia de oxígeno en los matraces de 500 ml con deflectores laterales fue 14 veces mayor que la que se presenta en matraces Erlenmeyer sin deflectores. Esto se debe al grado de turbulencia que es efecto de la presencia de los deflectores.

A este respecto, llama la atención el hecho de que aún conociendo los altos requerimientos de transferencia de oxígeno para la producción de estreptomycin, en ninguno de los estudios revisados se menciona del empleo de matraces con deflectores, a excepción de Singh y col. (1976), quienes los utilizaron para producir el inóculo de fermentadores de laboratorio.

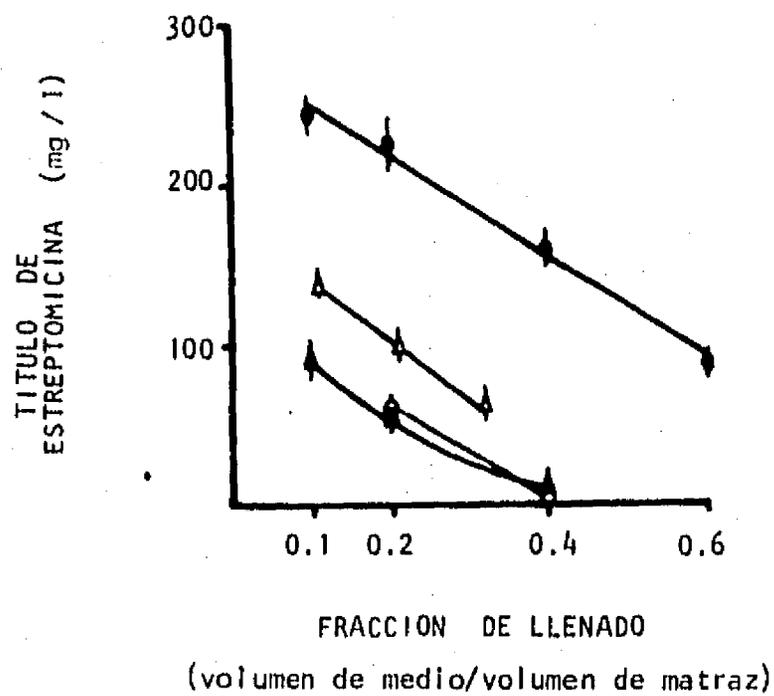


Fig. 19. Efecto de la fracción de llenado sobre la producción de estreptomina utilizando matraces Erlenmeyer de 250 ml (○) y de 500 ml (△), matraces con deflectores de 250 ml (◊) y matraces Fernbach de 2.8 l (▽).

Para demostrar que el efecto de la fracción de llenado sobre la producción de estreptomina es debida a la transferencia de oxígeno que se tiene en los matraces, en la Figura 20 se compararon los títulos de producción obtenidos en este trabajo en los matraces de 500 ml con las velocidades de transferencia de oxígeno obtenidas por Freedman (1969) en el mismo tipo de matraces y a las mismas fracciones de llenado. El hecho de que ambas curvas presenten el mismo perfil, confirma que el efecto de la fracción de llenado sobre la producción de estreptomina es función de las velocidades de transferencia de oxígeno que prevalecen en los matraces. De los datos de la Figura 20 se tiene que al reducir la fracción de llenado de 0.4 a 0.2 Freedman (1969), encontró que la velocidad de transferencia de oxígeno aumentó al doble, en el presente estudio se observó un aumento de cuatro veces en el título de estreptomina. Este aspecto confirma los altos requerimientos de oxígeno de la cepa productora.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió trabajar con los matraces de 250 ml con deflectores conteniendo 50 ml de medio, lo que da una fracción de llenado de 0.2. Estas condiciones permitirán tener un volumen suficiente de cultivo para que al tomar muestras cada día, no se disminuya de manera considerable la fracción de llenado, y por lo tanto no se vea alterada la oxigenación del cultivo, y obtener con pocos matraces, un volumen de cultivo suficiente para ser utilizado como inóculo en los fermentadores.

3.4 Efecto de la velocidad de agitación

La velocidad de agitación es otra variable que determina la capacidad de transferencia de oxígeno, por lo que es de esperarse que afecte la producción de estreptomina. Para evaluar la magnitud de tal efecto se llevó a cabo un experimento a velocidades de agitación de 160, 200 y 220 rpm, las cuales se seleccionaron en base a la disponibilidad del equipo utilizado.

Los resultados obtenidos utilizando matraces de 250 ml con deflectores se presentan en la Figura 21 de manera comparativa con las velocidades de transferencia de oxígeno en matraces lisos de 500 ml reportados por Freedman (1969). Se observa que un incremento en la velocidad de agitación de 160 a 200 rpm provocó un incremento del 13% en la velocidad de transferencia de oxígeno y al aumentar de 160 a 220 rpm el incremento fue 20% (Freedman, 1969). El título de estreptomina se incrementó en 28% al aumentar la velocidad de agitación de 160 a 200 rpm, y del 35% a llevar la agitación de 160 a 220 rpm. El aumento de 200 a 220 rpm

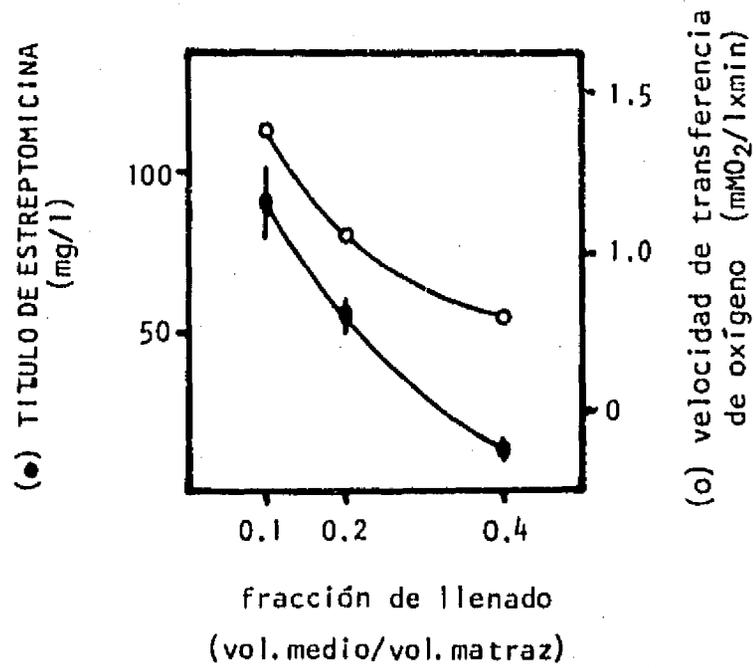


Fig. 20. Comparación del efecto de la fracción de llenado sobre la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 (●) y sobre la velocidad de transferencia de oxígeno (○, resultados reportados por Freedman, 1969).

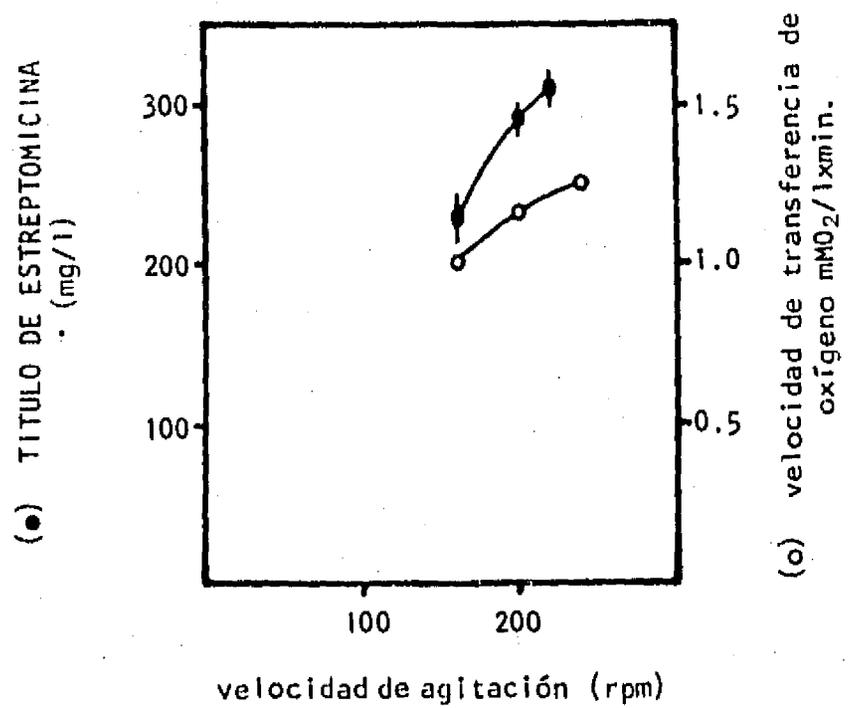


Fig. 21. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de estreptomina por *S. griseus* ATCC 12475 (●), y sobre la velocidad de transferencia de oxígeno (○, resultados reportados por Freedman, 1969).

no tuvo efecto significativo sobre la producción del antibiótico y sí el inconveniente de que a esta última velocidad, los tapones de algodón se mojaron. Los resultados confirman que al aumentar la velocidad de agitación, se mejoró la transferencia de oxígeno, y esto favoreció la producción de estreptomina.

Durante el experimento también se observó que cuando la velocidad de agitación fue de 160 rpm, el pH del cultivo mostró valores más bajos que a 200 o 220 rpm. Esto se debe, como se mencionó anteriormente, a la acumulación de lactato y piruvato como consecuencia del bajo nivel de oxigenación (Hockenhull y col. 1954; Hockenhull, 1960 y Demain e Inamine, 1970).

En la literatura no existen datos que muestren el efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de estreptomina en matraces. Pero a partir de los datos que se mostraron en la Tabla 12, se puede observar que la velocidad de agitación comúnmente utilizada para la producción de este antibiótico y sus derivados ha sido entre 200 y 245 rpm (Woodroff y Ruger, 1948; Dulaney, 1948b, 1949 y 1951; Benedict y col., 1951; Kavanagh y col., 1960; Miller y Walker, 1970; Cella y Vining, 1975). Otros autores utilizaron agitación oscilatoria entre 90 y 120 opm (oscilaciones por minuto; Rake y Donovick, 1946; Garner y col., 1953; Perlman y col., 1954).

Por los resultados obtenidos en este trabajo, se decidió utilizar una velocidad de agitación de 200 rpm.

4. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Una vez definidas las condiciones de experimentación en matraces, se iniciaron las pruebas preliminares a la optimización del medio, con el fin de seleccionar los ingredientes importantes para la producción de la estreptomina.

4.1 Efecto del agua de la llave y de los elementos traza

Algunos autores como McDaniel (1946), Hockenhull (1960) y Singh y col. (1976) utilizaron agua de la llave para la producción de estreptomina. Garner y col. (1953) mencionan haber obtenido resultados favorables con la mutante E15-1 de S. griseus, al utilizar agua de la llave en lugar de agua destilada.

Los elementos traza que, como su nombre lo indica son requeridos en bajas concentraciones, actúan como cofactores de numerosas actividades enzimáticas, por lo que son esenciales para asegurar el crecimiento y la producción de estreptomina (Demain e Inamine, 1970). Al respecto, Shirato y Motoyama (1966), encontraron que zinc y fierro fueron indispensables para obtener una buena producción de estreptomina con *S. griseus* K-1. Por otro lado, Demain e Inamine (1970) establecieron que el calcio estimula la producción del antibiótico al revertir el efecto negativo de las altas concentraciones de fosfato en el medio.

Muchos de los microelementos están presentes en el agua de la llave, aunque su concentración varía dependiendo de la fuente de donde provenga. Además, los nutrientes complejos en especial los productos de levadura como la levadura de cerveza, sus autolisados o sus extractos, son ricos en microelementos (Bader, 1986), entre los que se encuentran calcio, potasio, magnesio, zinc, cobre y fierro (Cejka, 1985).

En virtud de que en este trabajo se plantea llevar la fermentación a escala de planta piloto utilizando reactivos industriales, es necesario pensar en el uso de agua de la llave para tener un menor costo y fácil disponibilidad de esta importante materia prima. Por tanto, se consideró conveniente evaluar si el agua de la llave, presentaba algún efecto sobre la producción de estreptomina. Simultáneamente, se probó si era necesario adicionar al medio, elementos traza como Fe^{++} , Zn^{++} y Ca^{++} para favorecer la producción del antibiótico.

Para esto se llevó a cabo un experimento en el que se sustituyó el agua de la llave por agua destilada, y al mismo tiempo se adicionaron conjuntamente los elementos traza a las concentraciones que McDaniel (1950) recomendó para el medio 7: $FeSO_4$, 0.001%; $ZnSO_4$, 0.0002% y $CaCl_2$, 0.01%.

Los resultados obtenidos al final de 5 días de incubación, se presentan en la Figura 22. Se observa que no hay diferencia significativa al emplear cualquiera de las combinaciones probadas, agua de la llave o agua destilada con y sin elementos traza. Al parecer, el hecho de usar levadura en el medio de cultivo proporciona al microorganismo los microelementos necesarios para su crecimiento y la síntesis del antibiótico.

Por los resultados obtenidos se decidió no incluir los elementos traza probados y se confirmó que el agua de la llave no presenta efecto negativo sobre la producción del antibiótico.

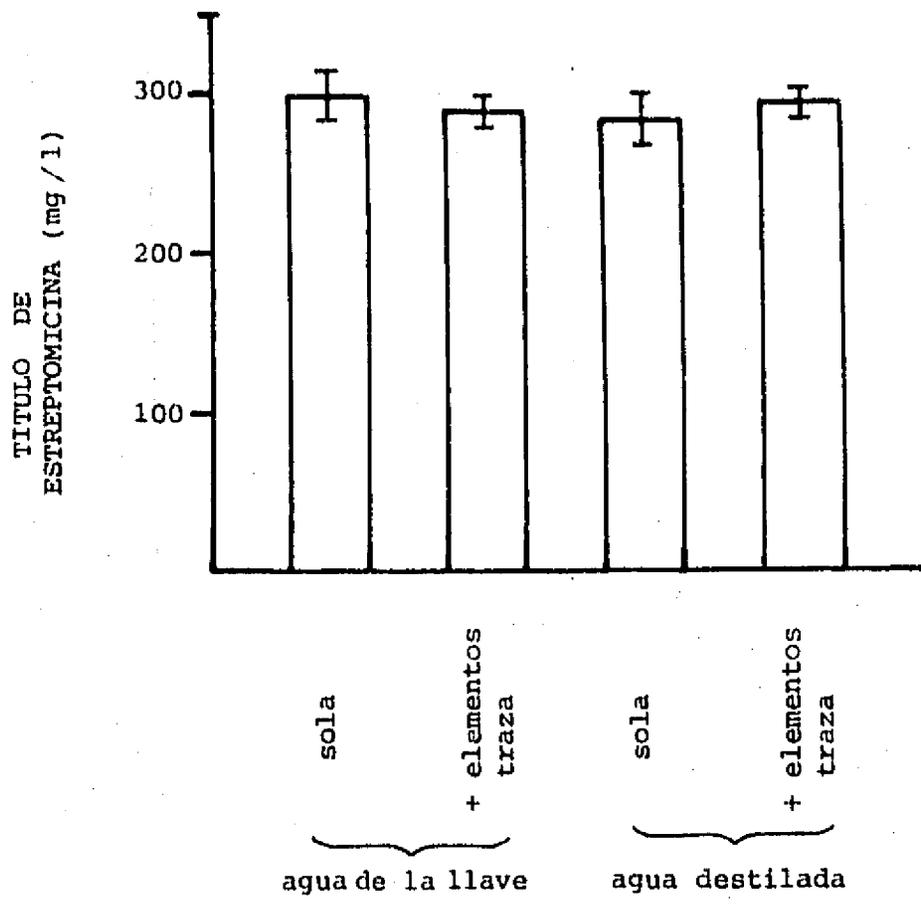


Fig. 22 Efecto del agua de la llave y los elementos traza (Ca^{++} , Zn^{++} , Fe^{++}) sobre la producción de estreptomina en matraces con deflectores de 250 ml - con 50 ml de medio 7, incubados a 28°C y 200 rpm durante 5 días.

4.2 Efecto del pH inicial

Se sabe que el pH tiene un efecto crítico sobre la producción de estreptomina (Inoue y col., 1982a). Por esto se consideró importante encontrar el pH inicial al cual se alcanza el mayor título de antibiótico, antes de iniciar los experimentos conducentes a la optimización del medio. Esto se hizo porque la eliminación de algún nutriente o la modificación de su concentración podría alterar el valor del pH inicial del medio, ocasionando al mismo tiempo variación en el título del antibiótico.

Para tal efecto se llevó a cabo un experimento por triplicado, considerando 9 valores de pH inicial. En 4 de ellos el pH se ajustó entre 6.0 y 7.5 antes de esterilizar. En otros 4, el pH se ajustó después de esterilizar entre 5.5 y 7.5. A un control no se le ajustó el pH. Todos los matraces fueron inoculados con la suspensión de esporas e incubados a las condiciones establecidas con anterioridad. Después de cinco días de incubación, se determinó el título de estreptomina producida.

De acuerdo a los resultados obtenidos mostrados en la Figura 23, el pH inicial más adecuado fue de 6.0. Cuando el pH del medio se ajustó a 6.0 antes de esterilizar, el título de estreptomina alcanzado a los 5 días de incubación no presentó diferencias significativas con respecto al medio control. El valor óptimo encontrado en este estudio es cercano a los reportados en la literatura. Dulaney (1951) encontró que la producción de estreptomina en un medio conteniendo glucosa, harina de soya y destilados solubles, fue máxima a pH inicial entre 6.5 y 6.6 para la mutante de *S. griseus* Z-38 y de 6.1 a 6.3 para la mutante L-118. Garner y col. (1953), utilizando un medio con glucosa, extracto de carne y peptona encontraron la máxima producción a un pH inicial de 6.6, valores de pH por abajo y por arriba de éste, disminuyeron la producción, después de 7.0 la producción cayó notablemente. Un comportamiento similar se observó en este estudio, a medida que el pH aumentó por arriba de 6.5, el título del antibiótico se vió afectada negativamente.

4.3 Eliminación de ingredientes no indispensables

El interés por seleccionar los nutrientes importantes en la producción de estreptomina fue fundamentalmente, incluir sólo aquellos nutrientes que son indispensables para la óptima

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

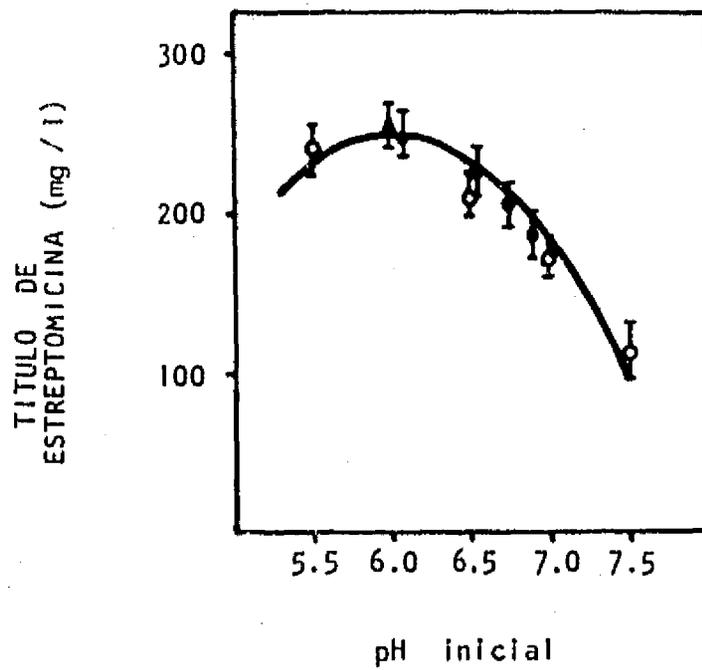


Fig. 23. Efecto del pH inicial sobre la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC cultivada en matraces con deflectores de 250 ml con 50 ml de medio 7; a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 200 rpm durante 5 días. Valores de pH ajustados antes (o) y después (●) de esterilizar, (Δ) control - sin ajuste de pH.

actividad metabólica del microorganismo y eliminar aquellos que no son utilizados.

El hecho de que se esté utilizando levadura de cerveza autolisada en el medio de cultivo, que es rica en gran cantidad de nutrientes, deja abierta la posibilidad de que satisfaga otros requerimientos nutricionales del microorganismo además del nitrógeno. De ser así, la adición de una mayor cantidad de éstos no sería aprovechada y por el contrario estaría incrementando el costo del medio de cultivo. En esta situación podrían estar el sulfato de magnesio, el fosfato dibásico de potasio y tal vez el cloruro de sodio.

Por otro lado, Dulaney (1948b) encontró que los nitratos no pueden ser utilizados por el microorganismo, y dado que el medio contiene nitrato de sodio, había que investigar si éste estaba siendo aprovechado. Lo más probable es que el microorganismo prefiera a la levadura de cerveza como fuente de nitrógeno.

Para identificar los nutrientes esenciales, se llevó a cabo un experimento por triplicado en el que se eliminó un nutriente cada vez. Esta estrategia se consideró más sencilla pues con pocas observaciones se podría saber cuales ingredientes son esenciales y cuales no lo son. Aquellos que al estar ausentes no afecten la producción serán considerados no indispensables, por lo tanto podrán ser eliminados. Por el contrario los nutrientes que por ser eliminados causen una reducción significativa en el título de antibiótico, serán considerados indispensables y en una etapa posterior podrá determinarse su concentración óptima.

Es de esperarse que la eliminación de las fuentes de carbono o de nitrógeno sí tenga efecto negativo sobre la producción, por lo que parecería obvio el resultado. No obstante sirvieron como referencia para observar el efecto de la eliminación de los otros nutrientes.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24. Como se esperaba, al eliminar la glucosa el título observado fue bajo y en ausencia de la levadura de cerveza autolisada no se produjo antibiótico. Al eliminar el cloruro de sodio y el fosfato dibásico de potasio, la producción de estreptomina también se disminuyó notablemente.

Cuando se eliminó la glucosa, la levadura de cerveza autolisada le permitió al microorganismo alcanzar un título de estreptomina de 94 mg/l, cifra que corresponde al 30% del título observado en el medio conteniendo todos los ingredientes. Esto indica que esta fuente orgánica de nitrógeno, es utilizada también como fuente carbono.

Al eliminar el cloruro de sodio el título de estreptomina alcanzado fue de 187 mg/l, que corresponde al 70% en relación al control. Este ingrediente es importante para la liberación del

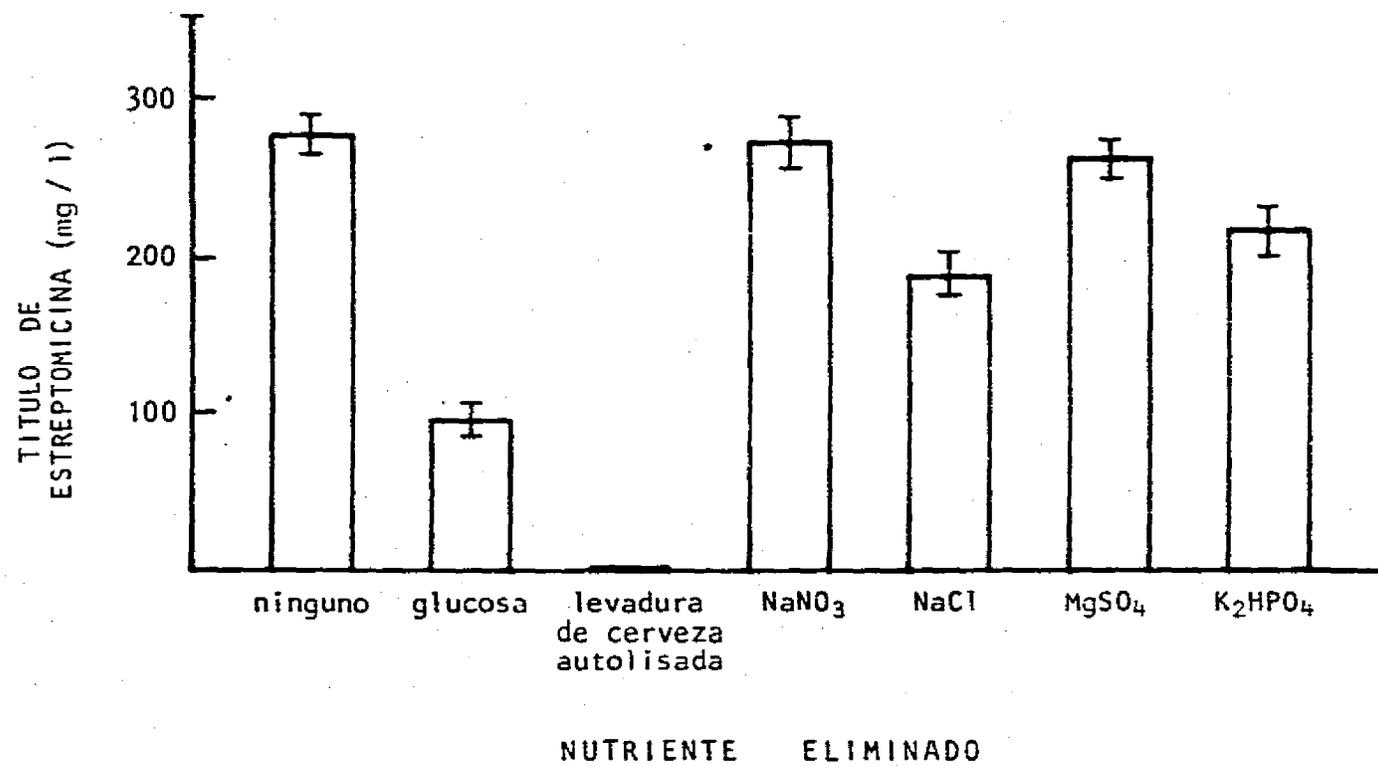


Fig. 24. Efecto de la eliminación de cada nutriente del medio sobre la producción de estreptomina. *S. griseus* ATCC 12475 fué cultivada en matraces con defletores de 250 ml con 50 ml del medio 7, incubados a 28°C y 200 rpm durante 5 días.

antibiótico al medio (Rake y Donovick, 1946); Demain e Inamine, 1970 y Barabás y col., 1980) por lo que su ausencia tiene efecto negativo sobre la producción del antibiótico.

La eliminación de fosfato dibásico de potasio provocó una disminución del 20%, ya que el título alcanzado fue de 215 mg/l. Esto se debió a que la concentración de fosfato en el medio es un factor regulatorio de la síntesis de estreptomina (Demain e Inamine, 1979). El pH medido al final de la fermentación fue prácticamente el mismo que en el control, por lo que no se puede asegurar si el fosfato de potasio también afectó la capacidad reguladora del pH.

Aparentemente el microorganismo empleado no utiliza el nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, ya que su eliminación no afectó de manera significativa la producción de estreptomina. Esto se confirma porque al estar ausente la levadura de cerveza autolisada, el nitrato podía haber sido empleado por el microorganismo, sin embargo, no se observó crecimiento ni mucho menos producción de estreptomina. Dulaney (1948b), también observó que una cepa de *S. griseus* no mostró la capacidad de utilizar el nitrato de sodio como fuente de nitrógeno.

La eliminación del sulfato de magnesio no afectó de manera significativa el título de estreptomina, en relación al control, conteniendo todos los ingredientes. De acuerdo a Demain e Inamine (1970) este nutriente puede ser eliminado cuando se emplean fuentes complejas de nitrógeno en el medio.

Los resultados obtenidos indicaron que solo cuatro ingredientes del medio: glucosa, levadura de cerveza autolisada, cloruro de sodio y fosfato dibásico de potasio podían considerarse indispensables. Para comprobar si esto era correcto, se realizó un experimento adicional en el que se eliminaron nitrato de sodio y sulfato de magnesio de manera alternada y simultánea. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 25 confirmaron que al eliminar estos dos ingredientes la producción de estreptomina no se vió afectada negativamente. La comparación múltiple de medias indicó que no hubo diferencias significativas, a un nivel de confianza del 95%, entre los diferentes tratamientos.

Con base en estos resultados se decidió eliminar del medio 7, al nitrato de sodio y al sulfato de magnesio y emplear solamente los cuatro ingredientes esenciales que fueron glucosa, levadura de cerveza autolisada, cloruro de sodio y fosfato dibásico de potasio. Este medio simplificado fue denominado medio 14, de acuerdo al capítulo "Material y Métodos" y se consideró el punto de partida para su optimización.

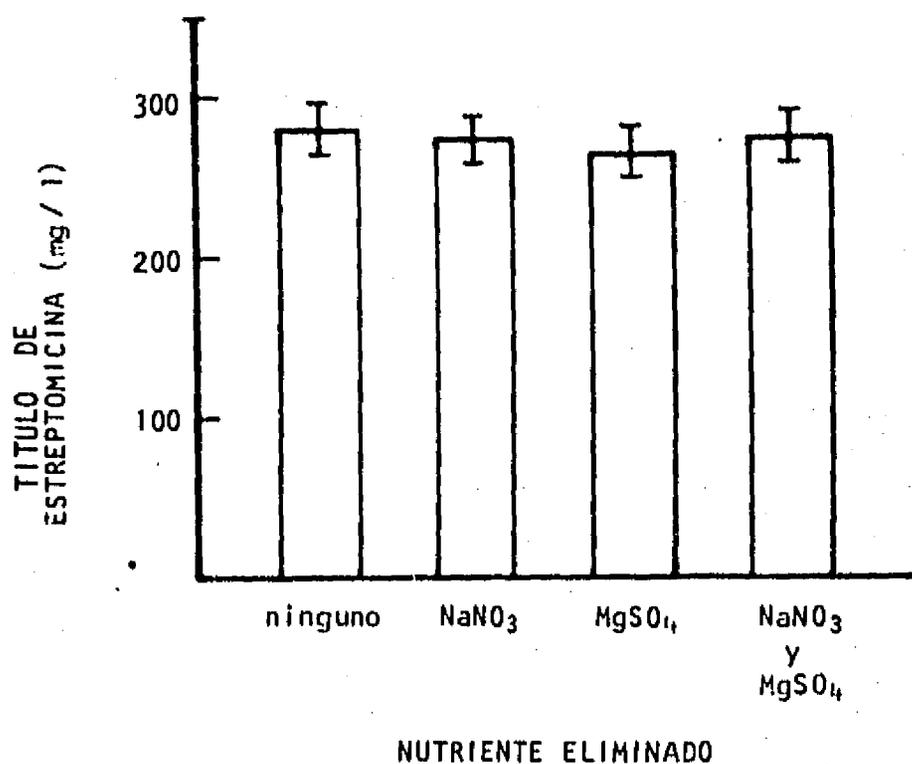


Fig. 25. Producción de estreptomicina en el medio 7, eliminando nitrato de sodio y sulfato de magnesio de manera alternada y simultánea. *S. griseus* ATCC 12475 fué cultivada en matraces con defletores de 250 ml con 50 ml de medio, incubados a 28°C y 200 rpm durante 5 días.

4.4 Optimización de la concentración de los ingredientes del medio

El uso de metodologías estadísticas que ya han mostrado su aplicación en otras áreas pueden ser de gran utilidad para establecer los efectos principales y las interacciones de los factores que juegan un papel fundamental en cualquier proceso. Varios han sido los autores que han empleado técnicas estadísticas para la optimización de un proceso biotecnológico; entre ellos Votruba y col. (1975), Moresi y Sebastiani (1979), Moresi y col. (1979), Fannin y col. (1981), Chen (1981), Chen y Gutmanis (1982), Egorov y col. (1982) y Wright y Richardson (1982).

A pesar de que la metodología de superficie de respuesta fue descrita hace casi 4 décadas y de que algunos autores sugirieron su empleo en el área biotecnológica (Calam, 1967), hasta la fecha ha sido poco explotada. Entre los ejemplos de su aplicación encontrados en la literatura están: la optimización del crecimiento de Aspergillus niger utilizando un medio de bajo costo (Remmers y Dunn, 1961); la optimización de la producción de candidina por Streptomyces viridoflavus y del macrólido hexaeno 191 (Mc Daniel y col., 1976); la optimización de un medio de cultivo para la producción de ácido giberélico por Fusarium moniliforme (Maddox y Richert, 1977); la optimización del medio para la producción de celulasa por Schizophyllum commune (Desrochers y col., 1981); el establecimiento de las condiciones para la bioconversión de citronelal a citronelol por Candida tenuis (Cheynier y col., 1983) y la optimización de las condiciones de activación de un soporte aminado para la inmovilización de ribonucleasa A con glutaraldehído (Marty, 1985).

La metodología de superficie de respuesta (MSR), es una herramienta estadística sencilla, rápida y accesible que permite determinar las condiciones óptimas que maximizan una respuesta que puede ser por ejemplo, la concentración de un producto, el rendimiento o la economía de un proceso (Box y Wilson, 1951; Myers, 1971; Mead y Pike, 1975). Al emplear esta metodología se requieren relativamente pocas observaciones para obtener buenos resultados, también elimina la necesidad de realizar varias repeticiones de todas las observaciones, lo que ahorra mucho tiempo y costo de experimentación y el manejo de gran cantidad de muestras al mismo tiempo.

Los pasos seguidos para la optimización, utilizando la metodología de superficie de respuesta podrían resumirse como sigue:

1. seleccionar las variables que van a ser estudiadas,

2. definir la respuesta que va a ser maximizada,
3. definir el dominio experimental a explorar,
4. plantear el diseño experimental,
5. realizar la experimentación de acuerdo al diseño establecido manteniendo constantes las condiciones de operación,
6. con los resultados obtenidos, establecer el modelo matemático estimado (\hat{y}) con el cual podrán calcularse los valores óptimos de cada variable y la superficie de respuesta correspondiente.

A través de la representación esquemática de las variables es posible conceptualizar el problema de optimización. Con un cuadrado se representan los niveles codificados para dos variables x_1 y x_2 (Fig. 26A) y con un cubo los niveles para tres variables x_1 , x_2 y x_3 (Fig. 26C). La representación de más de tres variables ya no es posible presentarla mediante un esquema. Cada variable se evalúa a dos niveles, uno alto (+1) y otro bajo (-1), los cuales son referidos a un punto central (0) el cual corresponde a la concentración de cada una de las variables en el medio que va a ser optimizado. En algunos casos, se incluyen puntos axiales o estrella a un nivel alto (+ α) y otro bajo (- α) con el fin de eliminar la interacción entre las variables y observar el efecto puro de cada una de ellas.

Utilizando la metodología de superficie de respuesta se procedió a determinar la óptima concentración de los cuatro ingredientes del medio seleccionados previamente, para maximizar el título de estreptomycin. Las variables se identificaron como sigue: glucosa, x_1 ; levadura de cerveza autolisada, x_2 ; cloruro de sodio, x_3 y fosfato dibásico de potasio, x_4 .

Experimento 1.

Con fines exploratorios, se realizó un primer experimento en el que cada variable se evaluó a dos niveles los cuales fueron codificados como -1 y +1 y fueron referidos a un punto central. La concentración en el punto central para x_1 , fue 1% y se eligió una distancia de 0.5%, por lo que los niveles -1 y +1 corresponden a 0.5 y 1.5%, respectivamente. Para x_2 , el punto central fue 2.5% y la distancia fue de 1%, el nivel -1 corresponde a 1.5% y el nivel +1, a 3.5%. El mismo tratamiento se dió a las variables x_3 y x_4 , las cuales fueron codificadas como se indica en la Tabla 15.

Para este primer experimento, se utilizó un diseño ortogonal para modelos de primer orden (Myers, 1971), el cual se presenta en la Tabla 16. En este se consideraron todas las combinaciones posibles para cada variable y el punto central repetido cuatro veces para incluir la variabilidad experimental del sistema. De esta manera se hizo un diseño a 2 niveles para 4 factores, es decir, $2^4 = 16$ combinaciones y cuatro puntos centrales que dan un total de 20 observaciones. En todos los casos el pH inicial fue de 6.0. Los matraces fueron incubados durante 5 días, después de

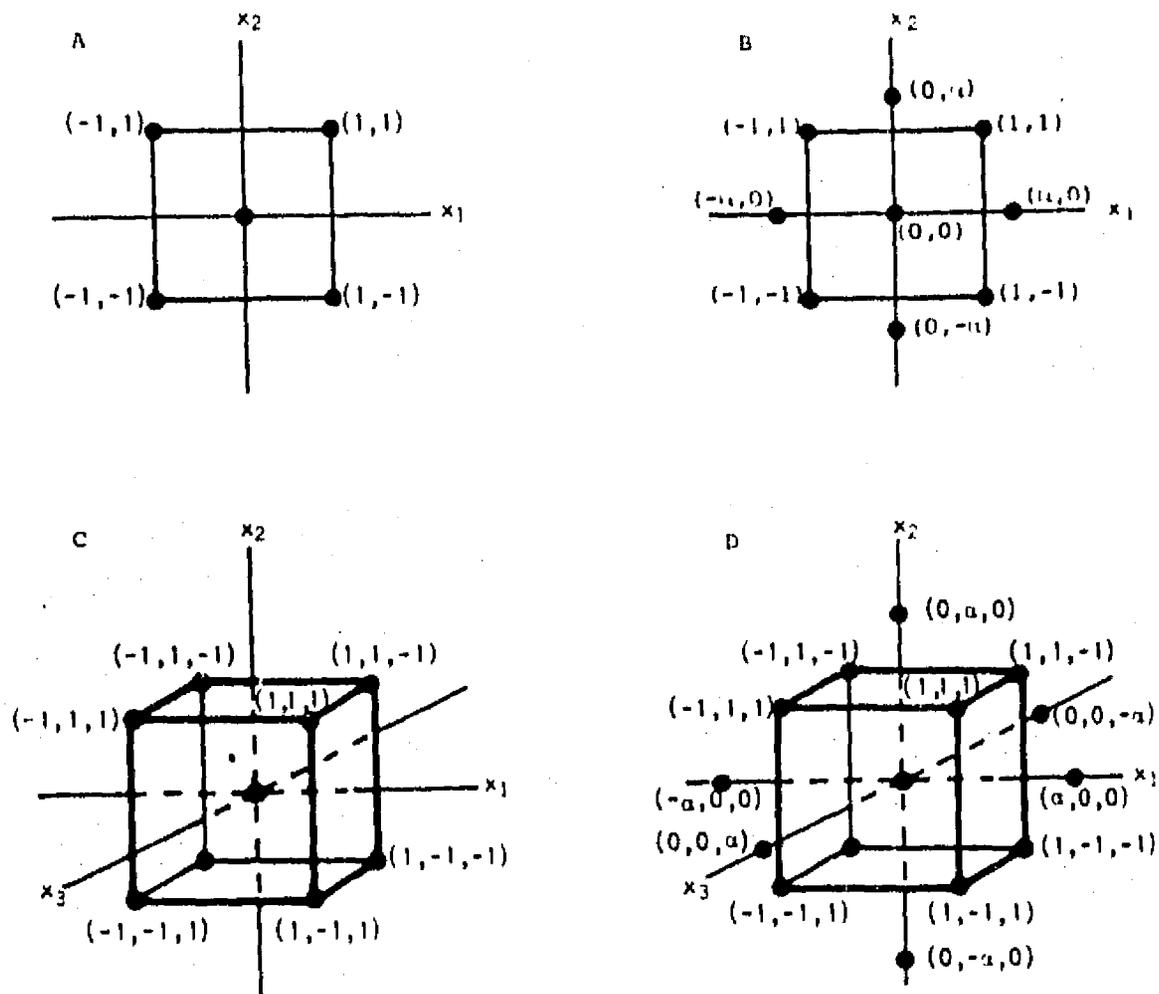


Fig. 26. Representación esquemática de los niveles de concentración para diseños experimentales que constan de: (A) dos variables x_1 y x_2 cada una a un nivel alto y un nivel bajo y un punto central; - (B) el caso anterior pero adicionando cuatro puntos axiales; - (C) tres variables x_1 , x_2 y x_3 cada una a un nivel alto y un nivel bajo y un punto central y (D) el caso anterior pero adicionando seis puntos axiales.

TABLA 15

NIVELES DE CONCENTRACION DE LOS NUTRIENTES PARA EL DISEÑO
EXPERIMENTAL ORTOGONAL

NIVEL	GLUCOSA x_1 (%)	LEVADURA x_2 (%)	NaCl x_3 (%)	K_2HPO_4 x_4 (%)
-1	0.5	1.5	0.5	0.05
0	1.0	2.5	1.0	0.10
+1	1.5	3.5	1.5	0.15

TABLA 16

DISEÑO EXPERIMENTAL ORTOGONAL
PARA LA OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

No. OBSERVACION	GLUCOSA (x_1)	LEVADURA (x_2)	NaCl (x_3)	K_2HPO_4 (x_4)
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	1	-1	-1
5	1	-1	-1	-1
6	-1	-1	1	1
7	-1	1	1	-1
8	1	-1	1	-1
9	-1	1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	1	1	-1	-1
12	-1	1	1	1
13	1	-1	1	1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

los cuales se determinó el título de estreptomicina producido. A los resultados obtenidos en este experimento se les ajustó un modelo de regresión lineal de segundo orden para 4 variables, cuya expresión es la siguiente:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{12}x_1x_2 + \\ & b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{34}x_3x_4 + \\ & b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{44}x_4^2 \end{aligned}$$

donde \hat{y} = título de estreptomicina estimado bajo las condiciones experimentales establecidas

b_0 = constante

b_i = coeficiente para cada término

x_i = concentración de cada uno de los ingredientes

El ajuste se hizo con ayuda de computadora, empleando el paquete estadístico Statgraphics (1987). El coeficiente de determinación obtenido en este primer experimento fue 0.35 debido a la interacción entre las variables, por lo que se consideró necesario ampliar el diseño experimental para observar el efecto de cada una de ellas, de manera independiente.

Experimento 2.

Con base en lo anterior, se utilizó un diseño experimental central compuesto ortogonal para cuatro factores. En éste se incluyeron 2 puntos axiales para cada una de las variables a una distancia $\alpha = 1.414$ (Myers, 1971). La adición de estos 8 puntos axiales, permitió la evaluación de 5 niveles de concentración para cada una de las variables. La codificación ampliada de éstas se presenta en la Tabla 17. Al incluir los puntos axiales se adicionaron 8 observaciones, lo que dió un total de 28.

Los títulos de estreptomicina obtenidos a los 5 días de incubación en este segundo experimento, fueron ajustados al modelo de regresión lineal de segundo orden. Al observar el perfil de las superficies de respuesta generadas, se detectó que el intervalo de exploración para la glucosa (x_1), no fue suficiente, por lo que se complementó el experimento con un ensayo utilizando concentraciones de glucosa de hasta 3%. La concentración del resto de los ingredientes se mantuvo en el punto central del mismo diseño.

La respuesta en el título de producción a diferentes concentraciones de glucosa, se presenta en la Figura 27. El

TABLA 17

NIVELES DE CONCENTRACION DE LOS NUTRIENTES PARA EL DISEÑO
EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO ORTOGONAL

NIVEL	GLUCOSA x_1 (%)	LEVADURA x_2 (%)	NaCl x_3 (%)	K_2HPO_4 x_4 (%)
-1.414	0.3	1.1	0.3	0.03
-1	0.5	1.5	0.5	0.05
0	1.0	2.5	1.0	0.1
+1	1.5	3.5	1.5	0.15
+1.414	1.7	3.9	1.7	0.17

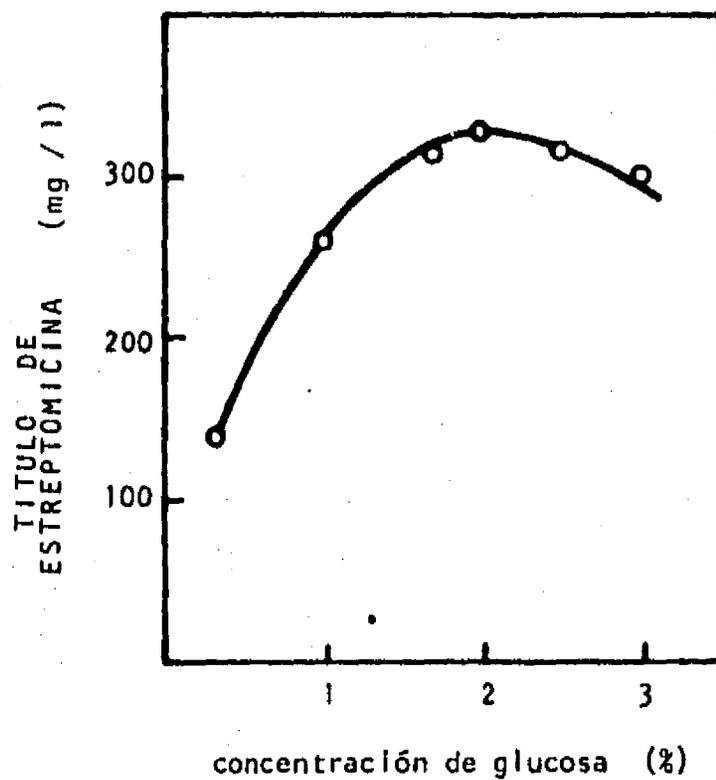


Fig. 27. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de estreptomina por S. griseus ATCC 12475.

título más alto se obtuvo con 2% de glucosa, a medida que esta concentración aumentó, la producción del antibiótico empezó a disminuir. En el experimento se observó que la viscosidad del cultivo fue aumentando conforme la concentración de glucosa fue más alta, lo que seguramente dificultó la transferencia de oxígeno en los matraces y como consecuencia afectó negativamente la producción de estreptomycin.

Experimento 3.

Con la información obtenida se realizó el tercer experimento utilizando el mismo diseño central compuesto ortogonal pero con el punto central de la glucosa (x_1) corrido en dirección de la concentración que permitió la más alta respuesta, es decir 2%, lo que esquemáticamente se presenta en forma tridimensional para tres variables, en la Figura 28. Los niveles de las variables x_2 , x_3 y x_4 , se mantuvieron constantes, como se indica en la Tabla 18. Con estas modificaciones se llevó a cabo el experimento como se procedió anteriormente.

Con los títulos de estreptomycin obtenidos, mostrados en la Tabla 19 se ajustó nuevamente el modelo de regresión lineal de segundo orden para 4 factores. Para esto se consideraron las variables lineales y cuadráticas, y sus interacciones de primer orden. La estimación de los coeficientes del modelo cuadrático ajustado se presenta en la Tabla 20, se identifican con (*) aquellos que resultaron tener un efecto significativo sobre el proceso. El modelo matemático obtenido con estos resultados experimentales fue:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & 355.58 + 39.17x_1 + 22.37x_2 - 13.81x_3 - 31.34x_1^2 \\ & - 41.60x_2^2 - 17.59x_3^2 - 10.81x_1x_2 \end{aligned} \quad (2)$$

La comparación entre los resultados experimentales y los valores pronosticados a partir de este modelo, se presentan en la Fig. 29. La bondad del acondicionamiento del modelo fue confirmada por el coeficiente de determinación ($R^2 = 0.938$), el cual indica que sólo el 6% de la variación total no es explicada por el modelo estimado (Tabla 21). Al analizar el % de la suma de cuadrados mostrada en la Tabla 20, se podría decir que únicamente las variables glucosa (x_1), levadura de cerveza autolisada (x_2) y sus valores al cuadrado x_1^2 y x_2^2 tienen una influencia más marcada sobre la producción de estreptomycin ya que estos coeficientes dan cifras superiores al 10%. Por lo que desde el punto de vista estadístico, podría utilizarse un modelo más sencillo considerando sólo estos cuatro términos y la constante, agruparían el 85.7% de la suma de cuadrados del modelo propuesto, lo que corresponde a un coeficiente de determinación de 0.925. No

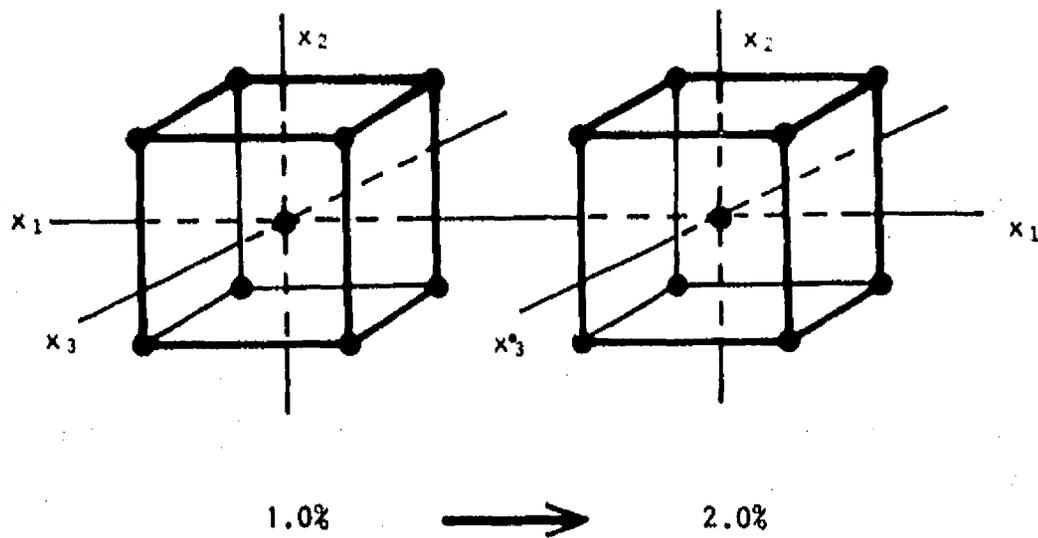


Fig. 28. Representación esquemática del corrimiento del punto central de la concentración de glucosa, x_1 , de 1.0 a 2.0%. Los valores de las variables, x_2 , x_3 y x_4 , se mantuvieron constantes.

TABLA 18

NIVELES DE CONCENTRACION DE LOS NUTRIENTES PARA EL DISEÑO
EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO
ORTOGONAL CON MODIFICACION EN x_1

NIVEL	GLUCOSA x_1 (%)	LEVADURA x_2 (%)	NaCl x_3 (%)	K_2HPO_4 x_4 (%)
-1.414	1.3	1.1	0.3	0.03
-1	1.5	1.5	0.5	0.05
0	2.0	2.5	1.0	0.1
+1	2.5	3.5	1.5	0.15
+1.414	2.7	3.9	1.7	0.17

TABLA 19

DISEÑO EXPERIMENTAL CENTRAL COMPUESTO ORTOGONAL
PARA LA OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

No. OBSERVACION	GLUCOSA (x ₁)	LEVADURA (x ₂)	NaCl (x ₃)	K ₂ HPO ₄ (x ₄)	TITULO DE ESTREPTOMICINA (mg / l)
1	-1	-1	-1	-1	234
2	-1	-1	-1	1	202
3	-1	-1	1	-1	188
4	-1	1	-1	-1	242
5	1	-1	-1	-1	287
6	-1	-1	1	1	135
7	-1	1	1	-1	245
8	1	-1	1	-1	295
9	-1	1	-1	1	272
10	1	-1	-1	1	298
11	1	1	-1	-1	316
12	-1	1	1	1	253
13	1	-1	1	1	278
14	1	1	-1	1	302
15	1	1	1	-1	294
16	1	1	1	1	326
17	0	0	0	0	348
18	0	0	0	0	380
19	0	0	0	0	354
20	0	0	0	0	368
21	1.414	0	0	0	342
22	-1.414	0	0	0	230
23	0	1.414	0	0	306
24	0	-1.414	0	0	225
25	0	0	1.414	0	265
26	0	0	-1.414	0	362
27	0	0	0	1.414	316
28	0	0	0	-1.414	356

TABLA 20

COEFICIENTES DEL MODELO CUADRATICO AJUSTADO

VARIABLE	COEFICIENTE	% SUMA DE CUADRADOS	SIGNIFICANCIA (p < 0.05)
constante	355.58		*
x ₁	39.17	33.85	*
x ₂	22.37	11.05	*
x ₃	-13.81	4.21	*
x ₄	-4.58	0.46	
x ₁ ²	-31.34	19.74	*
x ₂ ²	-41.60	21.19	*
x ₃ ²	-17.59	3.44	*
x ₄ ²	-6.34	0.40	
x ₁ x ₂	-10.81	2.06	*
x ₁ x ₃	7.43	0.98	
x ₁ x ₄	3.69	0.24	
x ₂ x ₃	6.94	0.85	
x ₂ x ₄	9.18	1.49	
x ₃ x ₄	-1.56	0.04	

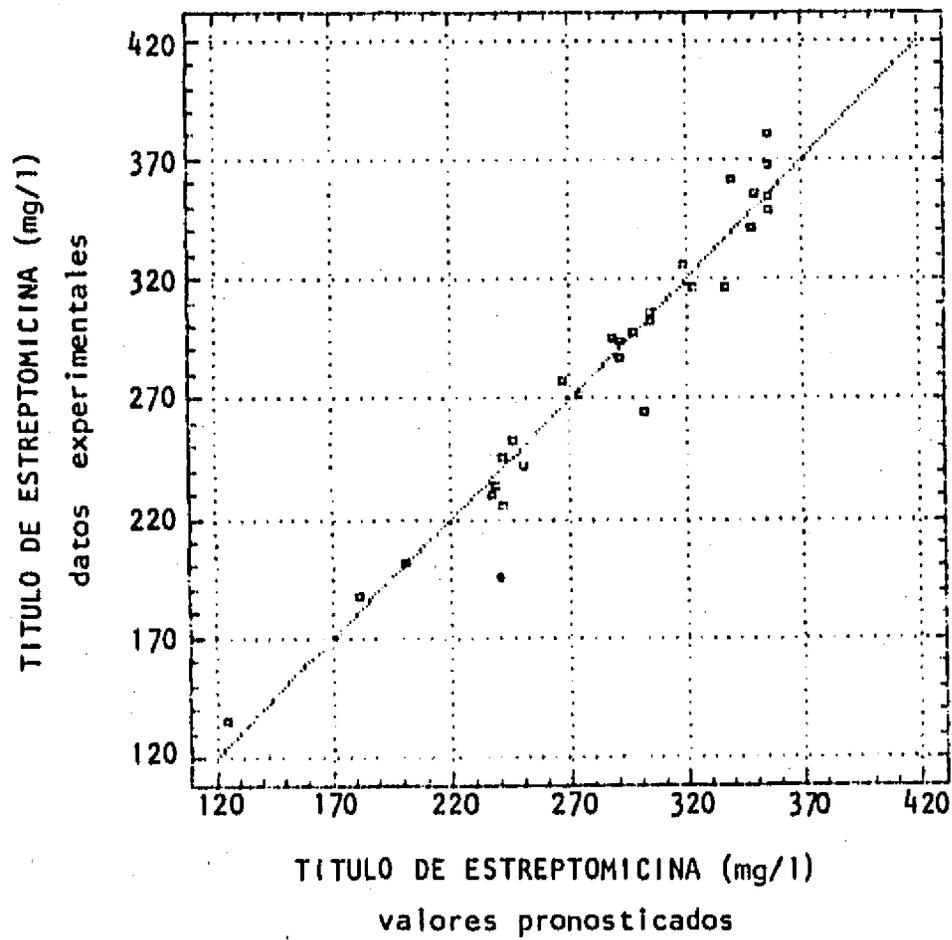


Fig. 29. Comparación de los datos experimentales y los valores pronosticados a partir del modelo cuadrático ajustado obtenido durante la utilización del medio para la producción de estreptomicina.

TABLA 21

ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO CUADRATICO AJUSTADO

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F	NIVEL DE SIGNIFICANCIA (95%)
Modelo	14	90657.0	6475.5	14.14	*
Error	13	5953.7	457.9		
Total	27	96610.7			

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9384$

obstante se decidió utilizar el modelo de la ecuación (2) para incluir todos los términos que fueron significativos durante la optimización del medio.

A partir de los coeficientes del modelo matemático propuesto se determinaron, mediante un sistema de ecuaciones, los valores óptimos para cada uno de los ingredientes del medio, los cuales se presentan en la Tabla 22. Se observa que las concentraciones de glucosa y levadura de cerveza autolisada se incrementaron, la de cloruro de sodio disminuyó y la de fosfato dibásico de potasio permaneció constante. Al medio optimizado se le denominó medio 15, de acuerdo al capítulo "Material y Métodos".

Las superficies de respuesta y sus gráficas de contornos, que se generaron al hacer interaccionar las variables a los valores óptimos, se presentan en las Figuras 30 (para x_1 vs x_2), 31 (para x_1 vs x_3) y 32 (para x_1 vs x_4). La superficie de respuesta tridimensional en forma de sombrilla, permitió visualizar los efectos principales de los factores y sus interacciones, además de localizar el punto de máxima producción. Las gráficas de contornos que son una vista superior de la superficie de respuesta permitieron también, localizar el punto de máxima producción con ayuda de las líneas de contornos que se van haciendo más estrechas conforme se acercan a la cúspide de la superficie.

Una vez que se optimizó el medio, se corrió un experimento complementario en el que se comparó el perfil de la fermentación entre el medio original y el medio optimizado. Como se muestra en la Figura 33, con el medio original se obtuvo un título promedio de 280 mg/l, mientras que con el medio optimizado el título fue de 421 mg/l, lo que corresponde a un incremento del 52%. En ambos casos, la máxima producción se alcanzó a los tres días. En relación al crecimiento, se observó un incremento de aproximadamente 10%, que corresponde a un incremento en la producción específica de 32% (Tabla 23). La velocidad específica de crecimiento aumentó en 47%. El perfil de pH sí se modificó sustancialmente por el incremento en la concentración de glucosa, ya que durante la fermentación presentó valores más bajos que los obtenidos con el medio sin optimizar.

Aunque poco se sabe de los procedimientos estadísticos utilizados en la industria para la optimización de un proceso, existen antecedentes de que la metodología de superficie de respuesta es una herramienta de gran utilidad, ya que con un poco de conocimientos estadísticos y sentido común es posible obtener en un tiempo relativamente corto, las condiciones que maximizan una respuesta.

La apreciación visual del comportamiento de las variables que permite el método, ayuda al experimentador a no perderse

TABLA 22

MODIFICACION DE LA CONCENTRACION DE LOS
INGREDIENTES EN EL MEDIO OPTIMIZADO

INGREDIENTE (%)	MEDIO ORIGINAL	MEDIO OPTIMIZADO
Glucosa	1.0	2.30
Levadura de cerveza autolisada	2.5	2.69
NaCl	1.0	0.80
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1

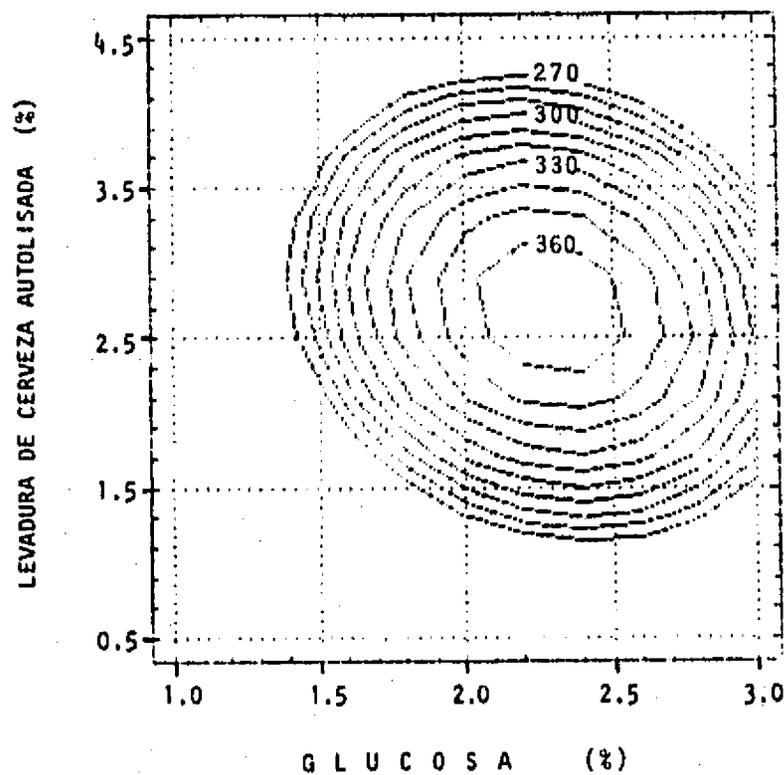
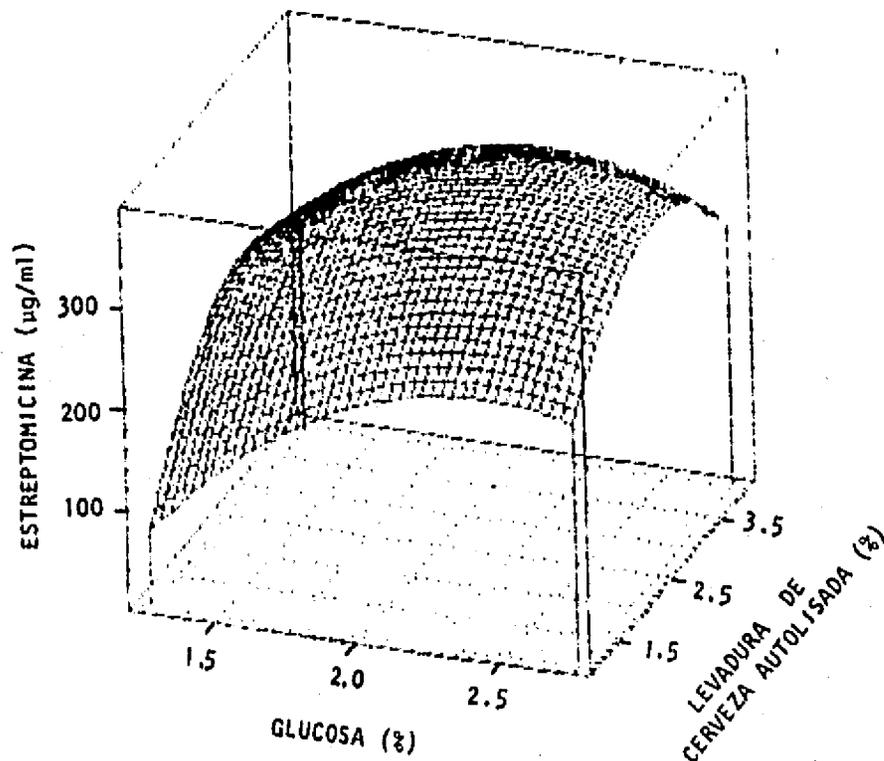


Fig. 30. Superficie de respuesta y gráfica de contornos de la producción de estreptomicina en función de la concentración de glucosa y levadura de cerveza autolisada, obtenidas durante la optimización del medio de cultivo.

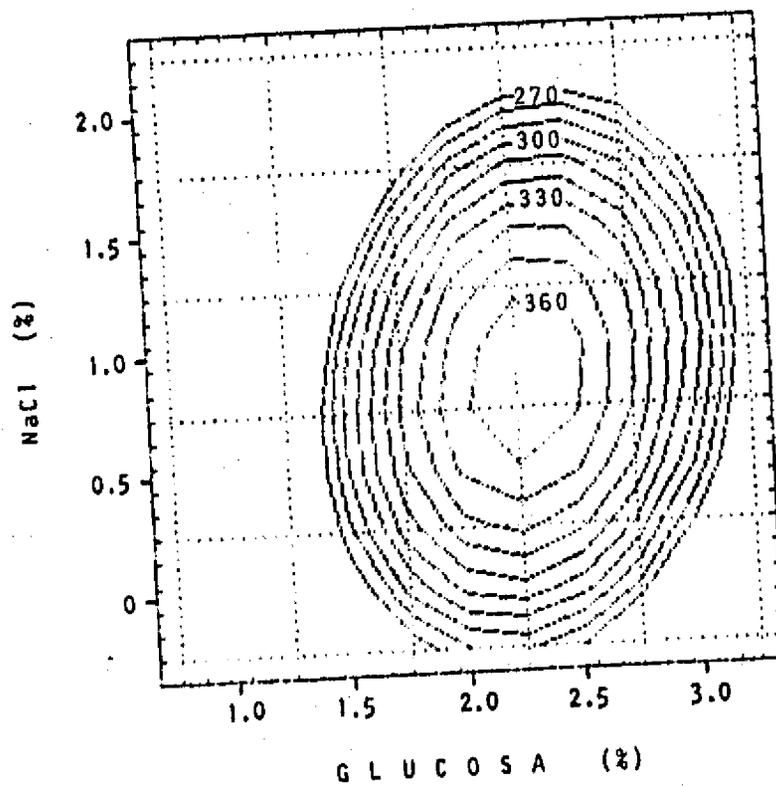
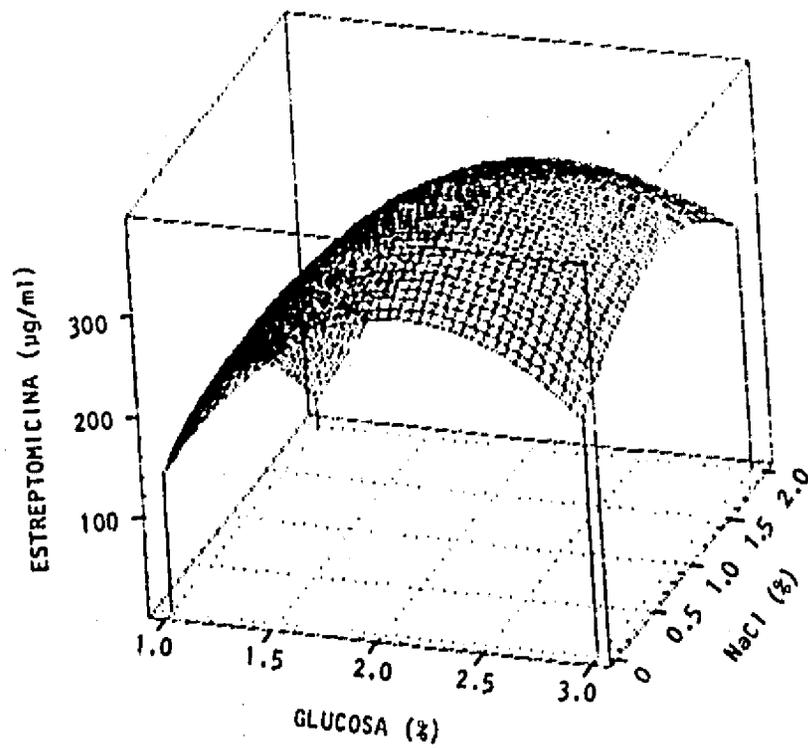


Fig. 31. Superficie de respuesta y gráfica de contornos de la producción de estreptomina en función de la concentración de glucosa y cloruro de sodio, obtenidas durante la optimización del medio de cultivo.

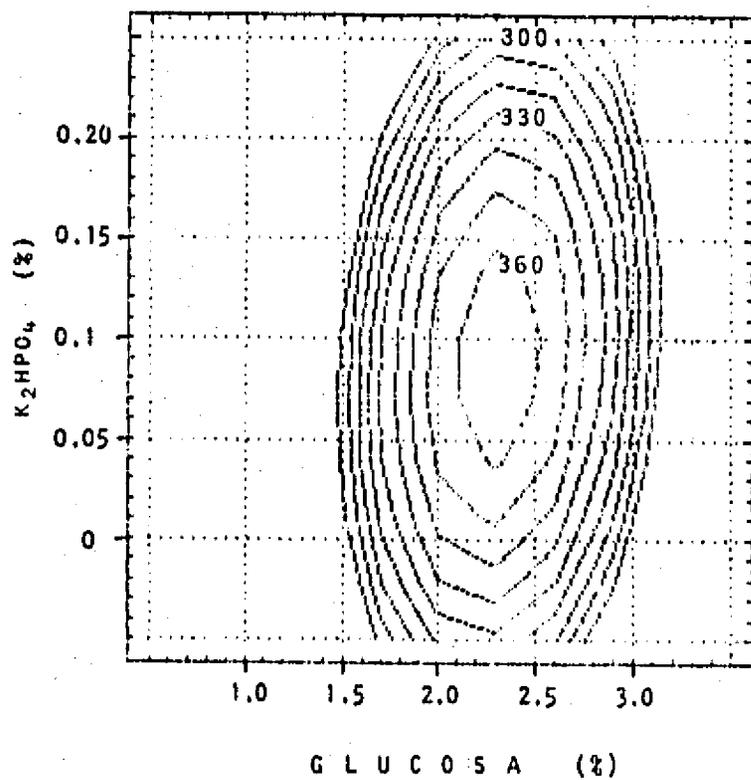
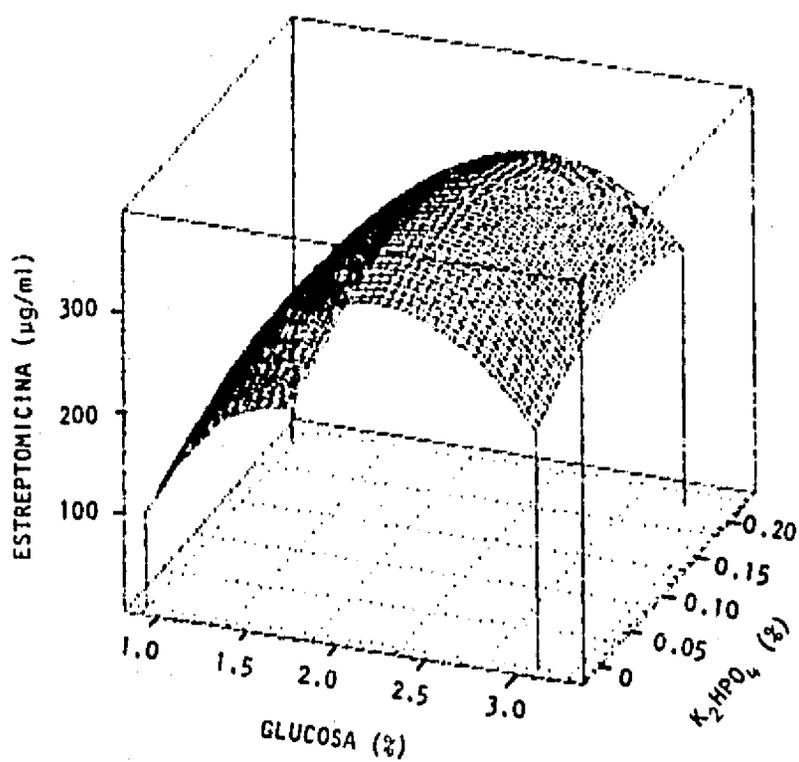


Fig. 32. Superficie de respuesta y gráfica de contornos de la producción de estreptomina en función de la concentración de glucosa y fosfato dibásico de potasio, obtenidas durante la optimización del medio de cultivo.

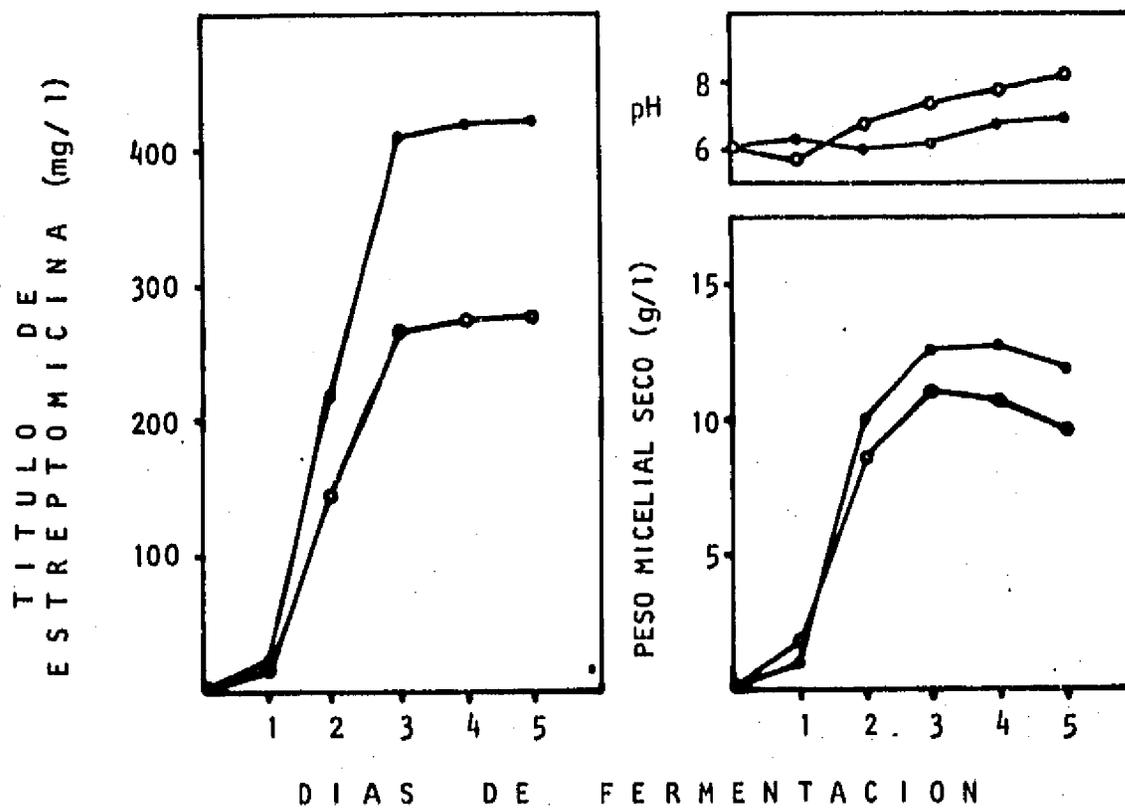


Fig. 33. Comparación del perfil de producción de estreptomicina de *S. griseus* ATCC 12475 en matraces, utilizando el medio, antes de optimizar (○) y en el medio optimizado (●).

TABLA 23

COMPARACION DE LA FERMENTACION DE ESTREPTOMICINA
UTILIZANDO LOS MEDIOS ORIGINAL Y OPTIMIZADO

PARAMETRO	MEDIO ORIGINAL	MEDIO OPTIMIZADO
Título de estreptomicina (mg/l)	280 ± 15.04	421 ± 19.31
Peso seco micelial (g/l)	11.0	12.5
Producción específica (mg/g cels)	25.45	33.68
Velocidad específica de crecimiento (μ_{max} , h ⁻¹)	0.065	0.096
Productividad volumétrica (mg/l x h)	3.89	5.85
Productividad específica (mg/g cel x h)	0.35	0.47

entre tratamientos estadísticos, difíciles de comprender para quien carece de experiencia. Las características de la metodología de superficie de respuesta, hacen atractivo su empleo en el área biotecnológica, en la que siempre se buscan las condiciones óptimas de operación. Lo recomendable es tener conocimientos previos del proceso en estudio y seleccionar el conjunto de variables que van a ser optimizadas.

5. ESCALAMIENTO Y OPTIMIZACION DEL PROCESO A NIVEL DE FERMENTADORES DE 14 LITROS

5.1 Desarrollo del inóculo micelial

Cuando se trabaja a nivel de fermentadores, el obtener grandes cantidades de esporas que sirvan como inóculo es una actividad muy laboriosa. Por tanto es necesario desarrollar una metodología sencilla y que consuma el menor tiempo posible, para obtener un inóculo micelial, que sea representativa de la manera como esto se hace en la práctica industrial.

Dos aspectos deben ser establecidos en cada proceso específico para obtener un inóculo, estos son la edad y el porcentaje del volumen en relación al cultivo de producción. La edad es importante porque se debe definir el estado fisiológico en el que las células están más activas para desarrollarse y producir el metabolito de interés, generalmente esto sucede durante la fase exponencial. En cuanto al porcentaje de inóculo, comunmente se recomienda que sea del 10% para con esto disminuir la fase de adaptación y permitir que en un tiempo corto se alcance el final de la fermentación. No obstante, al trabajar en planta piloto o a escala comercial, es común utilizar inóculos menores al 10%, para no elevar los costos de materias primas y de labor.

En la producción de antibióticos se presenta una situación adicional que es la concentración del antibiótico en el inóculo. Si esta concentración es alta, podría ejercer un efecto negativo sobre el crecimiento del cultivo y por lo tanto sobre la producción del mismo antibiótico. Dado que la concentración del antibiótico en el inóculo es función de la edad y del porcentaje, la combinación de estos dos factores debe ser establecida para asegurar el éxito de cualquier proceso.

Con base en lo establecido se consideró conveniente estudiar el efecto de la edad y el porcentaje del inóculo micelial sobre la producción de estreptomina en matraces agitados. Esta sería la primera etapa del desarrollo de la metodología para obtener el inóculo de fermentadores de 14 litros. Para llevar a cabo el experimento se tomó como base lo reportado por Shirato y col. (1961), quienes mencionan haber alcanzado los más altos rendimientos de estreptomina al emplear como inóculo un cultivo en fase exponencial.

De acuerdo con el perfil de crecimiento observado en experimentos anteriores (Fig. 13) se decidió probar cultivos con tres diferentes edades, a las 36 h al inicio de la fase exponencial, a las 48 h en pleno crecimiento exponencial y a las 60 h cerca de la fase estacionaria. En cada una de estas edades se probaron 3 proporciones 2, 6 y 10%. El medio de cultivo empleado para el inóculo tenía la misma formulación que el de producción, esperando con esto minimizar la fase de adaptación del microorganismo. En la Tabla 24 se presentan las características de los cultivos miceliales que sirvieron como inóculo.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 34 indicaron que en las tres proporciones empleadas 2, 6 y 10%, la edad más apropiada fue 48 horas. De acuerdo a la Tabla 24 el inóculo contenía un título de estreptomina de 196 mg/l, el 52% de la glucosa residual y su peso micelial fue de 7.61 g/l. Al parecer con este inóculo, el antibiótico se empezó a producir al poco tiempo de que se inició la fermentación lo que permitió alcanzar el máximo título de antibiótico, de 405 mg/l, en 2 días. Al utilizar el inóculo de 36 h, el cual contenía 20 mg/l de estreptomina y estaba en fase de crecimiento exponencial, se observó una producción de antibiótico más lenta en comparación con lo observado con el inóculo de 48 h, el máximo título del antibiótico se alcanzó entre los 3 y 4 días de incubación. Con el inóculo de 60 horas, también se observó un retraso en la producción del antibiótico ya que el máximo título se alcanzó hasta los cuatro días, posiblemente el contenido de estreptomina (396 mg/l) o el hecho de que el cultivo estaba cerca de la fase estacionaria provocó este retraso.

En relación al porcentaje de inóculo, se observó prácticamente el mismo perfil de producción con 2, 6 y 10% en las 3 edades probadas. Estos resultados sugirieron la conveniencia de utilizar un inóculo de 48 h a un porcentaje de 2, que fue el más bajo entre los probados, lo que permite un ahorro en el proceso, principalmente en lo que se refiere a materias primas.

La segunda etapa del desarrollo del inóculo se llevó a cabo en un fermentador de 2 litros, para determinar la edad en la que se debe cosechar el inóculo a utilizar en los fermentadores de 14 litros. Después de realizar varias pruebas a diferentes condiciones de agitación y aeración en el fermentador de 2

TABLA 24

CARACTERISTICAS DEL CULTIVO MICELIAL UTILIZADO COMO INOCULO PARA LA
 PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA A NIVEL DE MATRAZ

EDAD (h)	TITULO DE ESTREPTOMICINA (mg/l)	PESO MICELIAL SECO (g/l)	GLUCOSA RESIDUAL (g/l)
36	20	4.73	14.10
48	196	7.61	10.98
60	376	10.36	7.90

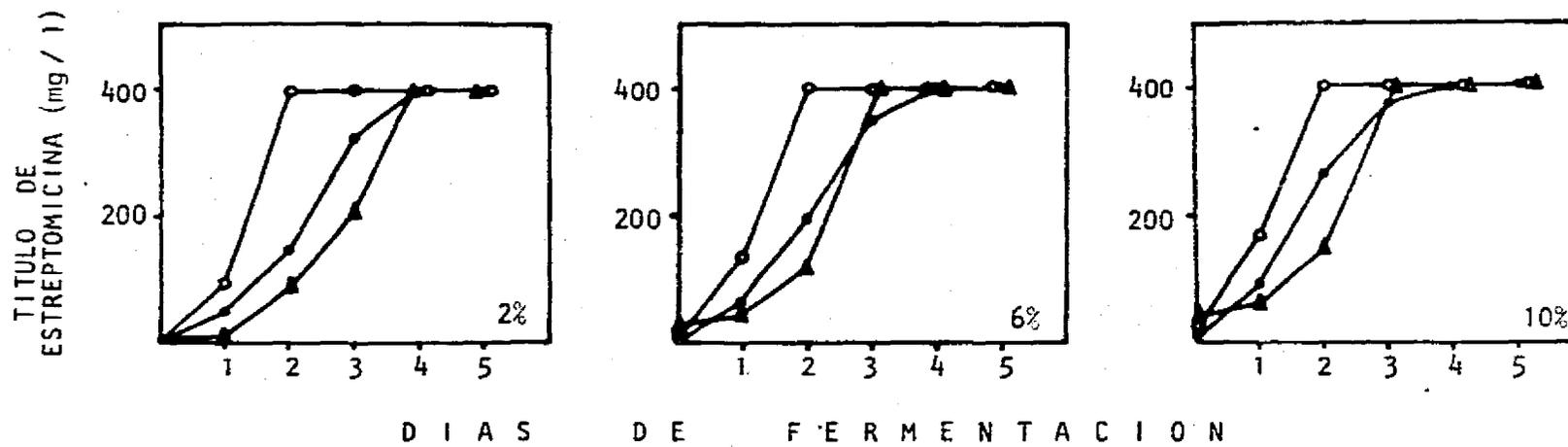


Fig. 34. Efecto de la edad y proporción del inóculo sobre la producción de estreptomina. El cultivo micelial utilizado como inóculo se obtuvo de matraces incubados durante 36 h (●); 48 h (○) y 60 h (Δ). En cada cuadro se indica la proporción de inóculo empleada, 2, 6 y 10% (v/v).

litros, se decidió cultivar al microorganismo a 625 rpm y 1.4 litros de aire/min (1vvm), lo que dió un coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$), de 120 h^{-1} . El porcentaje de inóculo utilizado fue del 2, con base en los resultados obtenidos en la primera etapa.

En la Figura 35 se presenta el perfil del cultivo obtenido en el fermentador de 2 litros. De este cultivo se tomaron 200 ml de cultivo a tres diferentes edades 12, 24 y 36 horas, los cuales se inocularon a fermentadores de 14 litros (los tiempos se indican con flechas). Las corridas de fermentación a nivel de 14 litros, se llevaron a cabo a una velocidad de agitación de 625 rpm y un flujo de aire de 10 l/min (1 vvm), lo que da un valor de $k_L a$ de 149 h^{-1} .

Como se muestra en la Figura 36, con el inóculo de 12 horas se observó un retraso en la producción de estreptomicina, ya que el máximo título se alcanzó entre los 4 y 5 días de fermentación. El perfil de producción al utilizar el inóculo de 36 horas fue muy similar al observado con el de 24 horas. Estos resultados sugirieron la conveniencia de utilizar un cultivo con 24 horas de crecimiento para la segunda etapa de inoculación, con el fin de obtener el inóculo y el máximo título del antibiótico en el menor tiempo posible.

De acuerdo a lo anterior, el procedimiento de preparación del inóculo para los fermentadores de 14 litros, se resume en la Figura 37. Se preparó en dos etapas, 48 horas para la primera y 24 horas para la segunda. Las edades de cultivo seleccionadas en el presente estudio para la obtención del inóculo en dos etapas, coinciden con las establecidas por Dulaney (1951), Shirato y Motoyama (1966) y Singh y col. (1976).

5.2 Uso de antiespumante en la fermentación

Para realizar las corridas en el fermentador, se requirió adicionar antiespumante al medio de cultivo, ya que la levadura ocasiona la formación de espuma. Se probaron los productos Mazu-DF-7940 y Mazu-DF-7911, cuyo contenido de tensoactivo es el mismo, pero el segundo contiene además aceite de soya y un dispersante. Las observaciones realizadas indicaron que el Mazu-DF-7911 fue más eficiente para evitar la formación de espuma.

La concentración de antiespumante que inicialmente se probó fue de 0.2% (v/v). En experimentos posteriores se observó que un 0.1% (v/v) adicionado durante la preparación del medio fue suficiente para evitar la formación de espuma durante el tiempo que dura la fermentación. A nivel de matraces, se comprobó que el

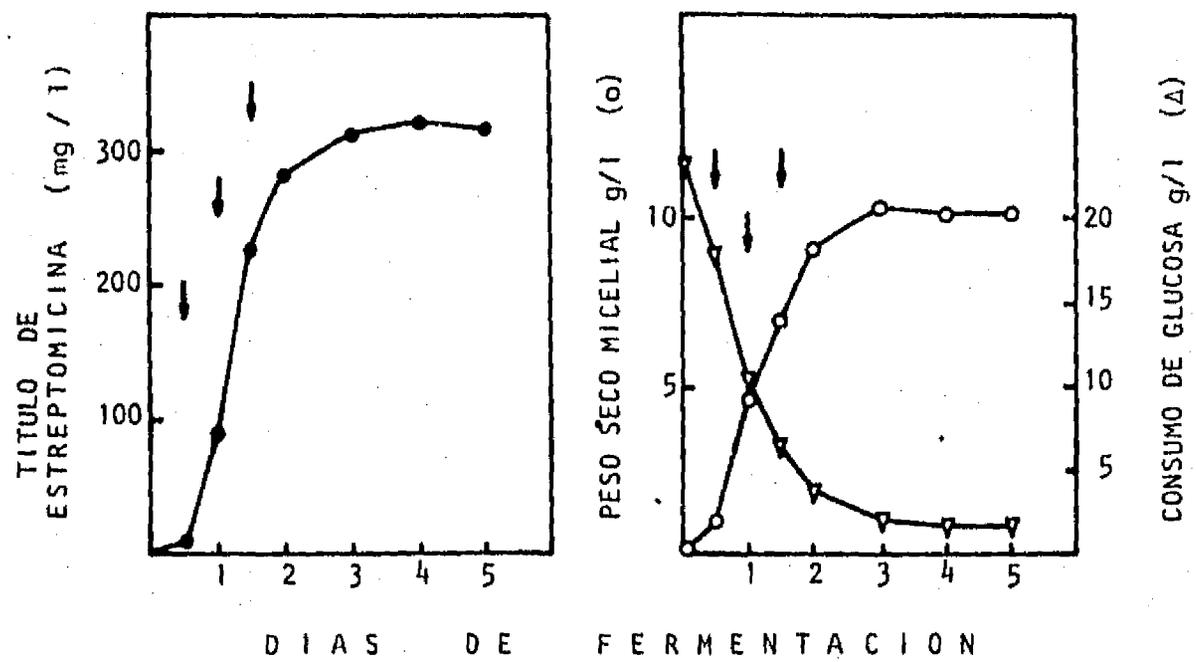


Fig. 35. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC en fermentador de 2 l. Las flechas indican los tiempos a los que fueron cosechados cada uno de los inóculos evaluados en fermentadores de 14 l.

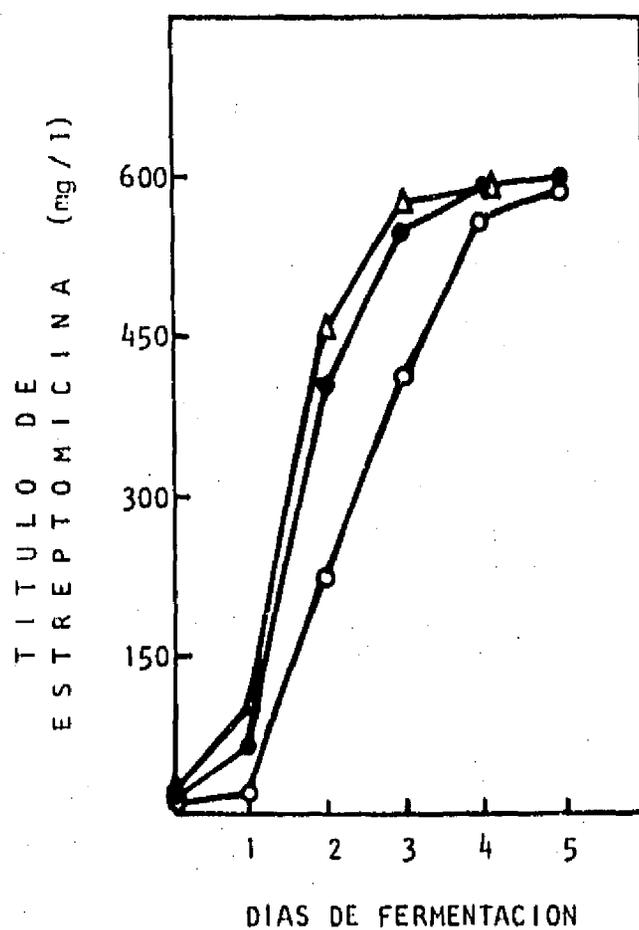
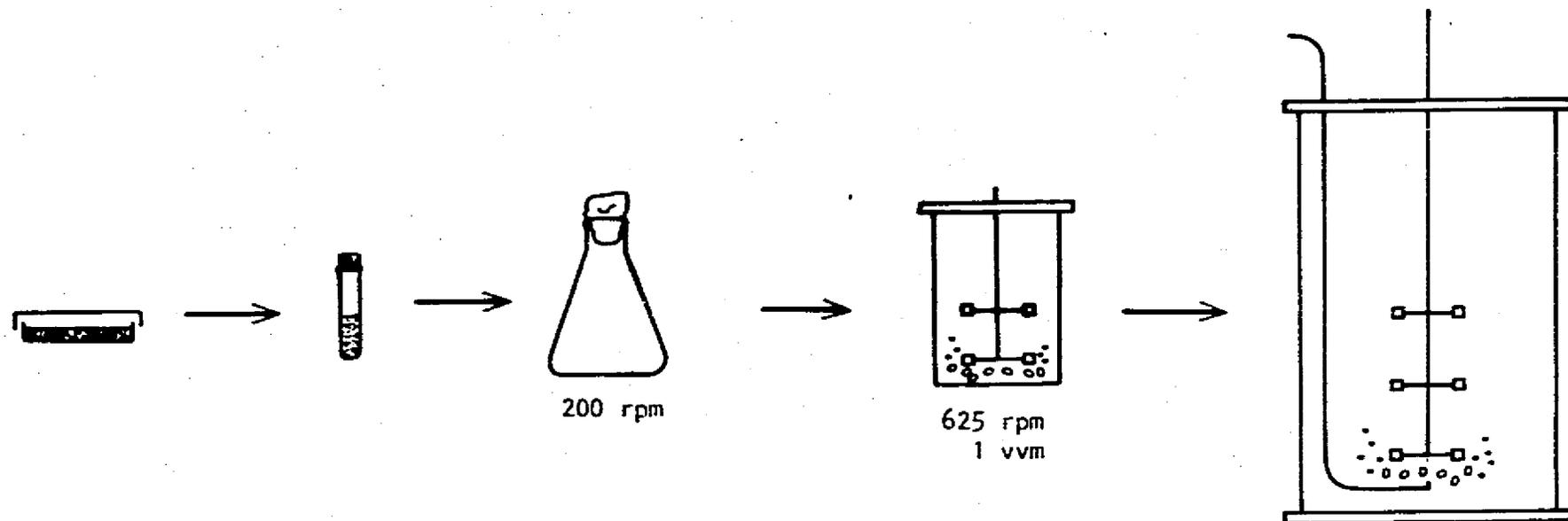


Fig. 36. Efecto de la edad del inóculo sobre la producción de estreptomina por *S. griseus* ATCC 12475, en fermentadores de 14 l a 625 rpm y flujo de aire de 10 l/min. Los inóculos con edades de 12 h (o), 24 h (●) y 36 h (Δ) fueron obtenidos en un fermentador de 2 l.



Propagación de esporas	Suspensión de esporas	Cultivo micelial 1a ETAPA	Cultivo micelial 2a ETAPA	CULTIVO DE PRODUCCION
7 días		48 horas	24 horas	
cajas Petri		matraces 250 ml	fermentador de 2 l.	
PREPARACION DEL INOCULO			fermentador de 14 l.	

Fig. 37. Preparación del inóculo para la producción de estreptomina por *S. griseus* ATCC 12475 en fermentadores de 14 litros.

antiespumante no presentó efecto negativo sobre la producción de estreptomina.

Por los resultados observados, se decidió incluir el antiespumante MAZU-DF-7911 a una concentración de 0.1% (v/v), para todas las corridas en el fermentador.

5.3 Efecto de la agitación y la aeración

El efecto de la agitación y la aeración sobre la producción de estreptomina en fermentadores ha sido estudiado por algunos autores. La combinación de estas dos variables determina la capacidad de transferencia de oxígeno de un sistema y por consecuencia afecta los títulos de producción del antibiótico. Kempf y Sayles (1946) encontraron que al incrementar la velocidad de aeración de 1 a 2 vvm, el título de estreptomina se incrementó de 50 a 75 mg/l. Dulaney (1951) encontró que al duplicar el consumo de potencia por unidad de volumen (P_g/V) en fermentadores de 5 litros, el título de producción se incrementó en un 24%. Por otro lado, Karow y col. (1953) encontraron que al duplicar P_g/V en fermentadores de 5 litros, el título del estreptomina se incrementó 5 veces, mientras que en fermentadores de 56,000 litros el título se duplicó.

Estos antecedentes sirvieron como base para estudiar el efecto de la agitación y la aeración sobre la producción de estreptomina, con el fin de determinar las condiciones de operación óptimas en los fermentadores de 14 litros. Estas corridas se llevaron a cabo utilizando el medio 14, en virtud de que esta parte del trabajo se inició antes de tener el medio optimizado. De las fermentaciones realizadas, se observó que a velocidades de agitación de 100, 180, 250 y 325 rpm y un flujo de aire de 10 l/min (1 vvm) el crecimiento fue escaso y la producción del antibiótico fue nula. El pH tendió a disminuir, lo que indicó un bajo nivel de oxigenación de acuerdo a Hockenhull (1954, 1960) y Demain e Inamine (1970). En otros experimentos realizados a 400, 475, 550 y 625 rpm y una aeración de 1 vvm, sí se observó crecimiento y producción de antibiótico. El mismo comportamiento fue observado por Singh y col. (1976) quienes al cultivar la cepa de S. griseus DTH-2 en un fermentador de 5 litros, detectaron crecimiento y títulos de estreptomina solamente a velocidades de agitación mayores a 400 rpm.

Durante el desarrollo de las fermentaciones se observó una disminución en el flujo de aire, ocasionado por el taponamiento del orificio del difusor, lo cual no permitió llevar las corridas a buen término. El problema se solucionó aumentando la presión

del aire de 98 a 196 kPa (esto es, de 1 a 2 kg/cm²), sin modificar la velocidad de aeración.

Posteriormente se corrieron fermentaciones para comparar los títulos de producción alcanzados con los medios sin optimizar y optimizado. Las fermentaciones se corrieron a 625 rpm y 1 vvm. Los resultados mostrados en la Figura 38, indicaron que con el medio optimizado se obtuvo un título de 675 mg/l, que corresponde a un incremento del 60%, en relación al título alcanzado con el medio antes de optimizar que fue de 420 mg/l. En la misma figura se observa que la producción con el medio optimizado se inició desde las 24 horas, la máxima velocidad se tuvo entre las 24 y 48 horas, alcanzándose el máximo título entre el tercero y cuarto día. Los perfiles de pH durante la fermentación sí presentaron diferencias. Con el medio optimizado bajó ligeramente a los 2 días, incrementándose nuevamente a los 4 días. Con el medio sin optimizar el pH mostró una tendencia a incrementarse desde el primer día, alcanzando valores de 8.0 a los 2 días, cuando casi había terminado la fermentación. La velocidad de consumo de glucosa fue similar en ambos casos, agotándose la fuente de carbono a los dos días para el medio sin optimizar y a los cuatro, para el medio optimizado. En relación al crecimiento, se observó un incremento del 20% con el medio optimizado. El incremento en el título de producción específica fue de 22%.

Con los resultados obtenidos se estableció el intervalo de exploración para evaluar el efecto de la aeración y la agitación sobre la producción de estreptomina con el medio optimizado. Utilizando nuevamente la metodología de superficie de respuesta, se planteó un diseño experimental ortogonal para modelos de primer orden. El procedimiento que se siguió fue similar al que se utilizó durante la optimización del medio. Se consideraron dos variables: velocidad de agitación (x_1) y velocidad de aeración (x_2), las cuales fueron evaluadas a dos niveles uno bajo (-1) y otro alto (+1). Esto dió $2^2 = 4$ combinaciones. Además se incluyeron seis puntos centrales, lo que hizo un total de 10 observaciones. La codificación de los niveles de las variables se presenta en la Tabla 25. El nivel mínimo de agitación (475 rpm) se estableció con base en los resultados obtenidos previamente, el máximo (625 rpm) fue definido en función del límite de operación del equipo utilizado.

Las fermentaciones fueron llevadas a las condiciones de oxigenación establecidas de acuerdo al diseño experimental que se presenta en la Tabla 26. Los títulos de estreptomina alcanzados a los 5 días de fermentación, se presentan en la Tabla 27, así como los coeficientes de transferencia de oxígeno obtenidos ($(k_{La})_{agua}$) y las velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) calculadas a partir de los valores de $(k_{La})_{agua}$.

Los títulos de antibiótico que corresponden al punto central del experimento (550 rpm y 1 vvm), sirvieron para evaluar la variabilidad del proceso fermentativo. En promedio se obtuvo un

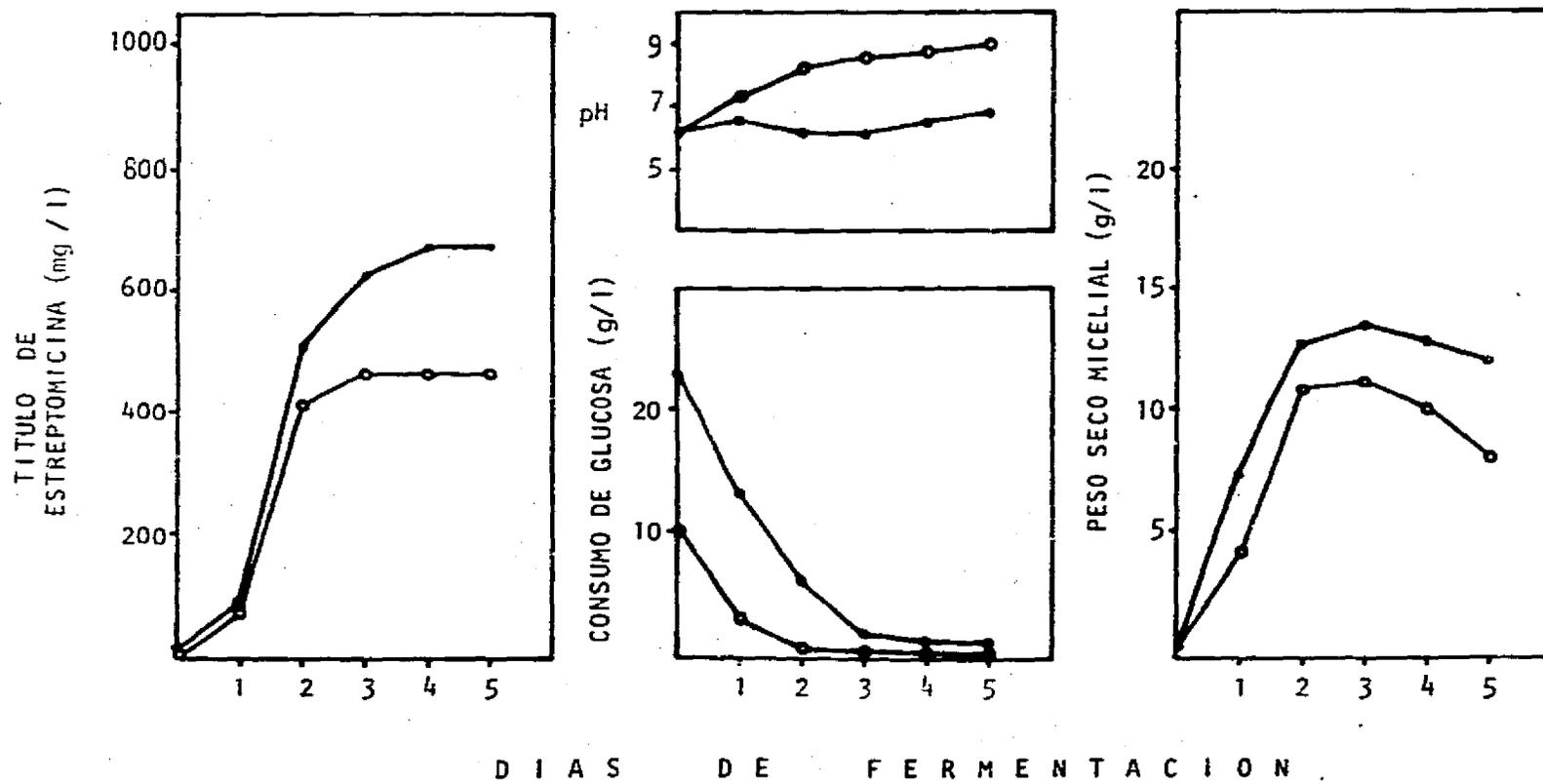


Fig. 38. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en fermentador de 14 l utilizando el medio sin optimizar (o) y optimizado (●) a 625 rpm y 10 l aire/min, a través de un difusor de orificio.

TABLA 25

NIVELES DE AGITACION Y AERACION UTILIZADOS PARA EVALUAR LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA EN FERMENTADORES DE 14 ℓ

NIVEL	AGITACION (x_1 ; rpm)	AERACION (x_2 ; vvm)
-1	475	0.5
0	550	1.0
+1	625	1.5

TABLA 26

DISEÑO EXPERIMENTAL ORTOGONAL
 PARA EVALUAR EL EFECTO DE LA AGITACION Y LA AERACION
 SOBRE LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

No. OBSERVACION	AGITACION (x_1)	AERACION (x_2)
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

TABLA 27

PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA EN FERMENTADORES DE 14 l
A DIFERENTES NIVELES DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO

No. OBSERVACION	$k_L a^1$ (h^{-1})	$VT O^2$ mmoles O_2/lxh	TITULO DE ESTREPTOMICINA (mg/l)
1	93.98	19.83	180
2	122.25	25.80	360
3	132.55	27.97	530
4	166.13	35.05	750
5	144.21	30.46	630
6	144.21	30.46	590
7	144.21	30.46	560
8	144.21	30.46	600
9	144.21	30.46	650
10	144.21	30.46	550

¹ coeficiente de transferencia de oxígeno determinado en agua.

² velocidad de transferencia de oxígeno, calculada a partir de los valores de $k_L a$ y asumiendo que $c_L = 0$.

título de 596 ± 38.8 mg/l, lo que corresponde a un coeficiente de variabilidad de 6.51%. Este valor es menor al obtenido a nivel de matraces que fue de 10.94% (Tabla 7), por lo que el resultado es bastante aceptable considerando que cada corrida de fermentación es un experimento independiente aunque las corridas se realicen simultáneamente. De acuerdo a Bartholomew y col. (1950c), posiblemente esta baja variabilidad se deba a que en los fermentadores se tiene un mejor control de las condiciones de operación, en comparación con el que se observa en matraces.

Los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno obtenidos a las diferentes condiciones de agitación y aeración (Tabla 27), fueron ajustados a un modelo de regresión múltiple para dos variables de acuerdo a la expresión:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3)$$

donde \hat{y} = coeficiente de transferencia de oxígeno estimado
 b_0 = constante
 b_i = coeficientes de cada término
 x_i = variables

El ajuste se realizó mediante el paquete estadístico Statgraphics (1987), con el fin de generar la superficie de respuesta que se presenta en la Figura 39. Como era de esperarse, a medida que se incrementó la velocidad de agitación de 475 a 625 rpm se observó un mayor incremento en el coeficiente de transferencia de oxígeno, comparado con el obtenido al aumentar la velocidad de aeración. Este comportamiento se debe a que cuando en un fermentador se aumenta la velocidad de agitación, los impulsores rompen las burbujas haciéndolas más pequeñas lo que aumenta el área superficial, al mismo tiempo hay una mejor distribución de las burbujas en el caldo que ocasiona un aumento en el tiempo de residencia de las mismas, esto hace que la transferencia de oxígeno se vea favorecida notablemente. En cambio, un aumento en la velocidad de aeración hace que haya más aire en el sistema por el aumento en el número de burbujas, pero como no hay una buena distribución, éstas tienden a coalescer y a salir del reactor por lo que el tiempo de residencia casi no aumenta. Consecuentemente el incremento en la transferencia de oxígeno, no es muy notable.

De la misma manera, los títulos de estreptomicina obtenidos (Tabla 27) se ajustaron a un modelo de regresión lineal múltiple, con la cual se generó la superficie de respuesta presentada en la Figura 40. El perfil observado fue similar al que se describió en la Figura 39, el título de estreptomicina aumentó de manera más notoria cuando se incrementó la velocidad de agitación y muy poco con el aumento de la velocidad de aeración.

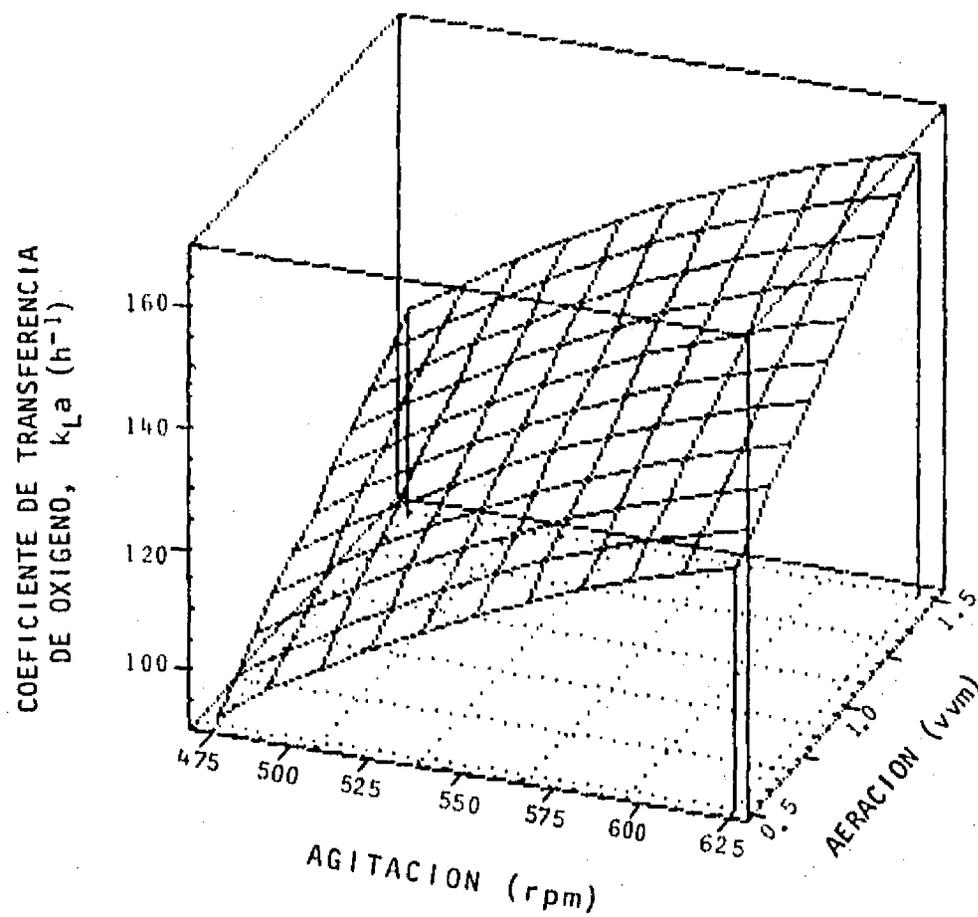


Fig. 39. Superficie de respuesta al interaccionar velocidad de agitación y velocidad de aeración, para evaluar el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) en fermentadores de 14 l, con difusor de un solo orificio.

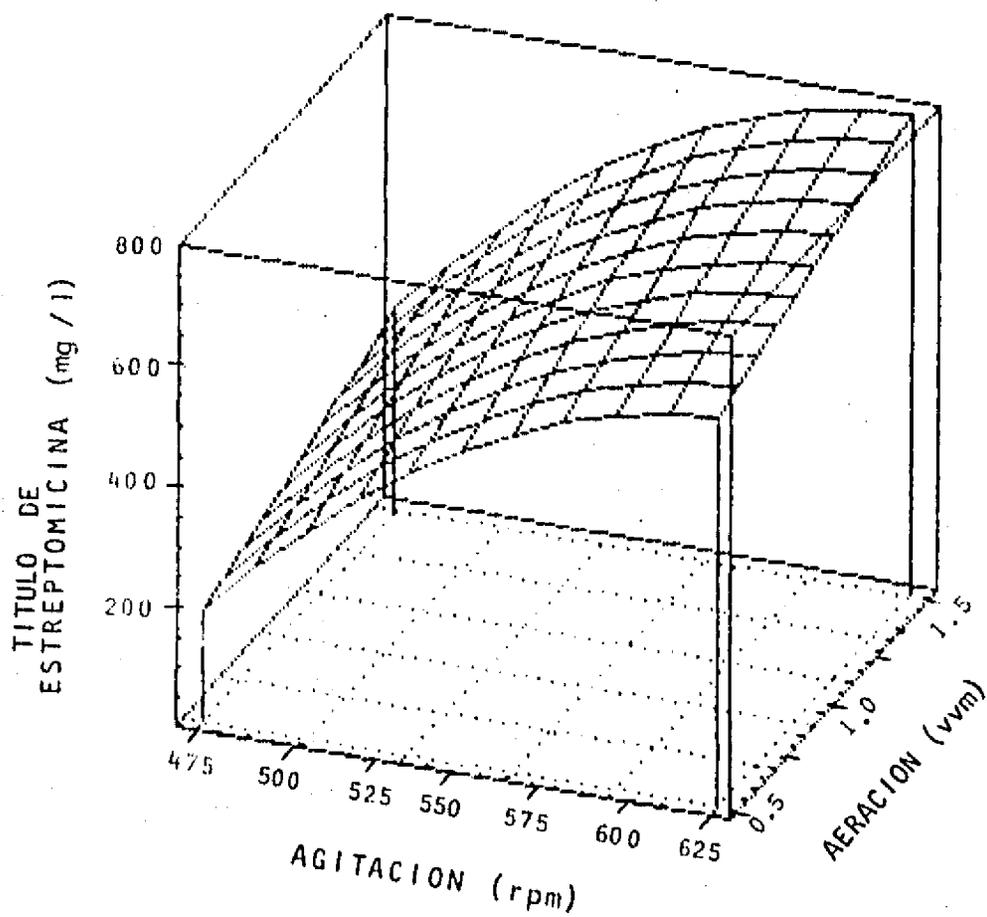


Fig. 40. Superficie de respuesta al interaccionar velocidad de agitación y velocidad de aeración, para evaluar la producción de estreptomina en fermentadores de 14 l con difusor de un solo orificio.

Dado que los resultados obtenidos confirman que la producción de estreptomicina está íntimamente relacionada con la capacidad de oxigenación del sistema, se construyó la gráfica que se presenta en la Figura 41 para determinar el tipo de correlación que existe entre estos dos parámetros. Al ajustar los datos experimentales mediante una regresión lineal, se obtuvo el siguiente modelo matemático:

$$EM = 8.14 (k_{La})_{\text{agua}} - 590.25 \quad (4)$$

donde EM = título de estreptomicina, expresado en mg/l,
 $(k_{La})_{\text{agua}}$ = coeficiente de transferencia de oxígeno en agua, expresado en h^{-1} .

El análisis de varianza correspondiente se presenta en la Tabla 28. El coeficiente de determinación obtenido al ajustar el modelo fue 0.979.

Con el fin de obtener una correlación que expresara el efecto conjunto de las velocidades de agitación y aeración sobre la producción de estreptomicina, se buscó primero la manera de relacionar estas dos variables con el coeficiente de transferencia de oxígeno.

Quintero (1981) resume varias correlaciones reportadas por otros autores en las que el k_{La} se expresa en términos de variables que pueden ser medidas durante un proceso fermentativo. De éstas, las más empleadas son las que se expresan en función del consumo de potencia por unidad de volumen (P_g/V) y la velocidad superficial del aire (V_s) de la siguiente manera:

$$k_{La} = K (P_g/V)^\alpha (V_s)^\beta \quad (5)$$

donde los valores de los parámetros K, α y β dependen de las características del reactor, así como de la técnica de determinación del k_{La} .

A su vez, la potencia en un sistema aereado (P_g) puede ser expresada en función de otras variables de acuerdo a la correlación:

$$P_g = C (P_o^2 N D_i^3 / Q^{0.56})^{0.45} \quad (6)$$

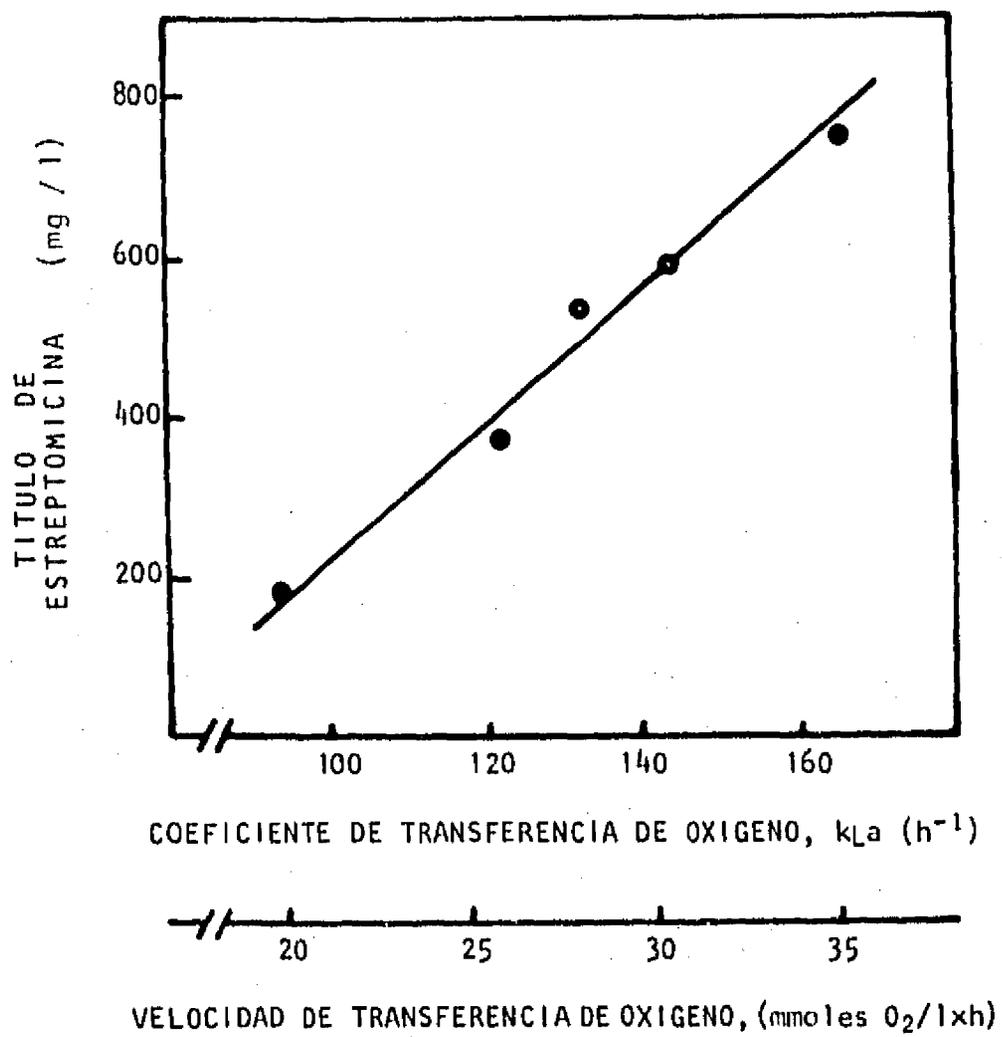


Fig. 41. Efecto de la transferencia de oxígeno, sobre la producción de estreptomina en fermentadores de 14 litros con difusor de un solo orificio.

Tabla 28

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS MODELOS AJUSTADOS

1) Estreptomicina en función de $k_L a$

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	1	189363.30	189363.30	139.7
Error	3	4067.90	1355.97	
Total	4	193431.20		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9790$

2) $k_L a$ en función de N y Vs

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	3	89642.25	29880.75	596.10
Error	2	100.25	50.13	
Total	5	89742.51		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9649$

donde P_o es la potencia consumida por la agitación en un fluido no aereado en kg/m-seg, N es la velocidad de agitación en seg^{-1} , D_i es el diámetro del impulsor en m, Q la velocidad de flujo de aire en m/seg y C es una constante que está en función de la geometría del reactor.

Adicionalmente, la potencia consumida por la agitación en un fluido (P_o) también puede ser expresada en términos de variables de más fácil medición, por medio de la correlación:

$$P_o = \frac{N_p N^3 D_i^5 \rho}{g_c} \quad (7)$$

donde N_p es el número de potencia, D_i es el diámetro del impulsor en m, ρ es la densidad del caldo en kg/m^3 y g_c es el factor de conversión de la ley de Newton en m/seg.

Para hacer uso de estas expresiones se puede asumir que N_p , D_i y ρ permanecen constantes durante las fermentaciones. Por tanto la ecuación (7) se reduce a:

$$P_o = f(N^3) \quad (8)$$

la ecuación (6) también se puede reducir a:

$$P_g = f(P_o) \quad (9)$$

y finalmente de las ecuaciones (8) y (9) se asume que:

$$P_g = f(N^3) \quad (10)$$

Ya que en este trabajo no fue posible medir el consumo de potencia, con base en la ecuación (10) se decidió utilizar la velocidad de agitación (N) como la variable representativa del consumo de potencia. De esta manera se estableció una relación, parecida a la ecuación (5), para expresar el coeficiente de transferencia de oxígeno en términos de las velocidades de agitación y aeración conjuntamente, de la siguiente manera:

$$(k_{La})_{\text{agua}} = K' (N^3)^{\alpha'} (Vs)^{\beta'} \quad (11)$$

donde los valores K' , α' y β' pueden ser determinados mediante una regresión no lineal. Debe recordarse nuevamente que los valores del $(k_{La})_{\text{agua}}$ fueron determinados en agua a las mismas condiciones de agitación y aeración que se realizaron las corridas de fermentación.

Tomando como base la ecuación (11), los datos experimentales obtenidos al utilizar el difusor de un solo orificio se ajustaron a una regresión no lineal mediante el paquete estadístico Statgraphics (1987). El modelo matemático obtenido fue el siguiente:

$$(k_{La})_{\text{agua}} = 17.75 (N^3)^{0.326} V_s^{0.084} \quad (12)$$

donde N está expresada en seg^{-1} , V_s en cm/seg y $(k_{La})_{\text{agua}}$ en h^{-1} . El análisis de varianza del modelo ajustado se presenta en la Tabla 28, el coeficiente de determinación obtenido fue 0.9649. La representación gráfica de este modelo se presenta en la Figura 42.

Sustituyendo la ecuación (12) en la (4) se tiene una expresión que permite expresar la producción de estreptomycin en función de las velocidades de agitación y de aeración, como se había estado buscando:

$$EM = 144.49 (N^3)^{0.326} V_s^{0.084} - 590.25 \quad (13)$$

Hasta la fecha no se ha reportado en la literatura algún modelo matemático que exprese conjuntamente el efecto de la agitación y aeración, sobre el proceso. El modelo obtenido empíricamente tiene la ventaja de estar expresado en términos de variables independientes las cuales son ajustadas al inicio de una fermentación. La magnitud de los exponentes reflejan que la velocidad de agitación tiene una influencia más marcada sobre la fermentación, que la velocidad de aeración.

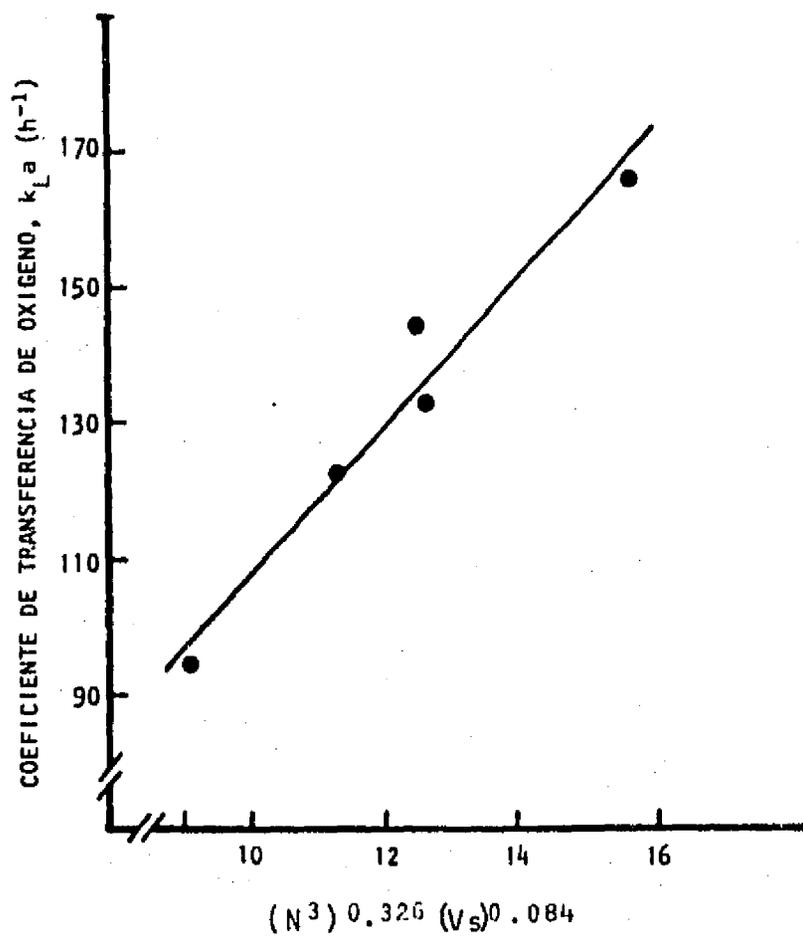


Fig. 42. Efecto conjunto de las velocidades de agitación (N) y de aeración (Vs) sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) en fermentadores de 14 litros con difusor de un solo orificio.

5.4 Empleo de diferentes tipos de difusores

Bartholomew y col. (1950b) observaron un incremento en el coeficiente de transferencia de oxígeno al emplear un difusor de placa porosa en lugar de uno que tenía un solo orificio. Esto se debe a que la placa porosa permite la salida de un mayor número de burbujas, que generalmente son de un diámetro menor al que se observa cuando se utilizan difusores de un solo orificio, lo que se traduce en un aumento del área superficial de las burbujas y consecuentemente en la capacidad de transferencia de oxígeno.

Con base en este antecedente y con la intención de incrementar la transferencia de oxígeno en los fermentadores empleados, se diseñaron y construyeron expresamente otros dos tipos de difusores, uno de anillo y el otro de placa porosa. Este tipo de difusores al tener más orificios permiten un aumento en el número de burbujas que se suministran al sistema. Adicionalmente, el difusor de placa porosa tiene la peculiaridad de formar burbujas de menor tamaño en comparación con los otros dos tipos de difusores.

El difusor de anillo tiene un diámetro externo de 7 cm y 21 orificios de 1 mm de diámetro cada uno, lo que da una superficie efectiva de aeración de 16.5 mm^2 . Esto corresponde al 51.26% del área transversal del tubo. El diámetro del difusor de placa porosa es de 6 cm. El funcionamiento de ambos difusores fue comparado con el del difusor de orificio, el cual se había venido utilizando para las corridas de fermentación. Dicho difusor de orificio fabricado en tubo de acero inoxidable de 6.5 mm de diámetro (1/4 de pulgada), tiene un orificio de 2 mm de diámetro, lo que da una superficie efectiva de aeración de 3.14 mm^2 ; es decir, el 9.7% del área transversal del tubo.

En la Tabla 29 se presentan los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) obtenidos en agua con los tres tipos de difusores a las mismas condiciones de operación, así como las velocidades de transferencia de oxígeno (VTO) calculadas a partir de los primeros. Como era de esperarse, al incrementar el número de los orificios en el difusor, se incrementó la capacidad de transferencia de oxígeno.

Para evaluar la diferencia en la producción de estreptomina al usar los diferentes difusores, se realizaron corridas de fermentación por duplicado, a una velocidad de agitación de 625 rpm y aeración de 1.0 vvm. Los perfiles obtenidos mostrados en la Figura 43 indican que, al emplear los difusores de anillo y de placa porosa se observó un incremento en el título de producción de 25 y 35%, respectivamente, en comparación con el título obtenido al emplear el difusor de orificio. La magnitud de estos incrementos prácticamente coincide con la mejora en la transferencia de oxígeno que fue de 19 y 33%,

TABLA 29

VALORES DEL COEFICIENTE Y DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXIGENO OBTENIDOS EN FERMENTADORES DE 14 LITROS CON DIFERENTES DIFUSORES

TIPO DE DIFUSOR	$k_L a^1$ (h^{-1})	$VT O^2$ (mmoles O_2/lxh)
orificio	148.95	31.43
anillo	176.90	37.33
placa porosa	198.28	41.84

¹ coeficiente de transferencia de oxígeno determinado en agua.

² velocidad de transferencia de oxígeno calculada a partir de los valores de $k_L a$ y asumiendo que $c_L = 0$.

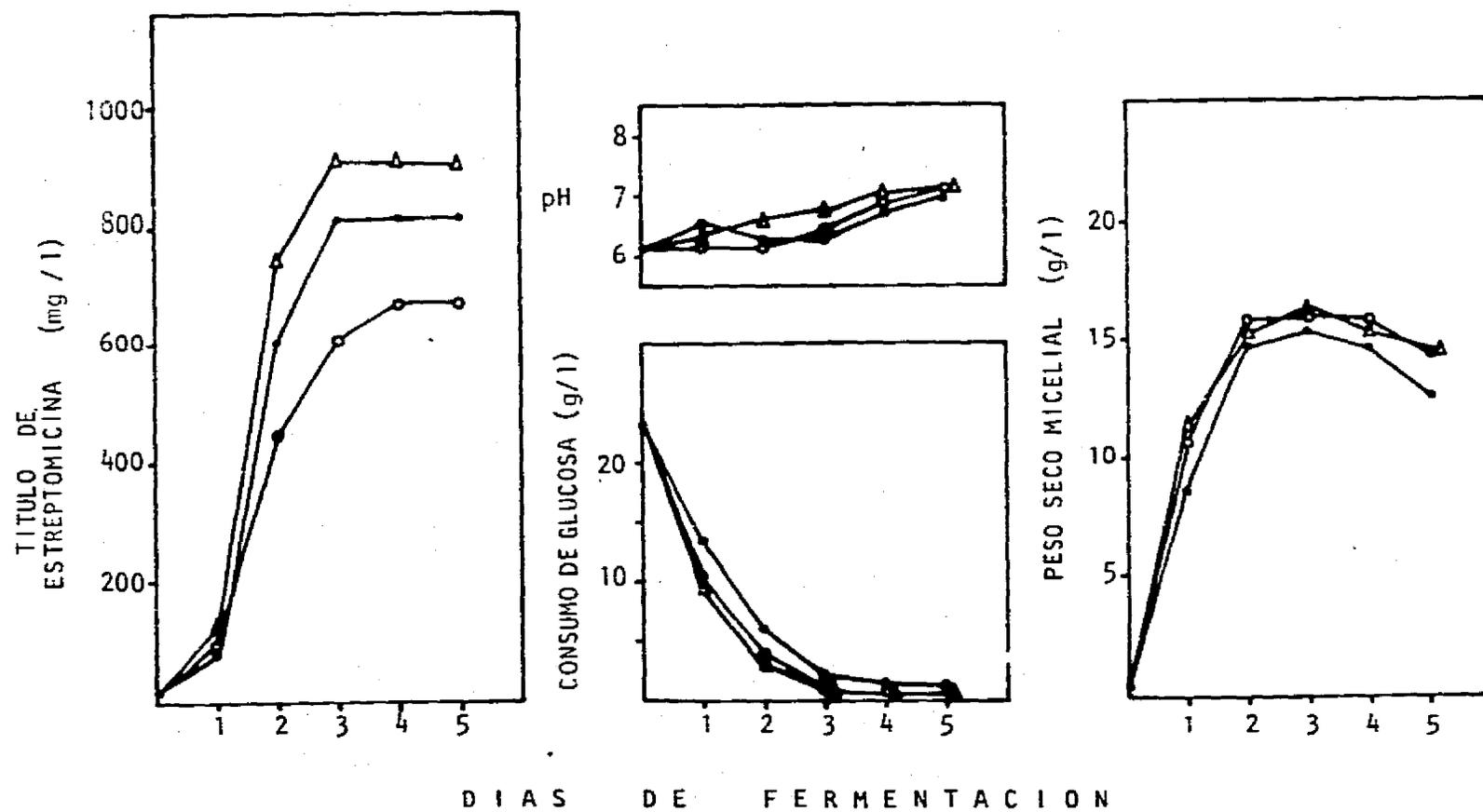


Fig. 43. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en fermentador de 14 l utilizando difusores de orificio (o), de anillo (●) y placa de acero sinterizado (Δ). La agitación fue de 625 rpm y el flujo de aire de 10 l/min.

para los difusores de anillo y placa porosa, respectivamente. En la Figura 43 también se observa que las velocidades de consumo de glucosa y de crecimiento aumentaron al utilizar los dos nuevos tipos de difusores.

El incremento en el título de antibiótico al emplear el difusor de placa porosa fue 11% mayor al obtenido con el de anillo. A pesar de esto, se decidió seguir utilizando el difusor de anillo debido a aspectos de tipo técnico. Al final de las fermentaciones se observó que una capa de micelio se formó sobre la superficie del difusor de placa porosa, aparentemente esta capa no impidió el flujo de aire durante la fermentación debido a que la presión de suministro fue alta (2 kg/cm^2), pero sí se corría el riesgo de contaminación en fermentaciones sucesivas al no poder asegurar una limpieza eficiente del difusor. Además, de que podría presentarse taponamiento de dicho difusor durante la preparación o esterilización del fermentador por la presencia de los sólidos contenidos en el medio.

Tomando como base los resultados obtenidos con anterioridad, se llevaron a cabo fermentaciones a diferentes velocidades de agitación y aeración con el fin de evaluar la magnitud del efecto de estas variables al utilizar el difusor de anillo. Para esto, a una velocidad de aeración constante de 1 vvm, se probaron cuatro diferentes velocidades de agitación 400, 475, 550 y 625 rpm. En la Figura 44 se presentan los perfiles obtenidos, como se esperaba el título de estreptomycinina se incrementó a medida que aumentó la velocidad de agitación. Las velocidades de consumo de glucosa y de crecimiento, también se incrementaron.

Con los títulos alcanzados a los 5 días de fermentación, se construyó la gráfica mostrada en la Figura 45, en la que de manera simultánea se presenta el efecto de la velocidad de agitación sobre el título de antibiótico y sobre la transferencia de oxígeno. Se observan incrementos notorios en el título de antibiótico y en la transferencia de oxígeno al aumentar la agitación entre 400 y 550 rpm. Cuando se aumentó de 550 a 625 rpm, el incremento en la respuesta fue menor.

En otras corridas de fermentación, manteniendo constante la velocidad de agitación a 625 rpm, se probaron tres diferentes flujos de aire 5, 10 y 15 l/min, que corresponden a 0.5, 1.0 y 1.5 vvm, respectivamente. Como se presenta en la Figura 46, no se observó un incremento notable en el coeficiente de transferencia de oxígeno al aumentar el flujo de aire de 10 a 15 l/min, lo que se reflejó en el mínimo incremento en el título de estreptomycinina. Este comportamiento se observa más claramente en la Figura 47, donde se presentan los máximos títulos de antibiótico alcanzados a los 5 días de fermentación y la capacidad de transferencia de oxígeno, en función de la aeración.

Tomando los títulos de estreptomycinina alcanzados al final de los 5 días de fermentación a las diferentes condiciones de

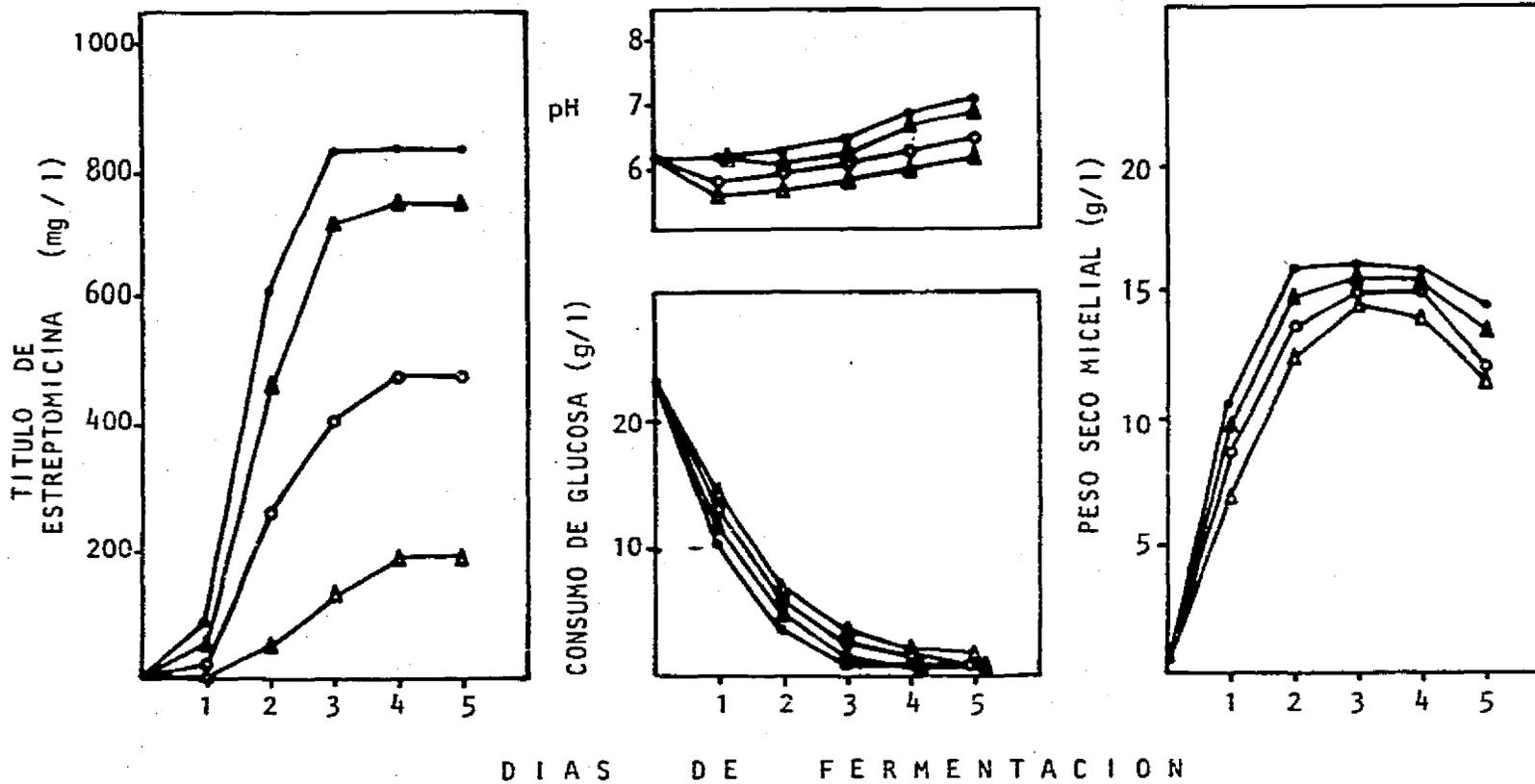


Fig. 44. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en fermentador de 14 l a diferentes velocidades de agitación: 400 rpm (Δ), 475 rpm (○), 550 rpm (▲) y 625 rpm (●). El aire fue suministrado a través de un difusor de anillo a un flujo de 10 l/min.

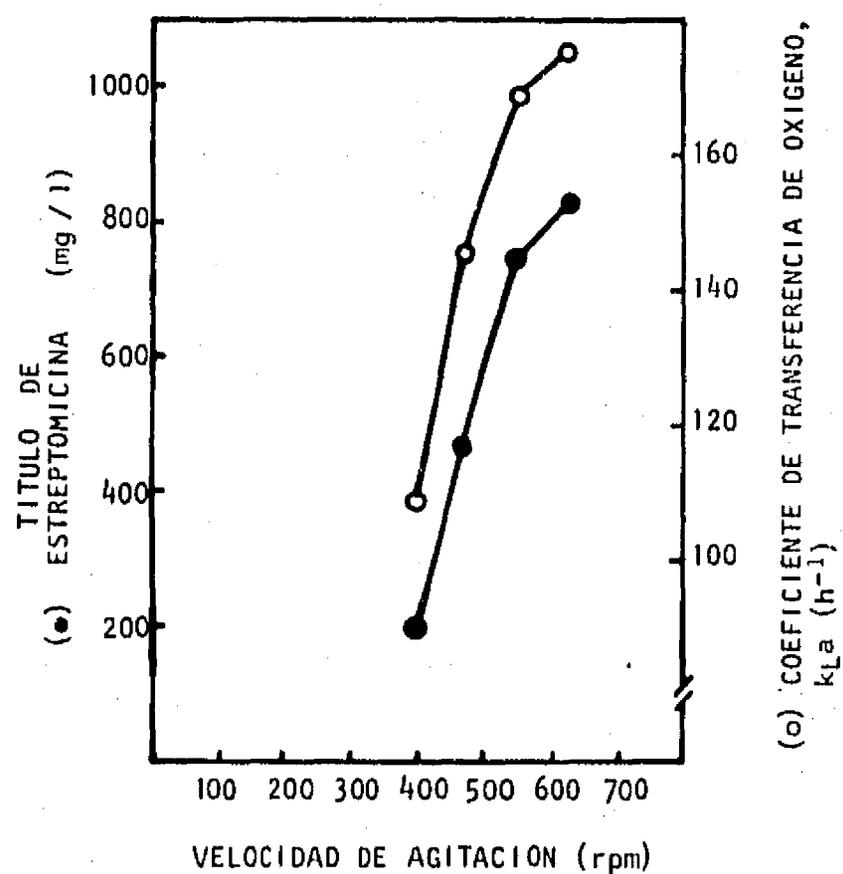


Fig. 45. Efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 (●) y sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno k_{La} (○) en fermentadores de 14 l. El aire fue suministrado a través de un difusor de anillo, a un flujo de 10 l/min.

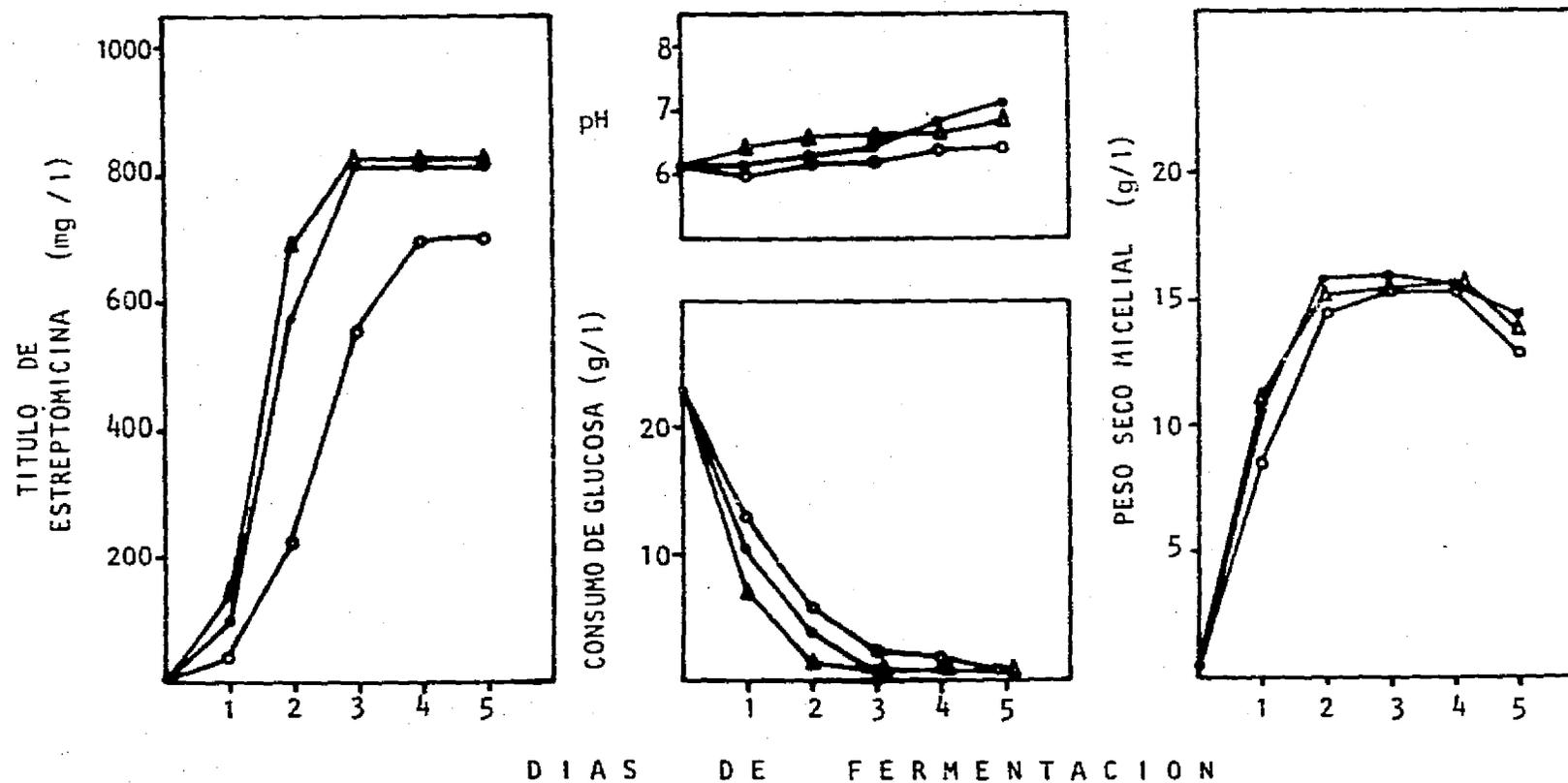


Fig. 46. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en fermentador de 14 l a diferentes flujos de aire: 5 l/min (○); 10 l/min (●) y 15 l/min (Δ). La agitación fue de 625 rpm y el aire fue suministrado a través de un difusor de anillo.

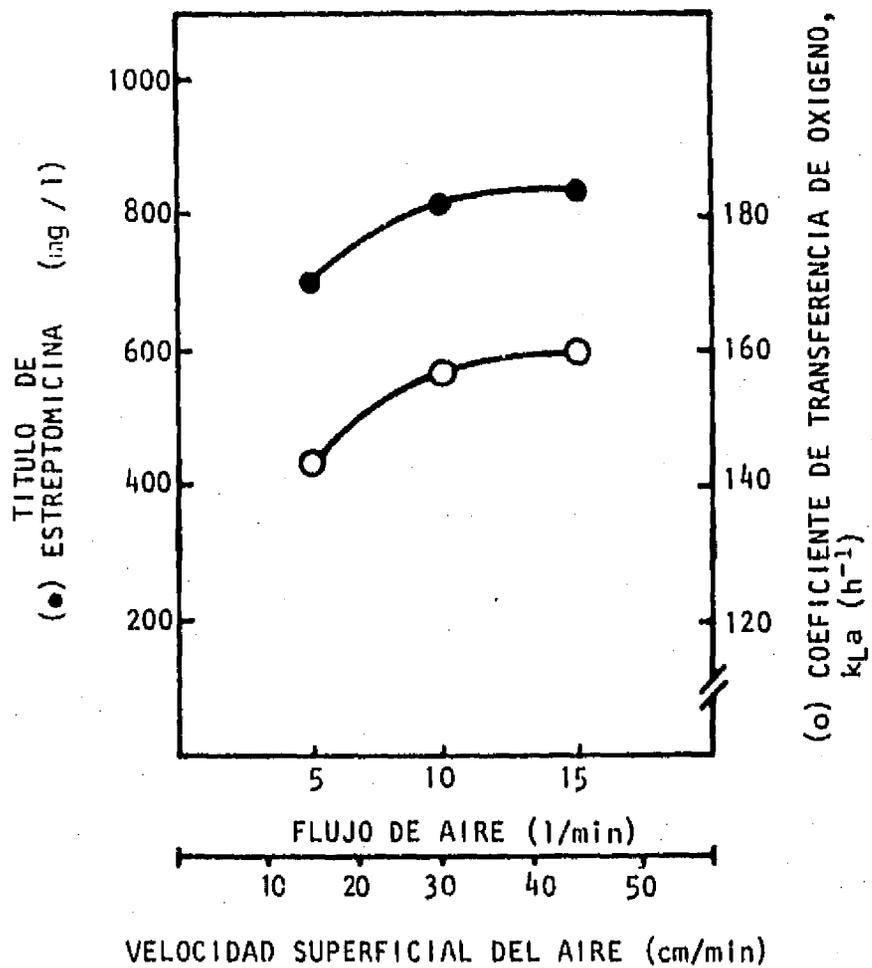


Fig. 47. Efecto de la velocidad de aeración sobre la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 (●) y sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno, $k_L a$ (○) en fermentadores de 14 l a 625 rpm. El aire fue suministrado a través de un difusor de anillo.

aeración y agitación de las Figuras 44 y 46, se construyó la gráfica de la Figura 48 para mostrar la relación que existe entre el coeficiente de transferencia de oxígeno y el título de producción al emplear un difusor de anillo. Esta relación es también de tipo lineal. Al ajustar estos resultados a un modelo de regresión, se obtuvo la siguiente expresión que es similar a la ecuación (4):

$$EM = 9.21 (k_L a)_{\text{agua}} - 816.59 \quad (14)$$

El análisis de varianza del modelo se presenta en la Tabla 30. El coeficiente de determinación fue 0.9891. A partir de esta ecuación se encontró que el mínimo valor de $(k_L a)_{\text{agua}}$ que permite la producción de estreptomicina está por arriba de 89 h^{-1} , abajo de este valor la producción es nula. Aparentemente, a pesar de que con este difusor se logró aumentar el título de producción, parece ser que el oxígeno sigue siendo el factor limitante del proceso.

Con base en la ecuación (11), se calculó el modelo matemático para expresar el efecto conjunto de la agitación y la aeración sobre la producción de estreptomicina utilizando el difusor de anillo, que resultó ser el siguiente:

$$(k_L a)_{\text{agua}} = 20.23 (N^3)^{0.318} v_s^{0.042} \quad (15)$$

El análisis de varianza del modelo ajustado se presenta en la Tabla 30. El coeficiente de determinación fue 0.9218. Como se observa en esta ecuación, los valores de K' , α' y β' son ligeramente diferentes a los encontrados cuando se utilizó el difusor de orificio (ecuación 12), lo que refleja la diferencia en el comportamiento hidrodinámico al utilizar los dos tipos de difusores. La representación gráfica de este modelo se presenta en la Figura 49.

Sustituyendo la ecuación (15) en la (14), la producción de estreptomicina expresada en términos de la agitación y la aeración utilizando el difusor de anillo es la siguiente:

$$EM = 186.32 (N^3)^{0.318} v_s^{0.042} - 816.59 \quad (16)$$

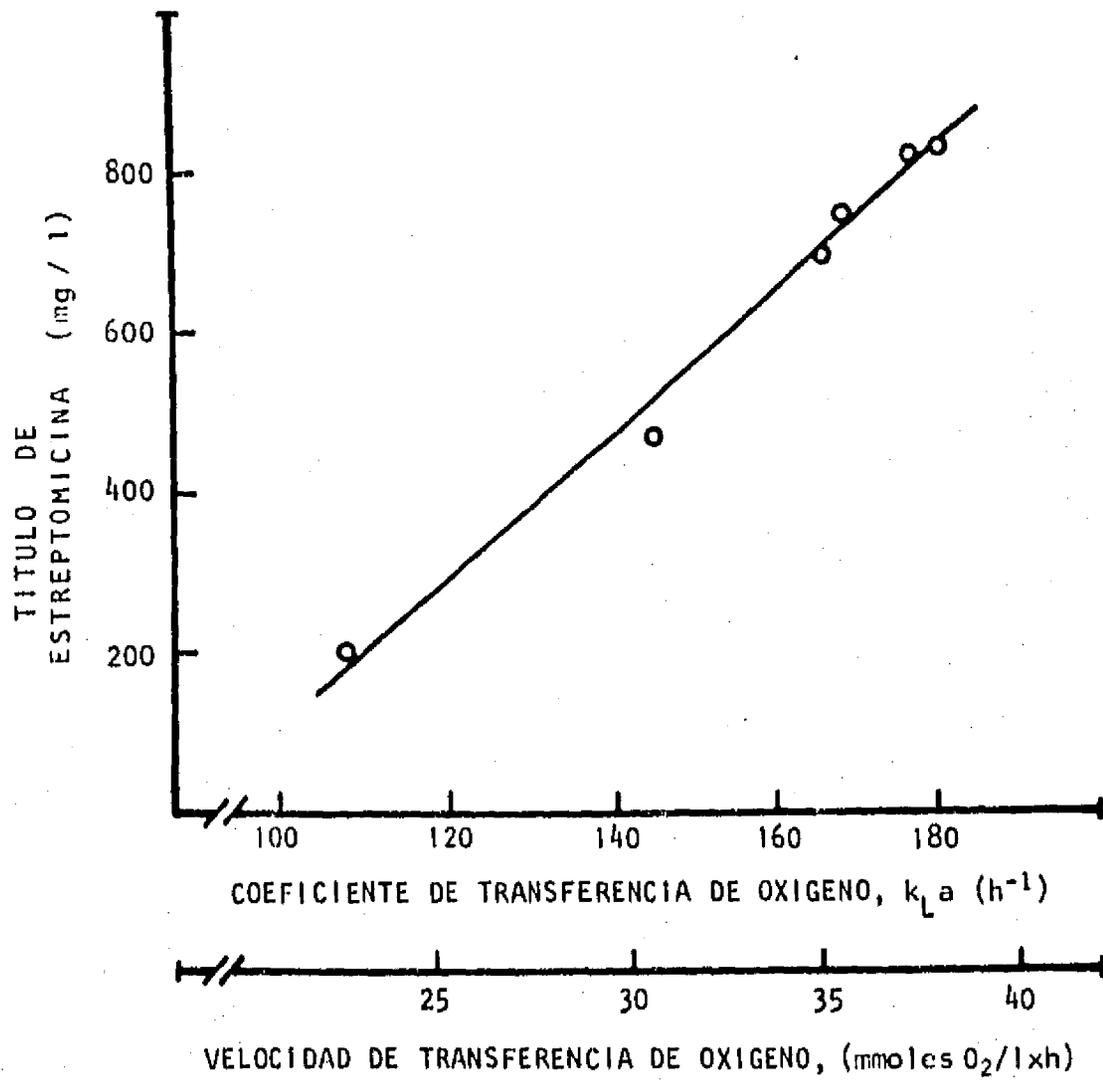


Fig. 48. Efecto de la transferencia de oxígeno ($k_L a$), sobre la producción de estreptomicina en fermentadores de 14 - litros con difusor de anillo.

Tabla 30

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS MODELOS AJUSTADOS

1) Estreptomicina en función de $k_L a$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	1	306474.69	306474.69	363.2
Error	4	3375.31	843.83	
Total	5	309850.00		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9891$

2) $k_L a$ en función de N y V_s

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	3	151478.52	50492.84	535.45
Error	3	282.90	94.30	
Total	6	151761.42		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9218$

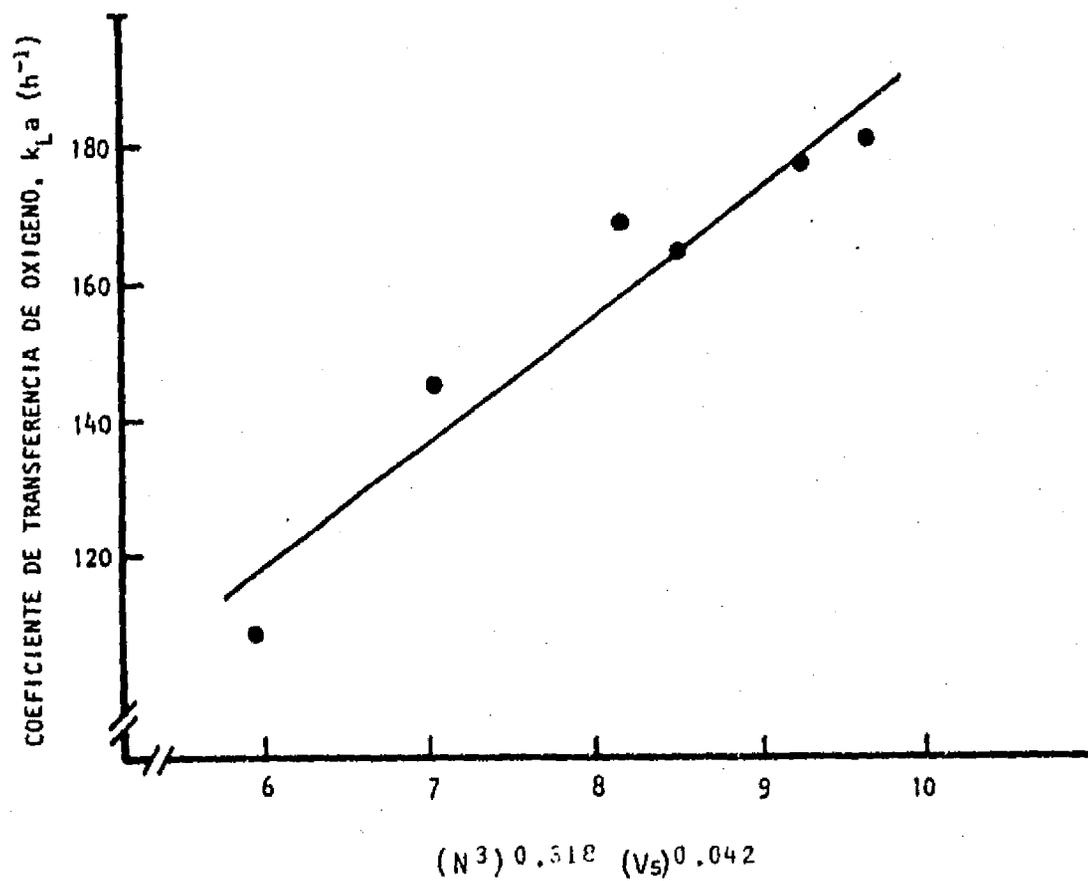


Fig. 49. Efecto conjunto de las velocidades de agitación (N) y de aeración (Vs) sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{La}) en fermentadores de 14 litros con difusor de anillo.

Como en la ecuación (13), los exponentes de las variables indican que la agitación, la cual favorece en mayor medida la transferencia de oxígeno, tiene una mayor influencia sobre la producción de estreptomicina que la velocidad de aeración.

Era de esperarse que al existir una relación lineal entre el título de estreptomicina y el coeficiente de transferencia de oxígeno, se presentara el mismo tipo de relación al tener como respuesta el rendimiento de estreptomicina en base a sustrato ($Y_{EM/S}$), debido a que la concentración inicial de glucosa fue la misma en todos casos. Para confirmarlo se construyó la gráfica de la Figura 50 y se obtuvo el modelo matemático que se presenta a continuación:

$$Y_{EM/S} = 24.45 (k_L a)_{\text{agua}} - 37.24 \quad (17)$$

donde $(k_L a)_{\text{agua}}$ está expresado en min^{-1} ,
 $Y_{EM/S}$ está expresado en mg EM/g glucosa

El análisis de varianza del modelo ajustado se presenta en la Tabla 31. El coeficiente de determinación fue 0.9944.

Por otra parte, si nuevamente se analizan los perfiles de fermentación presentados en las Figuras 44 y 46, se puede observar que al mejorar las condiciones de oxigenación en el cultivo, no sólo se incrementa el título máximo de estreptomicina también se reduce el tiempo en que éste se alcanza. Esto significa que hay un efecto sobre la productividad (P) del proceso fermentativo. Para conocer el tipo de efecto que tiene el coeficiente de transferencia de oxígeno sobre la productividad volumétrica en cada fermentación, tomaron los títulos máximos de estreptomicina y se dividieron entre el tiempo en el cual éstos se alcanzaron (P_{max}). Posteriormente se construyó la gráfica presentada también en la Figura 50, en la que se puede apreciar la relación de tipo exponencial que hay entre la productividad máxima y el coeficiente de transferencia de oxígeno.

Los valores obtenidos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal mediante el paquete Statgraphics (1987), obteniéndose la siguiente expresión:

$$P_{\text{max}} = 0.21 (k_L a)_{\text{agua}}^{3.57} \quad (18)$$

donde la productividad volumétrica máxima de estreptomicina, P_{max} , está expresada en $\text{mg/l} \times \text{h}$, y el $(k_L a)_{\text{agua}}$ en min^{-1} .

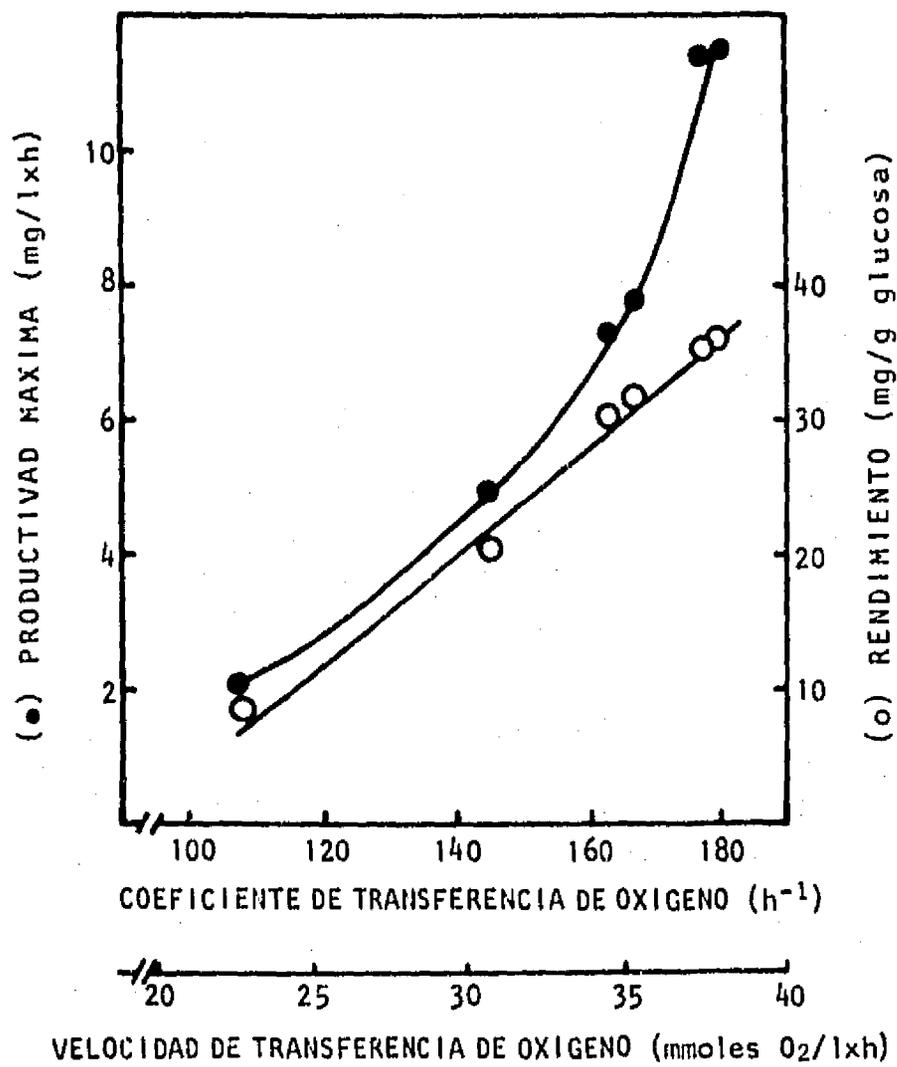


Fig. 50. Efecto de la transferencia de oxígeno sobre la productividad máxima (●) y el rendimiento (○) de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 en fermentadores de 14 litros.

Tabla 31

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS MODELOS AJUSTADOS

1) Rendimiento

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	1	596.55	596.55	726.26
Error	4	3.28	0.82	
Total	5	599.83		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9944$

2) Productividad máxima

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	2	360.26	180.13	1026.12
Error	4	0.70	0.18	
Total	6	360.96		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9867$

El análisis de varianza del modelo propuesto se presenta en la Tabla 31. El coeficiente de determinación obtenido fue 0.9867. En este modelo empírico, llama la atención la magnitud del exponente que marca un efecto sustancial de la transferencia de oxígeno sobre la productividad volumétrica de estreptomycin. A un $(k_{La})_{\text{agua}}$ de 108.32 h^{-1} obtenido a 400 rpm y 10 l aire/min, se alcanzó una productividad de $2.1 \text{ mg/l} \times \text{h}$, cuando el $(k_{La})_{\text{agua}}$ aumentó a 180.05 h^{-1} , a 625 rpm y 15 l aire/min, la productividad se incrementó a $10.5 \text{ mg/l} \times \text{h}$, lo que corresponde a un aumento de 5 veces. Este es un aspecto interesante, ya que en la práctica siempre se busca reducir los tiempos de fermentación para así abatir los costos de producción.

El hecho de que no se hayan podido tomar lecturas de oxígeno disuelto después de las primeras 12 horas de cultivo, debido a la formación de una capa de micelio en la punta de los electrodos, justifica la razón de haber utilizado los valores de $(k_{La})_{\text{agua}}$ determinados por el método de eliminación de oxígeno, en lugar del método dinámico durante el crecimiento exponencial. El método empleado, aunque no da un valor representativo del k_{La} de un cultivo como éste que presenta altos valores de viscosidad, sí refleja el comportamiento hidrodinámico del reactor a las diferentes condiciones de agitación y aeración.

5.5 Efecto del coeficiente de transferencia de oxígeno sobre el crecimiento de S. griseus

En todas las corridas de fermentación que se realizaron se colocaron electrodos para medir la concentración de oxígeno disuelto en el seno del cultivo. Una vez iniciada la fermentación, se observó una brusca disminución en la concentración de oxígeno disuelto durante las primeras 12 horas, lo que reflejó el alto requerimiento de oxígeno por parte de las células durante el crecimiento. Un comportamiento similar fue reportado por Bartholomew y col. (1950a) quienes detectaron que el oxígeno disuelto llegó casi a cero poco antes de las 15 horas de fermentación.

Durante las fermentaciones también se observó que a medida que se incrementó la velocidad de agitación, el consumo de oxígeno disuelto en el cultivo también aumentó. Este aspecto sugirió que la transferencia de oxígeno también tiene efecto sobre el crecimiento del microorganismo. Al respecto, Bylinka y Birukov (1972) encontraron que la respiración de un cultivo de Streptomyces se incrementó de manera exponencial tras un aumento en la velocidad de agitación.

A partir de los perfiles de crecimiento que se mostraron en las Figuras 44 y 46, se calculó la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) para cada condición. Con estos valores se construyó la gráfica mostrada en la Figura 51, que permite conocer el tipo de correlación que existe entre este parámetro y el $(k_{La})_{agua}$. Como puede observarse, hay una relación lineal que podría expresarse mediante la siguiente expresión:

$$\mu_{max} = 0.0156 (k_{La})_{agua} + 0.0802 \quad (19)$$

donde μ_{max} está expresada en h^{-1} y $(k_{La})_{agua}$ en min^{-1} . El análisis de varianza del modelo ajustado se presenta en la Tabla 32. El coeficiente de determinación obtenido fue 0.9728.

La correlación obtenida indica que el microorganismo crece más rápido conforme hay más disponibilidad de oxígeno en el cultivo. El oxígeno estimula la velocidad de utilización de glucosa (Figuras 44 y 46), por lo que se metaboliza rápidamente sin permitir la acumulación de ácidos láctico y pirúvico, como lo indican los perfiles de pH presentados en las Figuras 44 y 46, en donde no se observó una disminución en el pH del caldo a las condiciones de oxigenación más altas, con un $(k_{La})_{agua}$ de 168 a $180 h^{-1}$.

El valor más alto de μ_{max} , $0.129 h^{-1}$, correspondió al $(k_{La})_{agua}$ de $180.05 h^{-1}$, obtenido a 625 rpm y 15 l de aire/min. Como respuesta obvia, al aumentar la μ_{max} disminuyó el tiempo de duplicación del microorganismo. Este se redujo de 6.36 a 5.37 h cuando el $(k_{La})_{agua}$ aumentó de 108.32 a $180.05 h^{-1}$, respectivamente.

En todo proceso fermentativo, el suministro del oxígeno que se proporciona al sistema debe por lo menos cubrir la demanda del microorganismo para que su crecimiento no se vea limitado. A manera de saber si la cantidad de oxígeno que se suministró al cultivo realmente logró satisfacer la demanda del microorganismo, se hizo una estimación tomando los datos de la fermentación que se realizó a 625 rpm y 10 l de aire/min, en la que el $(k_{La})_{agua}$ fue $176.9 h^{-1}$.

Para esto se hicieron las siguientes consideraciones:

- a. se tomó la concentración celular de 15 g/l, que corresponde a las 45 h y está cerca del final de la fase de crecimiento exponencial, en la que el cultivo debe describir la velocidad de respiración más alta;

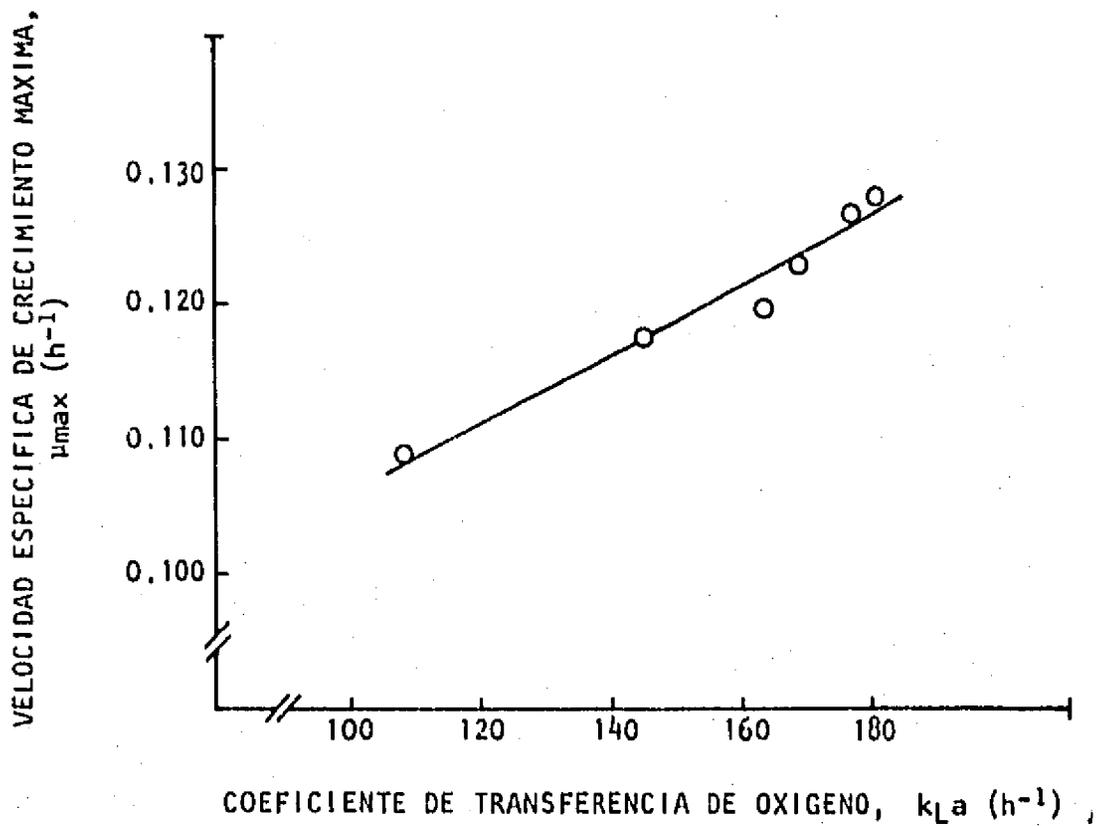


Fig. 51. Efecto del coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$) sobre la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) de S. griseus ATCC 12475 en fermentadores de 14 litros.

Tabla 32

ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO AJUSTADO

μ_{\max} en función de $k_L a$

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F
modelo	1	0.000244	.000244	70.7445
error	4	0.0000138	.0000035	
total	5	0.0002580		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9465$

- b. el coeficiente específico de respiración microbiana Q_{O_2} se puede asumir que es de 3 mmoles O_2 /g células x h para S. griseus (Quintero, 1981);
- c. C^* , la concentración de oxígeno disuelto que está en equilibrio con la fase gaseosa fue de 6.76 mg/l;
- d. la demanda de oxígeno por parte del cultivo se expresa como: $Q_{O_2}x$;
- e. el suministro de oxígeno al sistema se expresa como: $k_L a (\Delta C)$, donde $\Delta C = C^* - C_L$;
- f. C_L es la concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido.

Si el suministro de oxígeno debe por lo menos satisfacer la demanda del microorganismo, se debe cumplir la relación:

$$k_L a (C^* - C_L) = Q_{O_2} x \quad (20)$$

sustituyendo en la ecuación (20) los datos anteriores se tiene que la demanda de oxígeno fue de 1440 mg O_2 /l x h. La ΔC tiene entonces un valor de 8.14 mg O_2 /l, lo que resulta en un valor de $C_L = -1.38$ mg O_2 /l. El signo negativo de C_L indica precisamente que hay limitación de oxígeno en el cultivo.

Suponiendo que el valor crítico de C_L para S. griseus sea de 0.68 mg O_2 /l, es decir un 10 % de saturación de oxígeno disuelto, se puede calcular el valor mínimo de $(k_L a)_{\text{agua}}$ para que no exista limitación de oxígeno. Utilizando la misma ecuación (20), se obtuvo un valor de $(k_L a)_{\text{agua}}$ de 236.84 h^{-1} , esto corresponde a un 34% por arriba del máximo utilizado durante las fermentaciones.

Si este valor de $(k_L a)_{\text{agua}}$ se sustituye en las ecuaciones (14), (17), (18) y (19), se podría estimar lo siguiente: la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) aumentaría a 0.14 h^{-1} , el título máximo de estreptomycin sería 1365 mg/l, el rendimiento de estreptomycin en base a sustrato aumentaría a 59.34 mg/g y la productividad del antibiótico a 28.32 mg/l x h.

Entre las opciones que existen para aumentar el suministro de oxígeno a un sistema, se pueden citar dos: 1) aumentar el $k_L a$ ya sea modificando el diseño del reactor o bien aumentando las velocidades de agitación y de aeración, y 2) aumentar la C^* por un incremento en la presión de operación dentro del reactor o alimentando oxígeno puro o aire enriquecido con oxígeno puro. Al evaluar estas opciones, la más viable para el caso de los

fermentadores utilizados en este trabajo, sería el suministro de oxígeno o de aire enriquecido, sin embargo, esto ya no fue posible evaluarlo.

Adicionalmente, con los datos obtenidos anteriormente, se estimó el rendimiento celular en base a oxígeno (Y_{O_2}) a través de la siguiente expresión (Quintero, 1981):

$$Q_{O_2}x = \mu x / Y_{O_2} \quad (21)$$

lo que da un $Y_{O_2} = 1.31$ mg células/mg O_2 . Con este valor se encontró que la cantidad de oxígeno requerido para obtener 15 g de células, fue 11.45 g de O_2 .

5.6 Evolución de la viscosidad durante la fermentación

Durante las fermentaciones se tomaron mediciones de la viscosidad relativa del caldo de fermentación para evaluar su evolución durante el cultivo. Aunque la medición de la viscosidad no se hizo de manera convencional, los datos obtenidos sí fueron indicativos de la modificación en la morfología del microorganismo, el cual crece como micelio disperso y esto ocasiona cambios en las características reológicas del caldo. En la Figura 52 se presenta el perfil de viscosidad obtenido en una fermentación que se llevó a cabo a 625 rpm y flujo de aire a través del difusor de anillo, de 10 l/min.

Como se observa, la viscosidad aumentó a partir de las 16 horas, paralelamente al crecimiento, alcanzando el máximo a las 56 horas, cuando el cultivo había llegado a la fase estacionaria. Pasado este tiempo, inmediatamente se inició una disminución en la viscosidad como resultado de la fragmentación micelial, lisis o muerte del cultivo por lo que la producción del antibiótico se empezó a detener y ya no se agotó completamente la glucosa. Durante la fermentación se observó que al incrementar la viscosidad, la distribución de burbujas se hizo poco eficiente ya que éstas empezaron a coalescer. Además, se generaron zonas de poco movimiento como resultado de un aumento en el tiempo de mezclado. Este comportamiento, según la literatura, es generalizado para muchas especies de Streptomyces (Bader, 1986).

Richards (1961) encontró en diferentes fermentaciones, un perfil de viscosidad similar al obtenido en el presente trabajo,

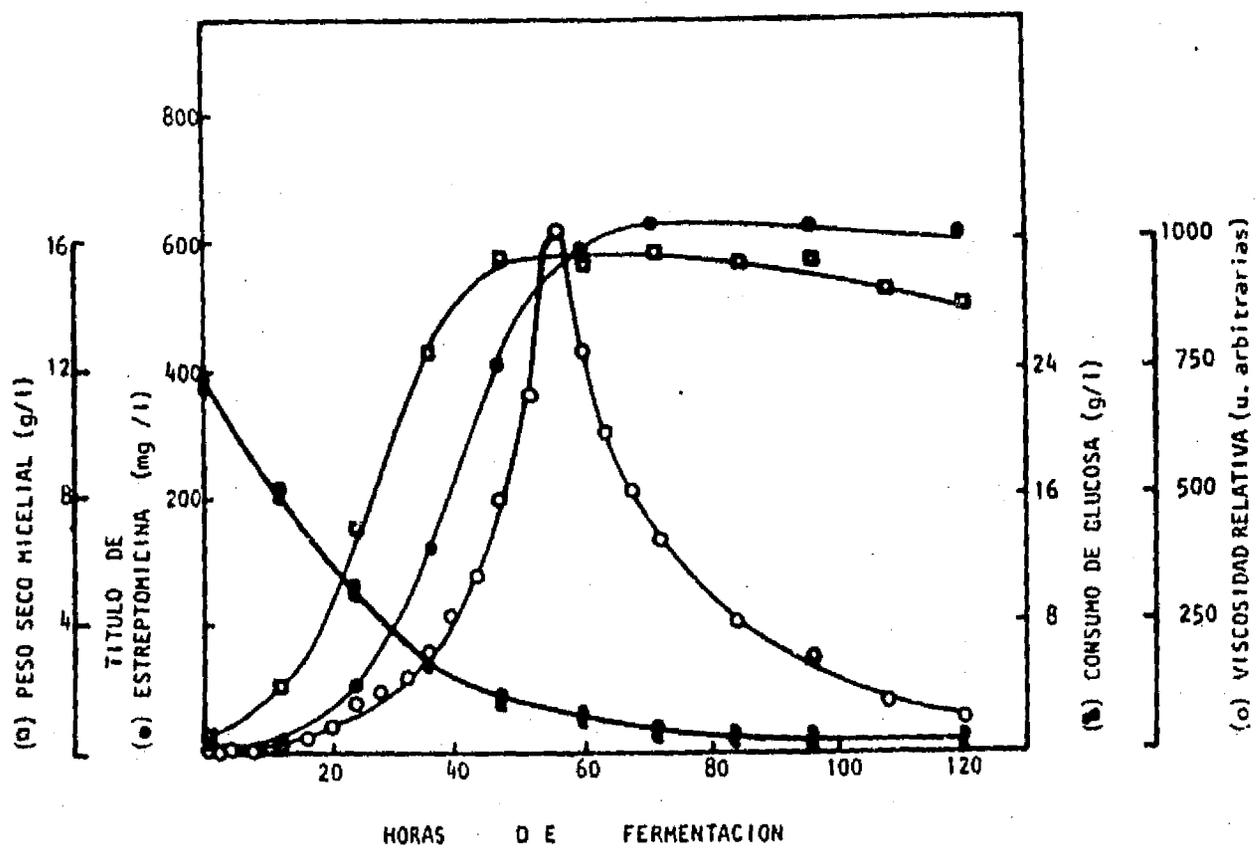


Fig. 52. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 en el medio 15 en fermentador de 14 l a 28°C, con agitación de 625 rpm y flujo de aire 10 l/min (1 vvm) suministrato a través de un difusor de anillo.

el máximo valor lo registró aproximadamente a las 70 horas e inmediatamente empezó a disminuir llegando a un valor mínimo aproximadamente a las 130 horas. El autor menciona que el comportamiento no-Newtoniano del caldo corresponde a un fluido pseudoplástico, aspecto que más tarde fue comprobado también por Blanch y Bhavaraju (1976).

5.7 Efecto del control de pH durante la fermentación

Como se recordará, a nivel de matraces se encontró que a un pH inicial de 6.0, sin ajustar el medio de cultivo, se obtuvo el máximo título de estreptomicina. Aunque no existen antecedentes sobre la conveniencia de controlar el pH durante la producción de estreptomicina, se consideró conveniente probar su efecto ya que Inoue y col. (1982a) establecieron que el pH tiene efecto crítico sobre la producción del antibiótico.

Para esto se llevó a cabo una fermentación, manteniendo constante el pH a 6.0. Una vez iniciado el cultivo se observó una disminución del pH, por lo que fue necesario adicionar NaOH automáticamente. Aparentemente este hecho tuvo un efecto negativo sobre el microorganismo, comparado con lo observado en la fermentación sin control de pH a los 5 días de incubación. El crecimiento fue muy lento y la máxima concentración celular que se alcanzó fue aproximadamente del 20 %, incluso la glucosa se consumió muy lentamente. La producción de estreptomicina se retrasó 3 días y el título alcanzado a los 5 días fue de sólo 72 mg/l. Este comportamiento sugiere un efecto regulatorio del pH sobre las enzimas encargadas de la utilización de glucosa y tal vez también sobre las encargadas de la síntesis del antibiótico. En vista de los resultados obtenidos, no se recomendó por el momento la conveniencia de controlar el pH durante la fermentación.

6. UTILIZACION DE MATERIAS PRIMAS ALTERNATIVAS PARA LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

Dada la dificultad de predecir a futuro la disponibilidad en el mercado de las materias primas empleadas en el medio, se consideró la conveniencia de evaluar el uso de otras materias alternativas. En caso de presentarse la escasez de algún ingrediente, se podría contar con otras opciones que permitieran

obtener por lo menos, títulos de estreptomicina cercanos a los alcanzados con el medio optimizado. Para esto, se buscaron en el mercado materiales que pudieran sustituir a cada uno de los ingredientes del medio, que son levadura de cerveza autolisada, glucosa, fosfato dibásico de potasio y cloruro de sodio. Cabe señalar que no fue posible hacer una búsqueda exhaustiva de materias primas alternativas, solo se utilizaron aquellas de las que se consiguieron muestras entre los distribuidores.

La sustitución se hizo tratando de mantener la concentración óptima de los ingredientes, para observar el efecto de cada uno de ellos. Al realizar estas pruebas en fermentador fue posible observar el comportamiento de los diferentes materiales en lo que se refiere principalmente a la formación de espuma. Resulta obvio mencionar que si alguna de las nuevas opciones se emplea, el medio tendrá que ser nuevamente optimizado.

6.1 Fuente de nitrógeno

Los diferentes materiales que se utilizaron como fuente de nitrógeno se presentan enlistados en la Tabla 33. Antes de llevar a cabo las fermentaciones, se determinó en cada uno de ellos el contenido de nitrógeno total, para adicionar al medio sólo la cantidad necesaria para tener la misma concentración nitrógeno que aporta la levadura de cerveza autolisada. El resto de los ingredientes del medio se adicionaron a la concentración óptima establecida previamente.

Cuando se utilizó el extracto de levadura (Yestál 400), la cantidad de cloruro de sodio se redujo en virtud de que dicho producto contiene un 6% de sal comestible. El camarón seco antes de ser molido para obtener la harina, se tamizó para eliminar el exceso de sal.

Los experimentos se llevaron a cabo en los fermentadores de 14 litros, con una agitación de 625 rpm y suministro de aire de 10 litros de aire/min (1 vvm). El pH inicial de los medios se ajustó a 6.0. Los inóculos fueron producidos en el medio con levadura de cerveza autolisada. La evolución de la producción de estreptomicina se presenta en las Figuras 53, 54 y 55. Los títulos alcanzados con los diferentes materiales, fueron comparados con el obtenido al emplear levadura de cerveza autolisada. Con el residuo de cervecería se obtuvo un título de estreptomicina de 710 mg/l, esto es el 85% del control. Cuando se utilizaron extracto de levadura o harina de pescado, los títulos fueron de 435 y 445 mg/l, respectivamente, valores que corresponden aproximadamente al 50%. Los títulos obtenidos al utilizar peptona, hidrolizado de proteína de pescado y levadura

Tabla 33

MATERIALES EMPLEADOS COMO FUENTE DE NITROGENO PARA LA
PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

MATERIAL (Nombre comercial)	CONTENIDO DE NITROGENO (%)	CANTIDAD ADICIONADA AL MEDIO (g/l)
Levadura de cerveza autolisada	7.77	26.9
Residuo de cervecería	7.70	27.1
Harina de soya integral cruda	7.49	27.9
Harina de pescado	9.71	21.5
Extracto de levadura (Yestál 400)	7.62	27.4
Levadura de panificación (Nevada)	8.24	25.3
Peptona (Peptamín C)	17.29	12.1
Harina de camarón	8.18	25.5
Sólidos de cocimiento de maíz (Nutriferm)	6.02	34.7
Hidrolizado de proteína de pescado (CPSP 90 Anorel)	16.13	12.9
Sulfato de amonio	29.0	0.72

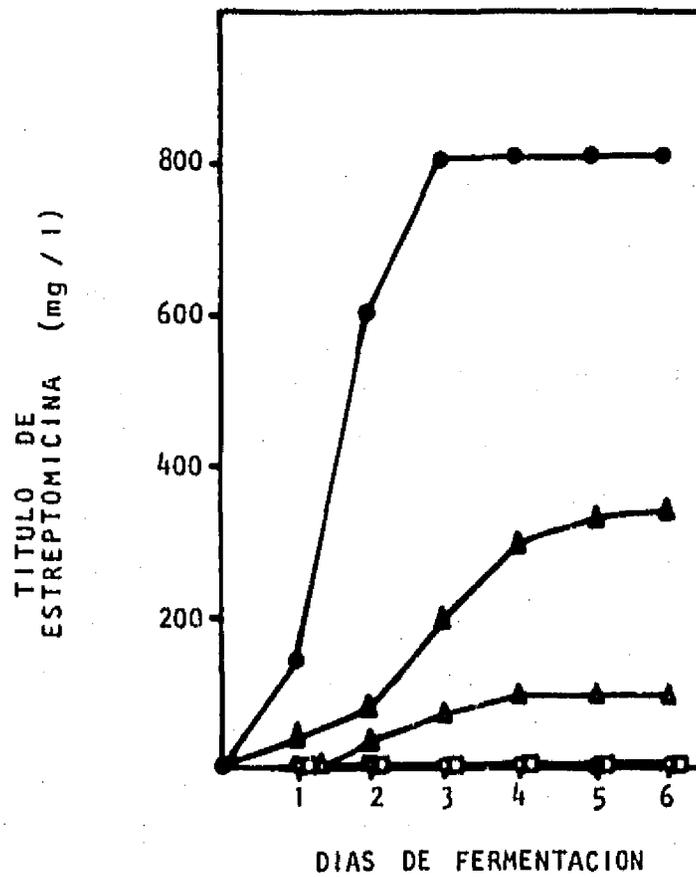


Fig. 53. Evolución de la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 utilizando diferentes fuentes de nitrógeno: leva dura de cerveza autolisada (●), sólidos de cocimiento de maíz (○), peptona (△), harina de soja (▲) y sulfato de amonio (◻), en fermentadores de 14 l a 625 rpm y 10 l aire/min.

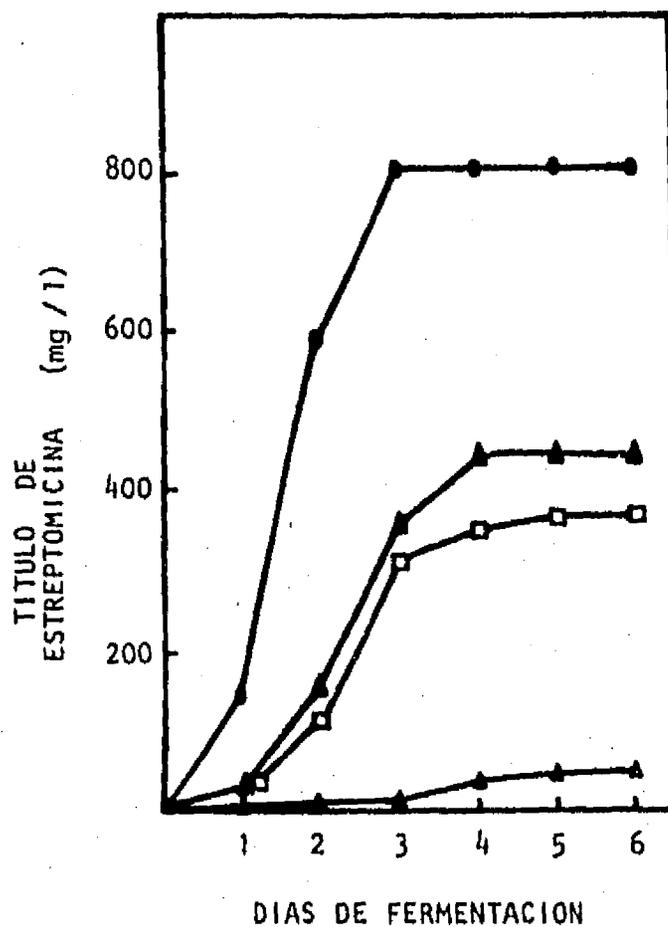


Fig. 54. Evolución de la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475 utilizando diferentes fuentes de nitrógeno: levadura de cerveza autolisada (●), proteína de pescado soluble (◻), harina de pescado (▲) y harina de camarón (Δ) en fermentadores de 14 l a 625 rpm y 10 l aire/min.

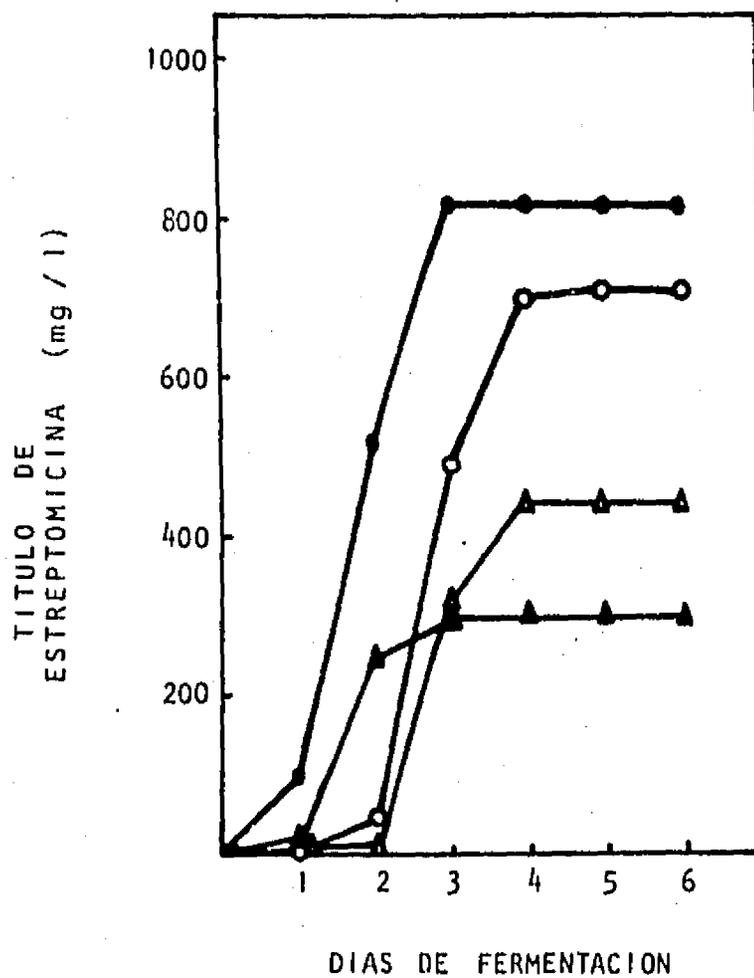


Fig. 55. Evolución de producción de estreptomina por *S. griseus* ATCC 12475 utilizando: levadura de cerveza autolisada (●), residuo de cervecería (○), extracto de levadura (Yestal 400, Δ) y levadura para panificación (Nevada, ▲), en fermentadores de 14 l a 625 rpm y 10 l aire/min.

para panificación fueron cercanos al 40% en relación al control. Las harinas de soya y de camarón permitieron bajos títulos del antibiótico, alrededor del 10%. Con sulfato de amonio o sólidos de cocimiento de maíz no se produjo estreptomina. Como se observa, solamente el residuo de cervecera podría considerarse como una fuente alternativa para la producción de estreptomina.

Los títulos de producción alcanzados al emplear los 4 productos de levadura, se resumen en la Tabla 34 con el fin de analizarlos. Aparentemente la diferencia en los títulos de producción alcanzados se debe al grado de ruptura celular de la levadura. Una característica esencial de la levadura de cerveza autolisada, es haber sido sometida a una autólisis exhaustiva en un proceso posterior a la obtención de la cerveza. Esto hace que los componentes intracelulares, específicamente las mananas presentes en la pared celular estén fácilmente accesibles al microorganismo, favoreciendo así la producción de estreptomina (810 mg/l). El caso opuesto es la levadura de panificación donde se tienen células completas, ya que las mananas están menos accesibles, el título de antibiótico alcanzado fue del 37% en relación al medio original. El residuo de cervecera es una levadura parcialmente lisada, obtenida al final de la fermentación de la cerveza cuando apenas se ha iniciado la lisis celular, esto hace que los constituyentes de la pared celular puedan ser aprovechados por el microorganismo permitiendo alcanzar títulos cercanos al obtenido con la levadura autolisada (710 mg/l). En el extracto de levadura, donde están ausentes los esqueletos de las paredes celulares, el título alcanzado fue del 52%. Un resultado similar fue reportado por McDaniel (1950), quien observó una reducción del 50% en el título de estreptomina al sustituir la levadura de cerveza por extracto de levadura.

Hockenhull (1960) e Inamine y col., (1969) reportaron que levadura, destilados solubles o mananas extraídas de paredes celulares de levadura, presentan un efecto estimulador sobre la síntesis de α -manosidasa, enzima que hidroliza el enlace manosídico de la manosidoestreptomina. Este derivado que se produce simultáneamente durante la fermentación, presenta una actividad antibiótica que es 5 veces menor a la de estreptomina. Cuando la síntesis de manosidasa es estimulada, se observa un aumento de la producción de estreptomina.

Aunque no se puede asegurar que la cepa empleada en el presente trabajo es capaz de producir manosidasa, el hecho de que el máximo título del antibiótico se alcance con la levadura autolisada, sugiere que su biosíntesis se estimula por la disponibilidad de las mananas presentes en la levadura.

Tabla 34

NIVELES DE ESTREPTOMICINA ALCANZADOS CON DIFERENTES
PRODUCTOS DE LEVADURA

	TITULO DE ESTREPTOMICINA (mg/l)	PRODUCCION RELATIVA
Levadura de cerveza autolisada	810	100
Residuo de cervecería	700	85
Levadura de panificación	298	37
Extracto de levadura	435	52

6.2 Fuente de carbono

En relación a la fuente de carbono, la glucosa se sustituyó por una maltodextrina (Amidex 30, Arancia Comercial, S.A. de C.V.). Los resultados obtenidos a partir de fermentaciones que se llevaron a cabo en los fermentadores de 14 litros, se muestran en la Figura 56. Como se observa, la cantidad de estreptomina obtenida en el medio con maltodextrina fue de 535 mg/l, que corresponde a un 65% de la alcanzada con glucosa. Se observó un aumento del pH de 5.9 a 6.6, a las 24 h de iniciada la fermentación lo que seguramente afectó el metabolismo del microorganismo.

Al respecto, Dulaney (1949) reportó que la utilización de polímeros de glucosa como dextrinas y almidones, no son tan malas fuentes de carbono, sin embargo los títulos de producción alcanzados son menores a los obtenidos con glucosa. Esto parece coincidir con los resultados obtenidos, por lo que la maltodextrina utilizada, no se consideró una buena alternativa para la producción de estreptomina.

6.3 Fuente de fosfato

El fosfato dibásico de potasio se sustituyó por fosfato dibásico de amonio y fosfato dibásico de sodio. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 57. Con el fosfato de sodio se alcanzó un título de estreptomina de 685 mg/l, que es el 84% en relación al control, el perfil de pH observado fue muy similar al obtenido con el fosfato de potasio, pero los valores a partir del segundo día fueron ligeramente mayores. Al utilizar fosfato dibásico de amonio no se produjo antibiótico y el pH mostró tendencia a bajar. Esta disminución del pH también se observó cuando se utilizó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. De acuerdo a Aharonowitz (1980), parece ser que existe un cierto tipo de "represión por amonio" cuando éste se encuentra en exceso.

Los resultados obtenidos sugieren que el fosfato dibásico de sodio podría ser una materia prima alternativa para la producción de estreptomina.

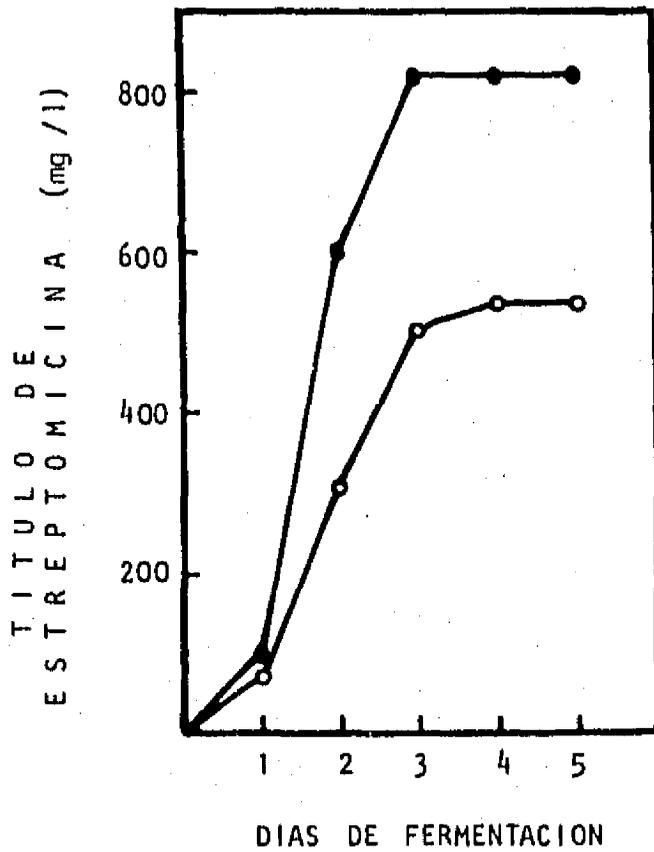


Fig. 56. Evolución de estreptomicina al cultivar S. griseus ATCC 12475 en presencia de glucosa (●) o de maltodextrina (○) en fermentadores de 14 l. a 625 rpm y 10 l de aire/min.

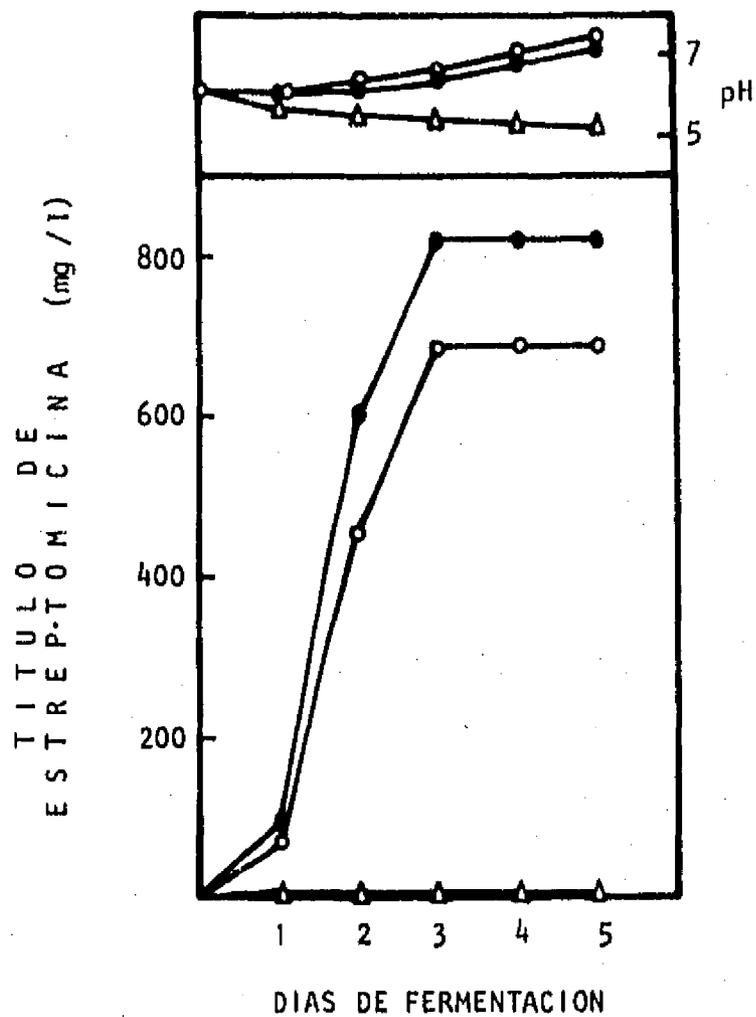


Fig. 57. Evolución de la producción de estreptomicina y del pH al cultivar *S. griseus* ATCC 12475 en presencia de fosfato dibásico de potasio (●), fosfato dibásico de sodio (○) o fosfato dibásico de amonio (Δ), en fermentadores de 14 l. a 625 rpm y 10 l de aire/min.

6.4 Cloruro de sodio

El cloruro de sodio se sustituyó por sal comestible. Los resultados obtenidos presentados en la Figura 58, muestran que el título de estreptomicina alcanzado a los 5 días de fermentación fue de 350 mg/l, que corresponde a un 42% del control. Posiblemente el yodo contenido en la sal comestible tiene un efecto negativo sobre la producción del antibiótico. Con base en este resultado no se recomendó la sustitución del cloruro de sodio por sal comestible.

6.5 Posibles modificaciones al medio de cultivo

Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de hacer algunas sustituciones, específicamente de las fuentes de nitrógeno y de fosfatos. En la Tabla 35, se muestra el costo por litro del medio original que fue de \$ 332 (MN). El costo unitario del producto fue de \$ 0.41/mg de estreptomicina.

Cuando la levadura de cerveza autolisada se sustituyó por el residuo de cervecería, el costo del medio de cultivo disminuyó notablemente, en un 48%. A pesar de que en este medio el título obtenido fue menor que en el medio original, el costo del producto fue de \$ 0.24/mg, que corresponde a un 60% del costo del medio original. Si bien el residuo de cervecería parece ser una buena alternativa para la producción de estreptomicina, es necesario evaluar con más profundidad su disponibilidad en el mercado y la influencia de su empleo sobre la recuperación del antibiótico, debido a la presencia de compuestos provenientes de la fermentación de la cerveza como el lúpulo y algunos nutrientes residuales, que no están presentes en la levadura autolisada empleada en el medio original.

Al sustituir el fosfato dibásico de potasio por fosfato dibásico de sodio, el costo del medio se redujo sólo en un 5%, y dado que el título de producción alcanzado fue menor al obtenido con el fosfato de potasio, el costo del producto se incrementó ligeramente a \$ 0.46/mg. A pesar de esto, la opción parece ser recomendable para cuando no haya disponibilidad del ingrediente original.

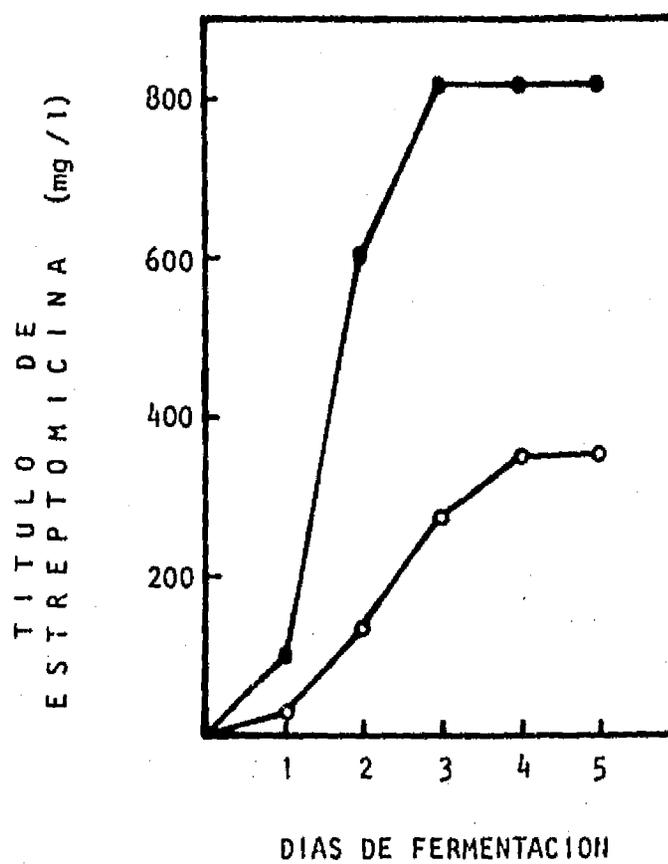


Fig. 58. Evolución de la producción de estreptomicina por *S. griseus* ATCC 12475, utilizando cloruro de sodio grado industrial (●) o sal comestible (○), - en fermentadores de 14 l. a 625 rpm y 10 l de - aire/min.

TABLA 35

OPCIONES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA

FUENTE DE MEDIO	ORIGINAL		OPCION 1		OPCION 2	
	ingrediente	\$(MN)/kg ^a	ingrediente	\$(MN)/kg ^a	ingrediente	\$(MN)/kg ^a
Carbono	glucosa	1,910	glucosa	1,910	glucosa	1,910
Nitrógeno	levadura autolisada	7,935	residuo de cervecería	2,000	levadura	7,935
Fosfatos	K ₂ HPO ₄	35,581	K ₂ HPO ₄	35,581	Na ₂ HPO ₄	22,800
Cloruro de Sodio	calidad USP	4,025	calidad USP	4,025	calidad USP	4,025
Antiespumante	Mazu-DF-7911	6,000	Mazu-DF-7911	6,000	Mazu-DF-7911	6,000
COSTO DEL MEDIO (\$/l)		332		172		315
PRODUCCION MAXIMA (mg EM ^b /l)		810		710		685
COSTO DE EM ^b EN BASE AL MEDIO (\$/mg EM ^b)		0.41		0.24		0.46

(a) Costo en Agosto de 1990.

(b) Estreptomicina

7. ESCALAMIENTO DE LA PRODUCCION DE ESTREPTOMICINA A NIVEL DE PLANTA PILOTO

El proceso fermentativo para la producción de estreptomicina se escaló a nivel de planta piloto, utilizando un reactor de 1400 litros, cuyo diseño y relaciones geométricas son similares a las de los fermentadores de 14 litros empleados. Consta de 3 impulsores de turbina tipo Rushton con 6 álabes planos, un difusor de anillo y 4 deflectores colocados de manera equidistante.

A partir de los resultados obtenidos en fermentadores de 14 litros, se estableció que el parámetro que determinó el éxito de la fermentación fue el k_{La} , razón por la cual se decidió llevar a cabo el escalamiento bajo el criterio de $(k_{La})_{\text{agua}}$ constante.

Previos experimentos realizados en el reactor de 1400 litros, permitieron obtener la expresión matemática que describe el efecto conjunto de las velocidades de agitación y aeración sobre el $(k_{La})_{\text{agua}}$, que es la siguiente:

$$(k_{La})_{\text{agua}} = 52.65 (N^3)^{0.373} (V_s)^{0.141} \quad (22)$$

donde el $(k_{La})_{\text{agua}}$ está expresado en h^{-1} , N en seg^{-1} y V_s en m/seg.

Utilizando la ecuación (22) se establecieron las condiciones de operación que fueron las siguientes:

volumen de operación	1000 litros
velocidad de agitación	250 rpm
velocidad de suministro de aire	500 l/min (0.5 vvm)
presión de operación	39 kN/m ² (0.4 kg/cm ²)
presión del aire de entrada	196 kN/m ² (2 kg/cm ²)

Bajo estas condiciones se obtuvo un $(k_{La})_{\text{agua}}$ de $180 h^{-1}$, medido a la misma temperatura y con la misma técnica utilizadas en los fermentadores de 14 litros. Este $(k_{La})_{\text{agua}}$, en el reactor de 1400 litros, corresponde a una velocidad de transferencia de

oxígeno (VTO) de 55 mmoles $O_2/l \times h$.

El medio se preparó de la manera acostumbrada, adicionando uno a uno los ingredientes al reactor, para permitir su disolución cada vez. El medio se esterilizó durante 40 min a $125^\circ C$ y una presión de 157 kN/m^2 (1.6 kg/cm^2). El fermentador se inoculó con 20 litros de un cultivo micelial de 24 horas de incubación, proveniente de 2 fermentadores de 14 litros, lo que dió una proporción de 2% (v/v). Durante el proceso se tomaron muestras en forma aséptica con lo cual se comprobó la pureza del cultivo.

En la Figura 59 se presentan los resultados obtenidos a lo largo de la fermentación. Como se observa, el microorganismo presentó una fase de adaptación de aproximadamente 24 horas, el crecimiento se inició a partir de las 24 horas, alcanzando su máximo, de 13.8 g/l a las 72 horas de fermentación. La velocidad específica de crecimiento calculada en la fase exponencial (μ_{max}) fue de 0.105 h^{-1} , valor muy cercano al obtenido en 14 litros, por lo que el tiempo de duplicación fue de 6.60 h.

La concentración de oxígeno disuelto en el cultivo se midió con un electrodo polarográfico. Como se muestra en la Figura 59, éste fue disminuyendo poco a poco llegando a un nivel crítico del 6% a las 60 horas, cuando se registró la máxima lectura de viscosidad relativa y terminó la fase de crecimiento exponencial. Pasado este tiempo, empezó a incrementarse llegando a 80% a las 90 h de fermentación.

El consumo de glucosa fue de 24% a las 24 horas, 65% a las 48 horas y 92% a las 72 horas. El perfil de pH fue similar al observado en 14 litros, se inició en 5.85 y fue incrementando constantemente hasta llegar a 7.35 al final de la fermentación.

La producción de estreptomicina se inició a las 36 horas, presentando un incremento de tipo exponencial hasta las 84 horas. El máximo título de antibiótico que se alcanzó a las 90 horas, fue de 795 mg/l, cifra que es muy cercana al máximo valor alcanzado en 14 litros.

La viscosidad relativa se incrementó a partir de las 24 horas, alcanzando el máximo a las 60 al término de la fase de crecimiento exponencial, después de este tiempo la viscosidad disminuyó a consecuencia de la lisis celular. Se decidió medir la viscosidad en la misma forma que se hizo en las fermentaciones de 14 litros, a fin de comparar los resultados obtenidos, pero adicionalmente, se tomaron lecturas con un viscosímetro de Brookfield (aguja 2, velocidad 3 rpm) encontrando valores por arriba de 7,500 cp a las 60 horas. Durante la fermentación fue posible observar a través de la mirilla zonas de poco movimiento, y la manera en que las burbujas de aire quedaron atrapadas en el caldo de cultivo como consecuencia del incremento en la

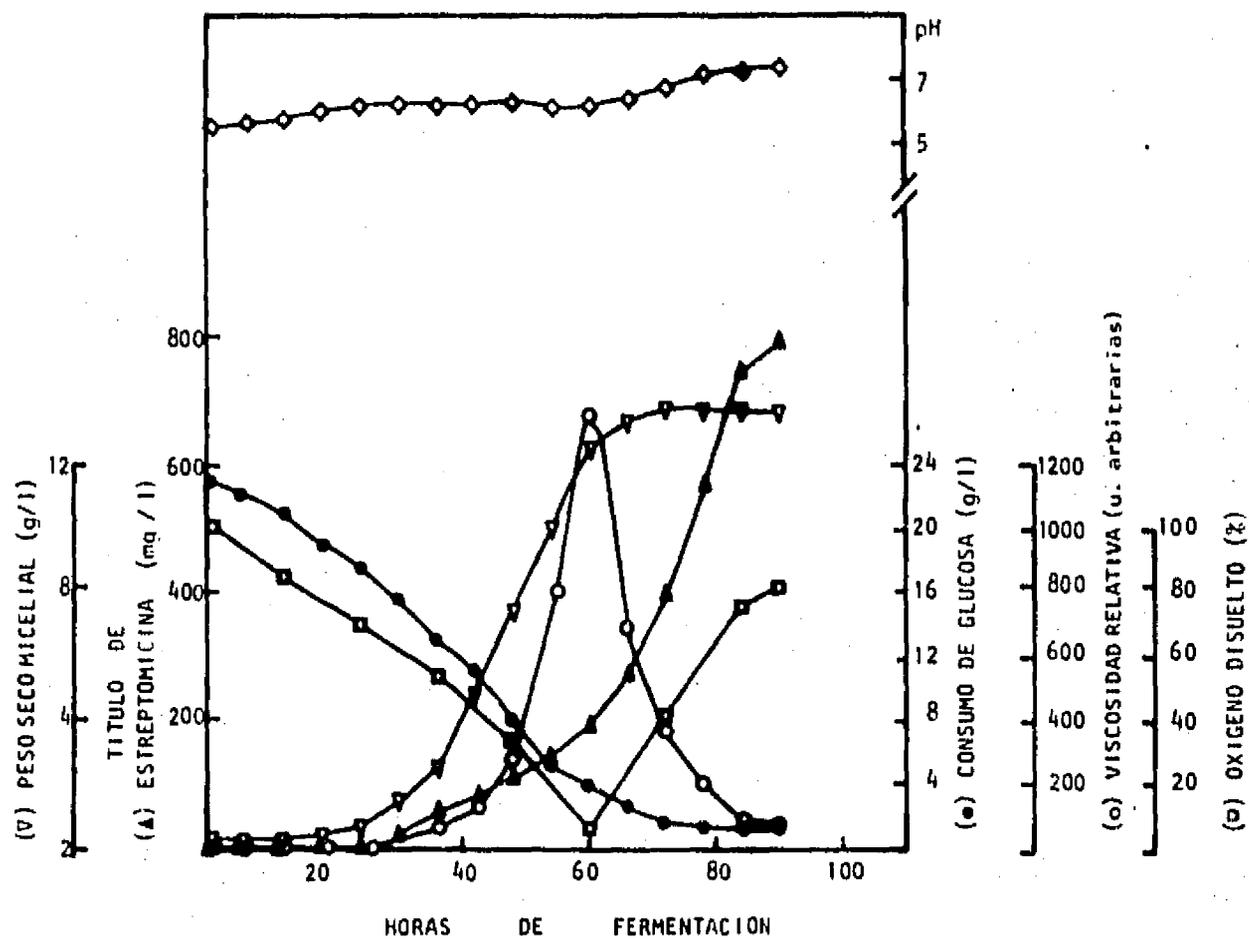


Fig. 59. Evolución de la fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 a nivel de planta piloto (1400 l) a 29°C, con agitación de 250 rpm y flujo de aire de 500 l/min (0.5 vvm).

viscosidad. Una toma fotográfica realizada a las 48 horas de fermentación, se presenta en la Figura 60B. Al final de la fermentación, la apariencia del caldo siguió siendo espesa, como se muestra en la Figura 60C, a pesar de que la viscosidad ya había disminuido notablemente.

Causas posibles del retraso en la fermentación, podrían ser la obtención del inóculo en 3 etapas o el prolongado tiempo de calentamiento durante la esterilización del medio, aspectos que no estuvieron presentes a nivel de 14 litros y que deberán ser evaluados. No obstante, los efectos del cambio de escala de operación sobre el proceso fermentativo deben ser tomados en consideración.

Entre los factores que afectan el comportamiento del microorganismo en un escalamiento ascendente se pueden citar: la hidrodinámica del reactor, la presión dentro del mismo y los esfuerzos cortantes que se generan durante la agitación, como los más importantes.

A pesar de haber observado un retraso en la producción, el hecho de haber alcanzado en planta piloto un título de estreptomycin similar al obtenido en fermentadores de 14 litros, es un resultado que se esperaba al haber escalado la fermentación bajo el criterio de $(k_L a)_{\text{agua}}$ constante.

Algunos estudios reportados en la literatura (Bartholomew y col., 1950a; Karow y col., 1953) indican haber realizado el escalamiento de la fermentación de estreptomycin bajo el criterio de $k_L a$ constante. Otros sugieren utilizar criterios como la potencia por unidad de volumen constante (P_g/V ; Bartholomew, 1960) o bien la combinación del $k_L a$ con otro parámetro que podría ser, el tiempo de mezclado o la velocidad en la punta del impulsor, ND_i (Bylinkina y Birukov, 1972).

El título de estreptomycin obtenido a nivel de planta piloto puede aún ser mejorado, a través de estudios más profundos que conduzcan a la optimización de las condiciones de operación a nivel de planta piloto. Entre los aspectos que deberán ser abordados de manera prioritaria, son la reducción de la fase de adaptación del microorganismo y el aumento en el coeficiente de transferencia de oxígeno que en este reactor sí puede ser incrementado fácilmente en virtud de que la presión de operación del mismo permite mayor solubilización del oxígeno, lo que permite alcanzar valores de C^* de 10 mg/l y valores de $(k_L a)_{\text{agua}}$ de hasta 350 h^{-1} .



Fig. 60. Fermentación de *S. griseus* ATCC 12475 a nivel de planta piloto. (A) vista del reactor de 1400 litros; (B) vista a través de la mirilla a las 48 h; (C) apariencia del caldo al final de la fermentación, 90 h.

8. ANALISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS TRES ESCALAS DE OPERACION

En este capítulo se discuten de manera comparativa los resultados obtenidos en las 3 escalas de operación. Los datos de la menor escala corresponden a lo obtenido con el medio optimizado, en matraces de 250 ml con deflectores a una fracción de llenado de 0.2, agitados a 200 rpm. Los resultados de fermentador de 14 l se obtuvieron a 625 rpm y 10 l aire/min (1 vvm) suministrado a través del difusor de anillo. A nivel de planta piloto se realizó una sola corrida de fermentación bajo las condiciones indicadas.

8.1 Modelos cinéticos de crecimiento

Los perfiles de crecimiento microbiano obtenidos en las tres escalas de operación mostrados en la Figura 61 fueron ajustados a un modelo logístico de crecimiento (Draper y Smith, 1981) representado por la ecuación:

$$x = \frac{x_{\max}}{1 + K e^{-kt}} \quad (23)$$

donde x = crecimiento celular, en g/l

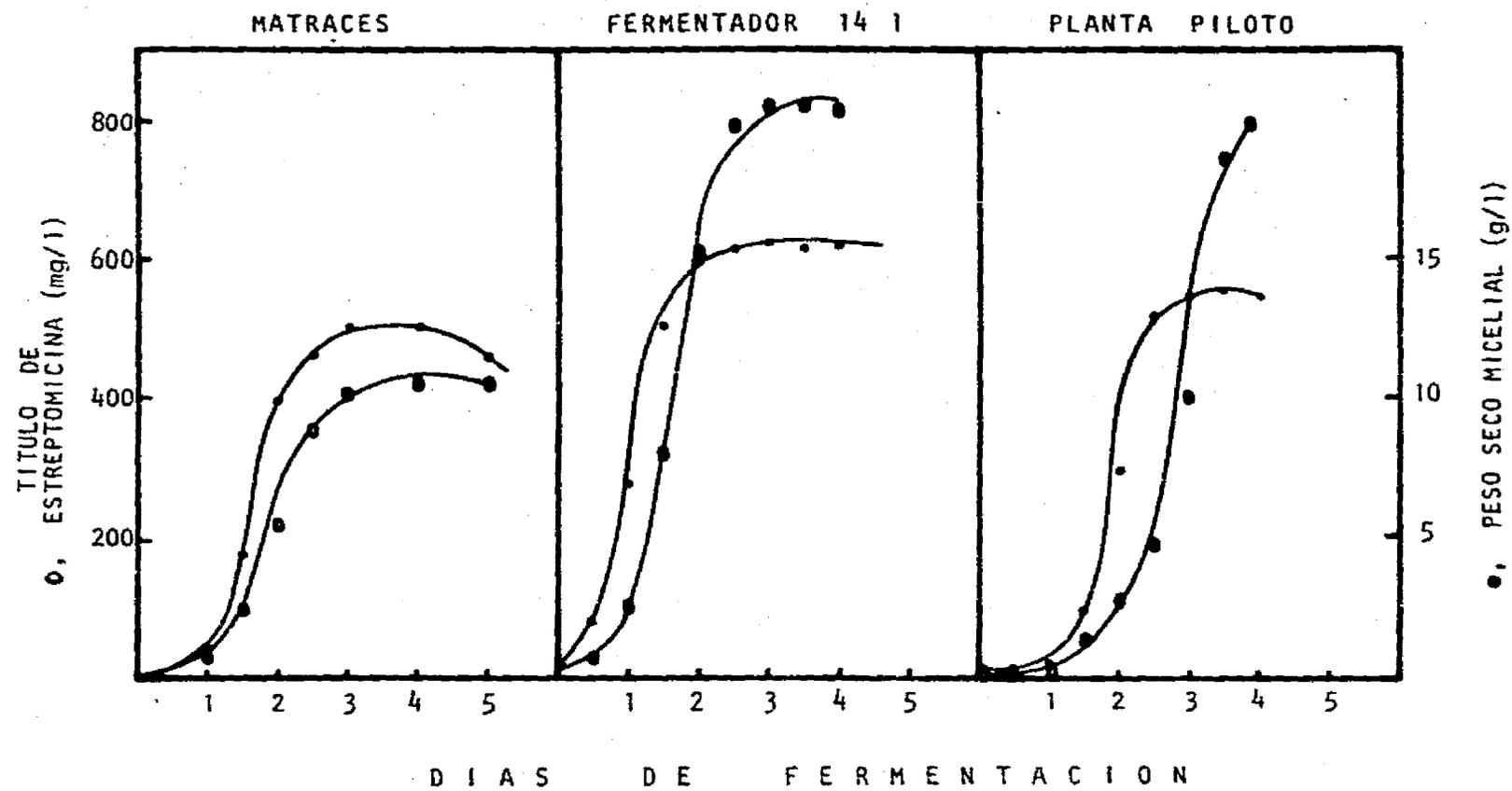
x_{\max} = crecimiento celular máximo alcanzado, en g/l

K = constante relacionada con la fase de adaptación

k = constante relacionada con la velocidad específica de crecimiento

t = tiempo de fermentación, en h

Los modelos matemáticos obtenidos con ayuda de computadora empleando el paquete estadístico Statgraphics (1987), se presentan en la misma Figura 61. Como se observa, el valor de la constante K en fermentadores de 14 litros tiene el valor más bajo de las tres escalas debido a que no se presentó fase de adaptación durante el crecimiento. A nivel de planta piloto, la fase de adaptación fue más larga que en matraces por lo que el valor de K fue el más alto. Los valores de la constante k que están relacionados con la velocidad específica de crecimiento,



$X = \frac{12.43}{1 + 455.53e^{-0.155t}}$	$X = \frac{14.51}{1 + 38.63e^{-0.15t}}$	$X = \frac{13.64}{1 + 1759.26e^{-0.167t}}$
---	---	--

Fig. 6i. Modelos de crecimiento durante la fermentación de estreptomycin en las 3 escalas de operación.

Tabla 36

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS MODELOS AJUSTADOS

1) Matraces

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	3	722.06	240.69	5028.76
Error	6	0.29	0.05	
Total	9	722.35		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9988$

2) Fermentador 14 l

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	3	1246.44	415.48	43615.25
Error	6	0.06	0.01	
Total	9	1246.50		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9997$

3) Planta Piloto

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Modelo	3	794.63	264.88	2077.68
Error	6	0.76	0.13	
Total	9	795.39		

Coefficiente de determinación, $R^2 = 0.9975$

fueron del mismo orden de magnitud. El análisis de varianza de los modelos ajustados se presenta en la Tabla 36.

El modelo logístico de crecimiento es aplicable a poblaciones que detienen su crecimiento cuando se reduce el espacio intercelular o se acumulan metabolitos tóxicos, más que por agotamiento de los nutrientes. En las tres escalas de operación, se observó que cuando los cultivos alcanzaron la más alta viscosidad, el crecimiento se detuvo y el consumo de glucosa también. En la Figura 61 se observa que los datos experimentales se ajustan muy bien a este tipo de modelo, esto podría sugerir que el crecimiento de S. griseus se detiene en parte, por una reducción del espacio intercelular causada por la morfología del microorganismo que al mismo tiempo hace menos disponible al oxígeno disuelto en el caldo y además, por la acumulación del propio antibiótico. Al respecto hacen falta más estudios que respalden el uso de estos modelos en el campo de las fermentaciones.

8.2 Modelos cinéticos de formación de producto

En la Figura 62 se presentan los perfiles de velocidades volumétricas de crecimiento (q_x) y de formación de producto (q_p) en función del tiempo. Se observa que la formación de estreptomycin fue parcialmente asociada al crecimiento. A nivel de matraces y de fermentador de 14 l ambos perfiles se traslapan en la primera mitad de la fermentación. En cambio a nivel de planta piloto, estos perfiles se separan ligeramente. Al calcular la velocidad específica de formación de producto en función de la velocidad específica de crecimiento, se confirmó que en los 3 casos la fermentación obedece a un modelo cinético de producción parcialmente asociado al crecimiento, en el que:

$$Q_p = \alpha \mu + \beta \quad (24)$$

donde μ = velocidad específica de crecimiento, h^{-1}
 Q_p = velocidad específica de formación de producto,
mg/g células x h.
 α = constante estequiométrica
 β = constante de proporcionalidad

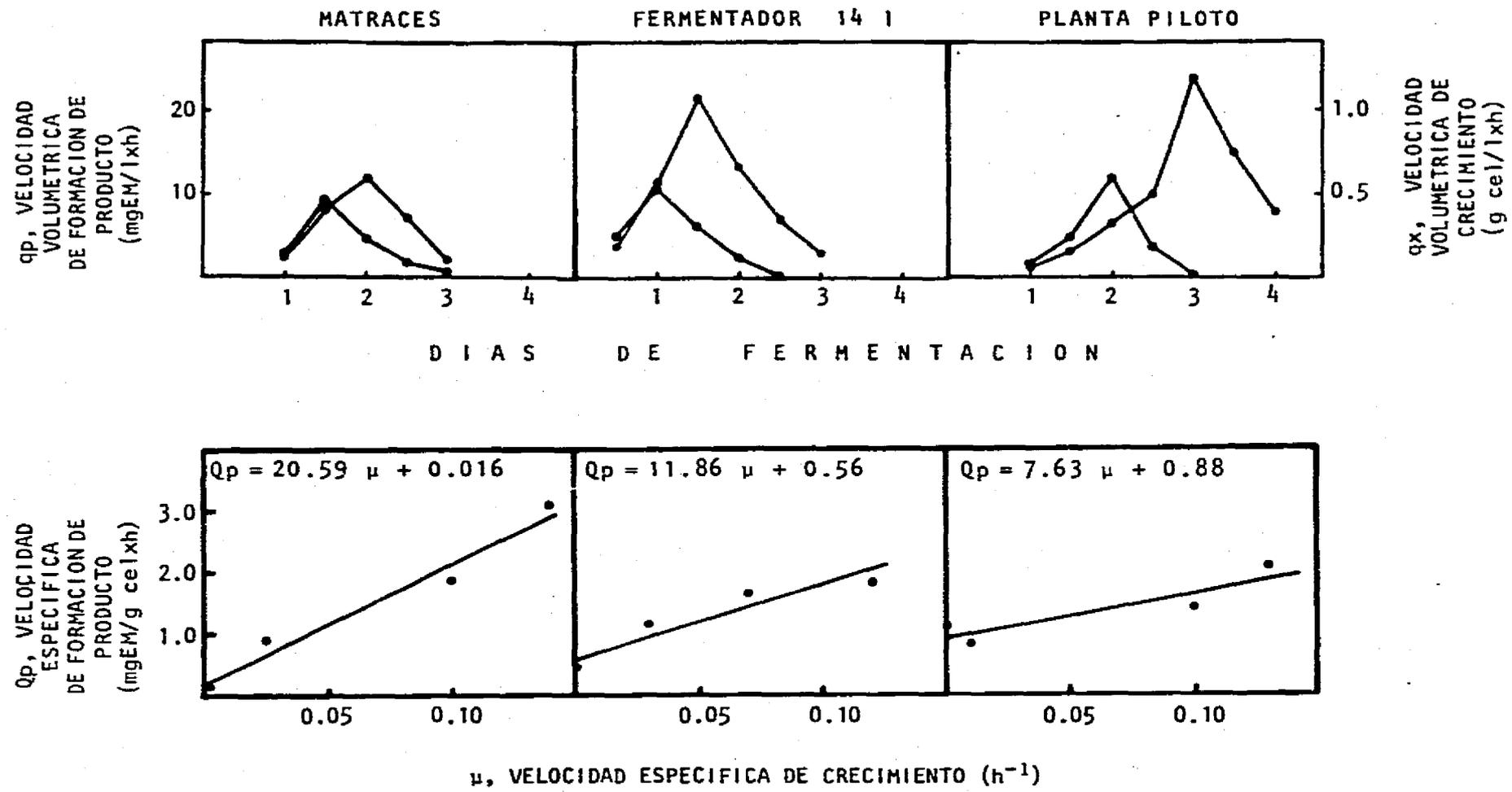


Fig. 62. Modelos cinéticos de producción de estreptomina en las 3 escalas de operación.

Los modelos matemáticos obtenidos se presentan en la misma Figura 62. Como se mencionó anteriormente, a nivel de matraces, la producción presentó una ligera tendencia a ser asociada al crecimiento, lo cual se confirma por el valor de β en el modelo, que es muy cercano a cero.

En fermentador de 14 litros, la producción del antibiótico continuó a pesar de haberse detenido el crecimiento, por lo que se observó claramente que se trata de un modelo cinético de producción parcialmente asociado al crecimiento. El valor de β aumentó y la pendiente α , se redujo con respecto a lo obtenido en matraces.

A nivel de planta piloto se observó un retraso en el crecimiento y por lo tanto el inicio de la producción, por lo que el valor de β fue mayor al observado en 14 litros y la pendiente α , fue menor. Este comportamiento mostró una ligera tendencia a ser un modelo no asociado al crecimiento.

Los datos reportados por Garner y col. (1953), Sikyta y col. (1959) y Hockenhull (1960), se trataron de manera similar encontrándose que la producción de estreptomina obedece a un modelo cinético de formación de producto parcialmente asociado al crecimiento, lo cual coincide con lo obtenido en este trabajo.

8.3 Comparación de los parámetros de fermentación

Con el fin de evaluar la eficiencia de las fermentaciones en las 3 escalas, se calcularon los parámetros de fermentación más comúnmente empleados, los cuales se presentan en la Tabla 37.

El crecimiento celular fue similar en los tres casos, observándose el mayor a nivel de 14.5 g/l en fermentadores de 14 litros, por lo que el rendimiento celular fue poco mayor que en las otras dos escalas. La velocidad de crecimiento calculada en la fase exponencial, fue muy similar en los tres casos.

El título de estreptomina aumentó considerablemente de 421 a 810 mg/l al llevar la fermentación de matraces a fermentador de 14 litros. Esto hizo que el título de producción específica y el rendimiento de producto en base a sustrato aumentaran en 66 y 92%, respectivamente. Los resultados obtenidos en planta piloto fueron muy semejantes a los observados en 14 l.

La productividad volumétrica obtenida en 14 litros fue 1.5 veces mayor que la de matraces, debido a que el incremento en la

TABLA 37

COMPARACION DE LOS PARAMETROS DE LA FERMENTACION DE ESTREPTOMICINA EN LAS TRES
DIFERENTES ESCALAS DE OPERACION^a

	MATRAZ	FERMENTADOR DE 14 l	FERMENTADOR DE 1400 l
crecimiento máximo (g/l)	12.5	14.5	13.8
rendimiento celular en base a sustrato (g cels/g glucosa)	0.54	0.63	0.60
velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}) (h ⁻¹)	0.096	0.102	0.105
título de estreptomicina (mg/l)	421	810	795
título de producción específica (mg/g cels)	33.68	55.86	57.61
rendimiento de producto en base a sustrato (mg/g cels)	18.30	35.22	34.57
productividad volumétrica máxima (mg/l x h)	4.39	11.39	8.83
productividad específica (mg/g x h)	0.35	0.79	0.64

^a datos calculados a partir de los perfiles presentados en la Figura 61.

TABLA 38

PARAMETROS DE LA FERMENTACION DE ESTREPTOMICINA
OBTENIDOS CON CEPAS DE S. griseus

	TITULO DE ESTREPTOMICINA (mg/l)	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO μ (h ⁻¹)	TIEMPO DE DUPLICACION (h)	RENDIMIENTO CELULAR $Y_{x/s}$	PRODUCTIVIDAD MAXIMA P_{max} (mg EM/l x h)	REFERENCIA
FERMENTADOR MATRACES AGITADOS	1000	0.052	13.33	0.44	1.04	Garner y col., 1953
	245	0.051	13.59	0.64	2.55	Hockenhull, 1960
	200	0.106	6.54	0.58	2.08	Hockenhull, 1960
	421	0.096	7.22	0.54	4.39	este trabajo ^a
FERMENTADOR	2450	0.159	4.36	0.23	24.5	Sikyta y col., 1959
	810	0.102	6.79	0.63	11.39	este trabajo ^a

^a datos calculados a partir de los perfiles presentados en la Figura 61.

transferencia de oxígeno permitió que el máximo título se alcanzara en un menor tiempo. En planta piloto la productividad volumétrica de 8.83 mg/l x h, fue menor a la de 14 litros por la presencia de una fase de adaptación y un retraso en la producción, por lo que a las 90 horas el título de antibiótico fue del mismo orden que el observado a las 70 horas en 14 litros.

En la Tabla 38 se comparan algunos parámetros de fermentación obtenidos en este trabajo, con los calculados a partir de datos reportados por otros autores. La velocidad específica de crecimiento fue mayor a las obtenidas de Garner y col. (1953) y Hockenhull (1960).

Los rendimientos celulares en base a sustrato obtenidos en este trabajo, entre 0.54 y 0.63 mg/g, en términos generales son altos, pero son muy cercanos a los reportados por Hockenhull (1960), de 0.58 y 0.64. Posiblemente el hecho de que los rendimientos obtenidos sean altos, se deba a que la levadura de cerveza autolisada también está siendo utilizada como fuente de carbono, esta situación se observó a nivel de matraces cuando se eliminaron uno a uno los ingredientes del medio de cultivo.

Las cifras de productividad son muy variadas ya que están en función de los títulos alcanzados. Comparando con los datos obtenidos de Sikyta y col. (1959), hay una diferencia de 3 veces en el título de estreptomycin y de 2 veces en la productividad, lo cual indica que el máximo título observado en este trabajo a nivel de 14 litros, se alcanzó en un tiempo más corto.

8.4 Perfil de prefactibilidad del proceso fermentativo a nivel comercial

Antes de iniciar el trabajo experimental, algunos de los resultados a obtener podían pronosticarse con base en lo reportado en la literatura. Sin embargo, era necesario desarrollar el proceso fermentativo que permitiera establecer la estrategia para dominar una tecnología de producción de estreptomycin, ya que este aspecto no puede ser adquirido por medio de la literatura.

A través de estudiar el efecto de los diferentes parámetros sobre la fermentación, fue posible optimizar en cada paso, las condiciones de operación bajo las cuales se alcanzó la máxima producción con la cepa empleada. Una vez que se han logrado estos objetivos, es necesario hacer un ejercicio que permita conocer la magnitud del título de producción que debe ser alcanzado, para que el proceso sea comercialmente atractivo.

Con la finalidad de conocer de manera preliminar, el monto de la inversión requerida al llevar el proceso a escala comercial, se realizaron algunos cálculos que se describen a continuación.

El volumen de caldo requerido anualmente (VCRA) se calculó con la siguiente relación:

$$VCRA = \frac{PAD}{P_{cepa} \times E_{rec} \times E_{planta}} \quad (25)$$

donde PAD = producción anual deseada, la cual se podría considerar de 40 ton, que es la mínima cantidad que se ha importado durante los últimos 10 años (ver Fig. 5).

P_{cepa} = título de estreptomicina obtenido con la cepa.

E_{rec} = eficiencia de recuperación, que en promedio es de 80 % (Florent, 1985).

E_{planta} = eficiencia de producción, la cual se ha reportado para plantas productoras de antibióticos de 85 % (Swartz, 1979; Datar, 1986).

El volumen requerido por corrida (V/corrida) se calculó considerando que se trabajen 336 días por año y que cada fermentación dure 5 días, mediante la siguiente relación:

$$V/corrida = \frac{VCRA \times 5 \text{ días}}{336 \text{ días}} \quad (26)$$

Para conocer el monto de la inversión únicamente de la sección de fermentación, se utiliza la siguiente relación que está basada en la experiencia de varias empresas mexicanas (CIT, 1985):

$$INVERSION = (N) (C) (f) \quad (27)$$

donde N = numero de reactores funcionando al 70 % de su capacidad,

C = costo unitario de los reactores, estimado a través de fabricantes,

f = 5.05 es el factor de Lang, que incluye los gastos de instalación e instrumentación en plantas de procesamiento de líquidos (Hacking, 1986).

El ejercicio se realizó con tres diferentes títulos de estreptomocina, el obtenido en este trabajo que fue de 820 mg/l, el más alto reportado en patentes de 13 g/l (Munteanu y col., 1981) y un valor obtenido por comunicación personal, que se alcanza a nivel industrial, de 20 g/l. Los resultados obtenidos al aplicar las relaciones establecidas anteriormente, se resumen en la Tabla 39.

Para tener una producción anual de 40 ton de estreptomocina utilizando la cepa empleada en este trabajo, se requieren 73,500 m de caldo por año. Esto significa que se necesitarían 32 reactores de 50,000 litros que corresponde a una inversión estimada de 113,120 millones de pesos (M.N.).

Si el título de producción se aumentara a 13 g/l, la inversión requerida se reduciría a 7,070 millones de pesos, y si se aumentara aún más, a 20 g/l, la inversión se reduciría a 4,040 millones de pesos. Este sencillo ejercicio ilustra el impacto que tiene el título de estreptomocina sobre la inversión que se requiere para instalar una planta de fermentación a nivel comercial. Esta es la razón por la que en general, se dice que en los procesos fermentativos, más aún en el caso de antibióticos, el punto determinante es la capacidad productora de la cepa que se utilice.

El máximo título de producción alcanzado por la cepa empleada, de 820 mg/l, es muy bajo si se compara con el máximo reportado en patentes, que es de 13 g/l (Munteanu y col. 1981), por lo que no se puede pensar que este trabajo constituye una tecnología para la producción de estreptomocina.

No obstante, es necesario hacer énfasis en el hecho de que este trabajo deja sentadas las bases de la estrategia para adquirir, asimilar, adaptar y dominar una tecnología extranjera, incluso se facilitaría su optimización e innovación. Y si el caso fuera solamente la adquisición de una cepa sobreproductora, el manejo de ésta y el desarrollo del proceso fermentativo estarían también basados en los resultados que ha generado este trabajo.

TABLA 39

IMPACTO DEL TITULO DE ESTREPTOMICINA SOBRE
LA INVERSION ESTIMADA PARA FERMENTACION*

TITULO DE ESTREPTOMICINA (g/l)	VOLUMEN DE CALDO REQUERIDO ANUALMENTE (m ³)	INVERSION ESTIMADA PARA FERMENTACION (Millones de pesos M.N.)
0.820	73,500	113,120
13.00	4,525	7,070
20.00	3,000	4,040

*La base de cálculo fue 40 ton de estreptomicina como sal en polvo.

VII. INTEGRACION DE LOS RESULTADOS

Al inicio del proyecto, se planteó la necesidad de desarrollar un proceso fermentativo para la producción de estreptomicina que permitiera definir en cada escala de operación, las condiciones óptimas para alcanzar los máximos títulos del antibiótico. Una vez que se ha concluido este trabajo, al integrar los resultados obtenidos se observa que el título de estreptomicina se llevó de 240 mg/l a 910 mg/l, que corresponde a un incremento de 3.8 veces. En este capítulo se pretende discutir las posibles razones que condujeron a mejorar la fermentación de estreptomicina, tomando como referencia la actividad microbiana.

En términos generales, los aspectos que permitieron aumentar el título de estreptomicina fueron, la optimización del medio y la mejora en las condiciones de oxigenación del cultivo.

Con el medio optimizado, a nivel de matraces se observó un aumento en el título del antibiótico de 280 a 421 mg/l, que corresponde a 52 %, esto permitió un aumento de 32% en la producción específica; de 50% en la productividad volumétrica y de 34% en la productividad específica, con respecto a la fermentación con el medio sin optimizar (Tabla 23).

De los ingredientes del medio, la concentración de glucosa fue la que sufrió una variación más notable, ya que se aumentó de 1 a 2.3 g/l. Tomando como base que la glucosa es el precursor común de las tres subunidades de la molécula de estreptomicina (Florent, 1985), el incremento observado en la producción y productividad específicas, que son parámetros que reflejan lo que sucede a nivel celular, podría sugerir que al aumentar la disponibilidad de glucosa en el medio, se le permitió a las células no sólo satisfacer sus requerimientos nutricionales para aumentar su nivel de crecimiento, sino también canalizar una mayor proporción de glucosa hacia la síntesis del antibiótico.

Al haber encontrado la concentración óptima de los ingredientes del medio, se estableció un balance entre los nutrientes que permitió a las células de S. griseus, ser más eficientes en relación a la síntesis del antibiótico.

El otro aspecto que permitió aumentar el título de estreptomicina fue el aumento en la disponibilidad de oxígeno en el cultivo. Aunque en la literatura se menciona de manera general, que el nivel de oxigenación es de gran importancia en las fermentaciones de estreptomicetos, se conoce poco de la magnitud de su efecto sobre la fermentación. En este trabajo, al realizar experimentos a nivel de matraz, se constató de manera cualitativa la influencia de la oxigenación sobre la fermentación al variar el tipo de matraces y el volumen

de medio contenido en éstos. A nivel de fermentadores de 14 litros se cuantificó el coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$), mediante un método que reflejó el comportamiento hidrodinámico del reactor en las diferentes condiciones de operación, esto permitió estudiar cuantitativamente el efecto del oxígeno sobre producción de estreptomicina.

A partir de las determinaciones del $k_L a$ realizadas en los fermentadores de 14 litros (Fig. 39), se vislumbró la posibilidad de tener una correlación que permitiera expresar conjuntamente el efecto de las variables medibles del sistema empleado, que son N y V_s , sobre el $k_L a$. Esta correlación quedó establecida en la ecuación 11 como sigue:

$$(k_L a)_{\text{agua}} = K' (N^3)^{\alpha'} (V_s)^{\beta'}$$

la aplicación de dicha correlación a los valores experimentales se presentó en la Fig. 42. Al mismo tiempo, las fermentaciones preliminares realizadas en 14 litros mostraron la influencia del $k_L a$ sobre la producción de estreptomicina (Fig. 41) y consecuentemente el efecto de las variables N y V_s (Fig. 40). Estos aspectos sugirieron que en la medida que se pudiera mejorar la transferencia de oxígeno en el reactor, se estaría favoreciendo de manera directa la producción del antibiótico. Las acciones que se tomaron entonces, fueron las siguientes: 1) aumentar el número de burbujas de aire en la corriente de entrada, 2) incrementar la velocidad de agitación de los impulsores, y 3) aumentar la velocidad de suministro de aire.

Para incrementar el número de burbujas, se probaron tres diferentes difusores. Tomando como referencia los resultados de las fermentaciones utilizando el difusor de un solo orificio, el incremento en la producción específica al emplear los difusores de anillo y de placa porosa, fue de 14%. Con ambos se observó una reducción en el tiempo de fermentación, por lo que la productividad volumétrica se incrementó en 60% para el difusor de anillo y 80% para el de placa. La productividad específica se incrementó 52% en ambos casos, estos resultados se presentan en la Figura 63. Aunque la productividad volumétrica obtenida con el difusor de placa porosa resultó ser más alta que con el de anillo, la producción y la productividad específicas resultaron ser iguales con los dos difusores. Estos resultados, además de otros aspectos como el problema del taponamiento de la placa durante las fermentaciones, la dificultad para su limpieza y el hecho de que con el difusor de anillo el reactor de 14 litros puede describir un comportamiento hidrodinámico similar al que se tiene en el de planta piloto, fueron las razones que apoyaron el uso del difusor de anillo para optimizar las condiciones de operación en los fermentadores de 14 litros.

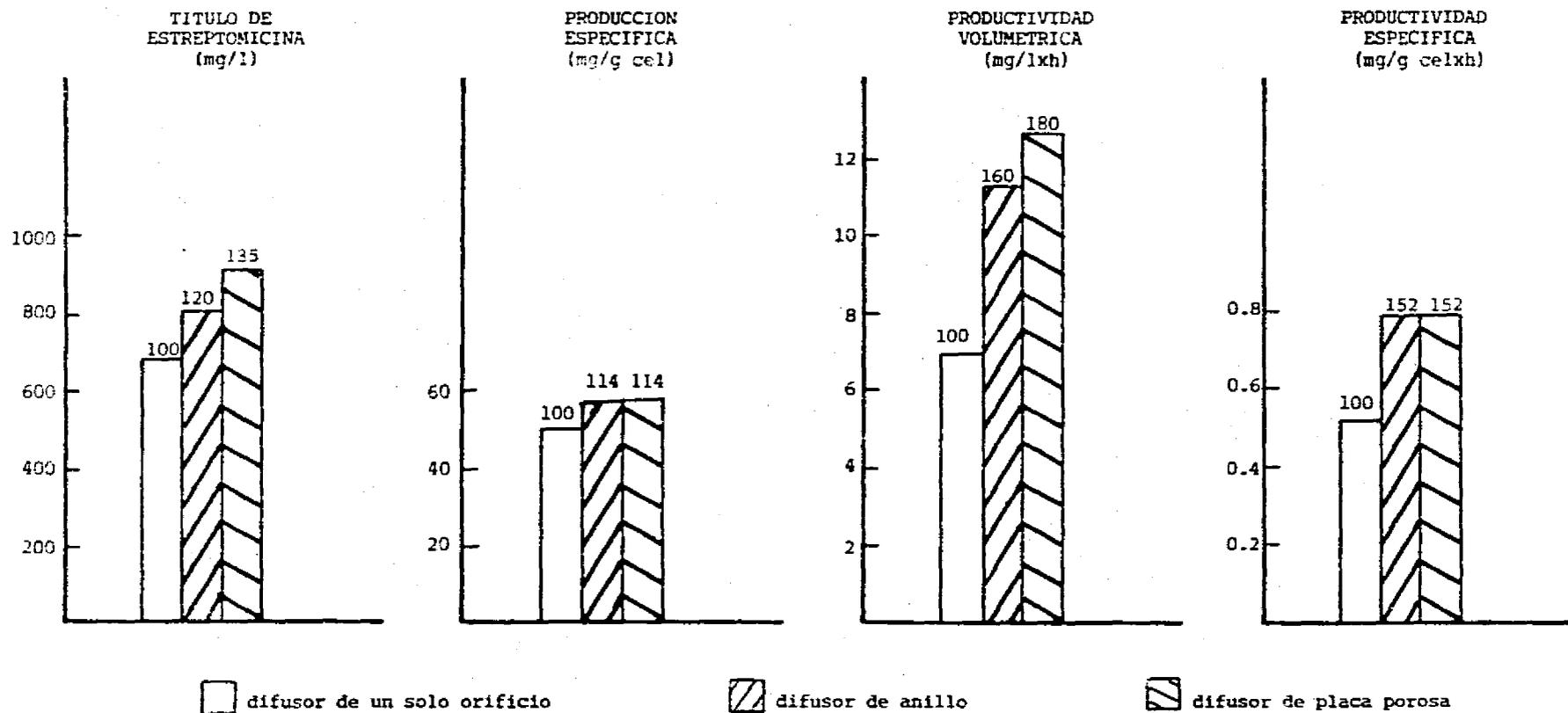


Fig. 63. Efecto del tipo de difusor sobre la fermentación de estreptomicina a nivel de 14 litros. Las cifras sobre las barras están expresadas como valores relativos.

Para analizar el efecto de la velocidad de agitación se tomó como punto de referencia 400 rpm. Los incrementos logrados en la producción específica a 475, 550 y 625 rpm, fueron 118, 238 y 291%; en la productividad volumétrica 136, 275 y 441% y en la productividad específica 120, 240 y 426%, respectivamente. La notable mejora en productividad, lograda a 625 rpm fue debido a una reducción en el tiempo de fermentación. Estos resultados se resumen en la Figura 64.

Cuando se probaron diferentes velocidades de suministro de aire al cultivo, se tomó como referencia la fermentación realizada con 0.5 vvm. Los resultados obtenidos a 1.0 y 1.5 vvm corresponden a mejoras de 24 y 12% en producción específica, de 54 y 57% en la productividad volumétrica y de 65 y 50% en la productividad específica, respectivamente. Estos datos se presentan en la Figura 65. Como podrá observarse, los resultados al utilizar 1.5 vvm no son mejores que los obtenidos con 1.0 vvm, esto se debe a que no hay una mejora en la transferencia de oxígeno y dado que el caldo se hizo más viscoso por un incremento en la masa celular, repercutió directamente en la producción y productividad específicas.

Con los resultados obtenidos se obtuvo la ecuación 15 que fue:

$$(k_{La})_{\text{agua}} = 20.23 (N^3)^{0.318} (V_s)^{0.042}$$

la cual se aplicó a otras expresiones empíricas que resaltan el efecto del k_{La} sobre el título de producción (ecuación 14), el rendimiento (ecuación 17) y la productividad (ecuación 18).

En las fermentaciones realizadas en 14 litros, también se observó que al aumentar el k_{La} el microorganismo tendió a aumentar su actividad celular que se reflejó en el aumento de la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max} , Fig. 51). Estos resultados sugieren que al incrementar la disponibilidad de oxígeno en el cultivo, se está permitiendo a las células ser más eficientes tanto para actividades metabólicas como biosintéticas. La explicación de lo que está sucediendo puede darse desde dos puntos de vista uno fisico-químico y otro bioquímico.

Desde el punto de vista fisico-químico Wang y Fewkes (1977) mencionan que al incrementarse la velocidad de agitación, que es la variable de mayor influencia sobre el k_{La} , ocasiona una mayor disgregación del micelio, de tal forma que se tiene una mayor área superficial de "células activas". Aunque la cepa de S. griseus empleada en este trabajo no tiende a formar agregados de la misma manera que lo hacen otras cepas de Streptomyces, la posibilidad de que un fenómeno semejante suceda queda abierta, dado que el microorganismo crece como micelio filamentoso. En este caso, la agitación puede hacer que los filamentos sean más

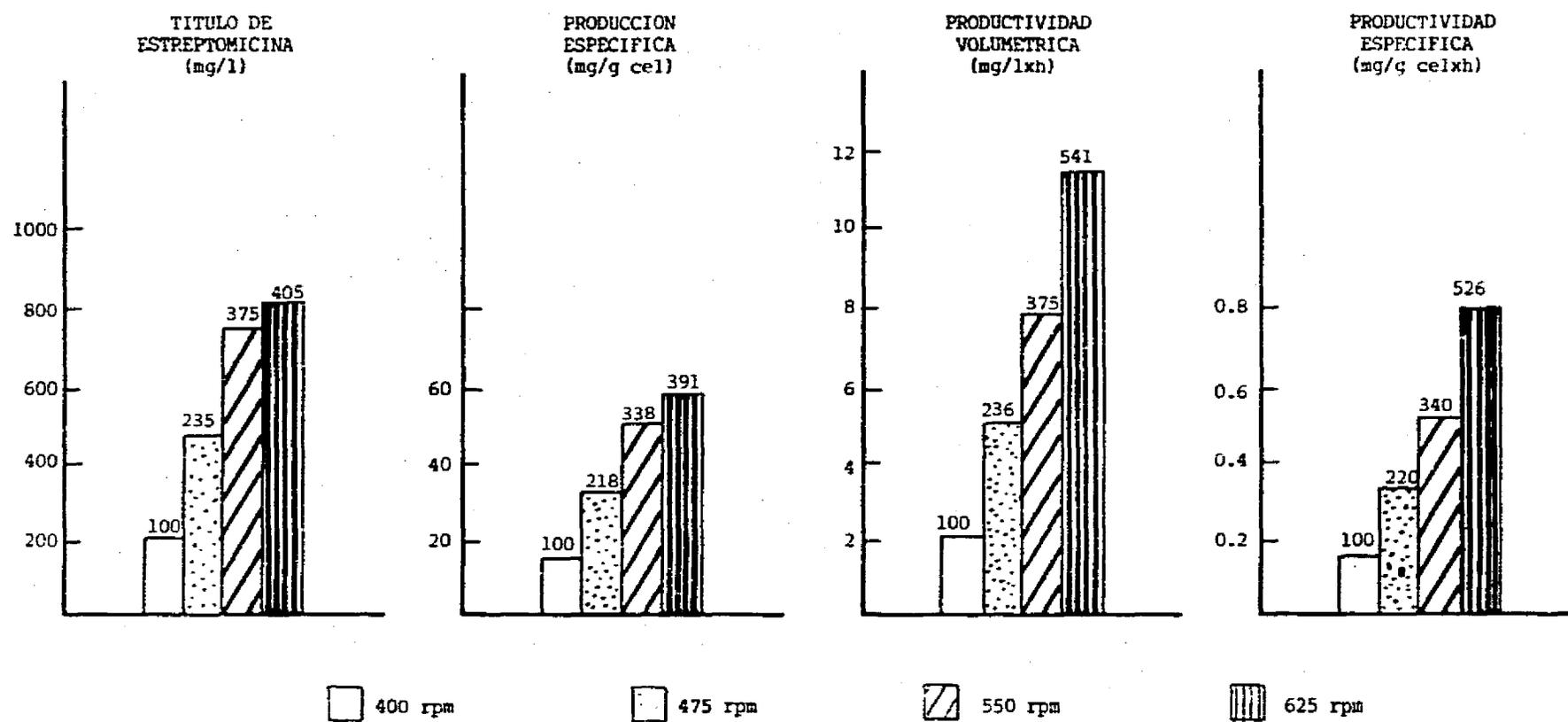


Fig. 64. Efecto de la velocidad de agitación sobre la fermentación de estreptomina a nivel de 14 litros. Las cifras sobre las barras están expresadas como valores relativos.

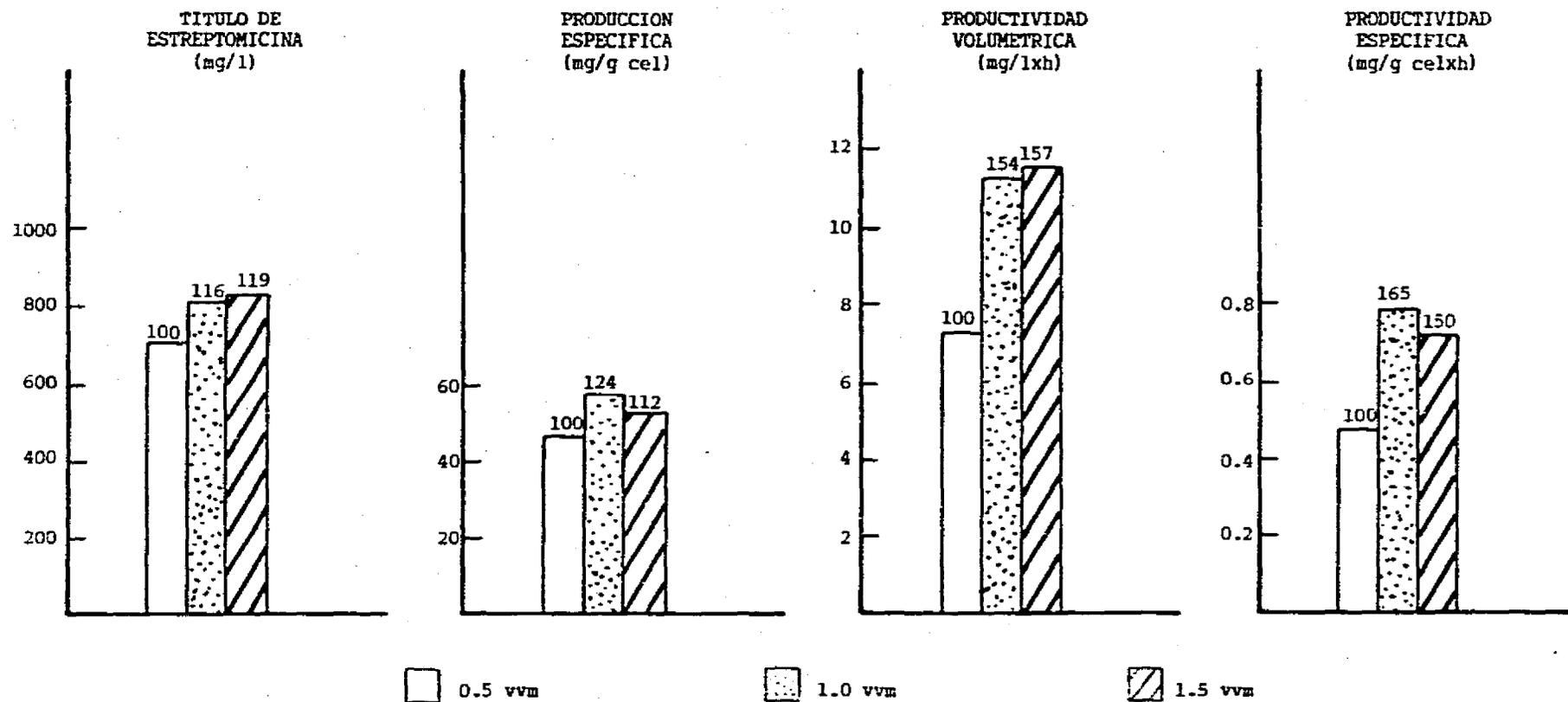


Fig. 65. Efecto de la velocidad de aeración sobre la fermentación de estreptomicina a nivel de 14 litros. Las cifras sobre las barras están expresadas como valores relativos.

cortos, favoreciendo así la transferencia de masa intracelular. Un efecto de este tipo podría comprobarse haciendo observaciones al microscopio y midiendo el tamaño de las células.

Desde el punto de vista bioquímico, Mukhopadhyay y Ghose (1976) mencionan que los requerimientos de las células por oxígeno son más pronunciados cuando hay competencia de éste entre caminos biosintéticos y respiratorios. En estos últimos estarían incluidos tanto los mecanismos de elaboración de citocromos, como los mecanismos generadores de NADH que finalmente es convertido a energía en forma de ATP. Este último, a su vez, está involucrado en el sistema de transporte activo del oxígeno al interior de la células. Por otro lado, el oxígeno puede también jugar un papel regulatorio sobre ciertas enzimas biosintéticas y así alterar caminos metabólicos, en tales casos su participación sería indirecta, tal vez mediada por la disponibilidad de poder reductor y los niveles de ATP. En la Figura 66 se presenta un esquema general de la participación del oxígeno en el metabolismo microbiano, en el puede observarse cómo el oxígeno está involucrado directa o indirectamente en una gran cantidad de eventos que suceden en el interior de la célula.

Se ha mencionado que *S. griseus* utiliza dos vías de degradación de glucosa: la glicólisis (Embden-Meyerhof) y la hexosa monofosfato, también llamada pentosa fosfato ó Warburg-Dickens (Silverman y Rieder, 1960). La vía hexosa-monofosfato no es la principal vía de generación de energía, rinde la mitad de ATP en relación a la glicólisis, pero provee las moléculas de pentosa-P necesarias para la síntesis de nucleótidos y el NADPH₂ requerido como poder reductor. De acuerdo a Martín (1977), la célula define la ruta que se va a seguir en función de los niveles de fosfato en el medio, que finalmente actúan como un control fino del ATP sobre las enzimas responsables de la ramificación.

Cuando hay más disponibilidad de oxígeno en el medio, se reduce la acumulación de lactato y piruvato, comportamiento que fue observado por el aumento en el pH del cultivo durante la fermentación. Esto hace pensar que la glucosa se esté metabolizando inicialmente vía glicólisis, al haber más disponibilidad de oxígeno el piruvato llega al ciclo del ácido cítrico inmediatamente y se continúa hacia la fosforilación oxidativa, lo que permite generar el ATP requerido para la síntesis de material celular. Una vez que el ATP alcanza ciertos niveles, se inhibe la actividad de la fosfofructokinasa, lo que hace que se acumule fructosa-6-P, la cual se transforma nuevamente en glucosa-6-P mediante la fosfoglucosa isomerasa. Es entonces cuando la glucosa-6-P se metaboliza vía hexosa monofosfato lo que permite la generación de poder reductor necesario para biosíntesis. La conversión de glucosa-6-P a 6-fosfoglucono-s-lactona es irreversible y es controlada por el nivel de NADP⁺. Si los requerimientos celulares de NADPH, ribosa-5-P y ATP son bajos,

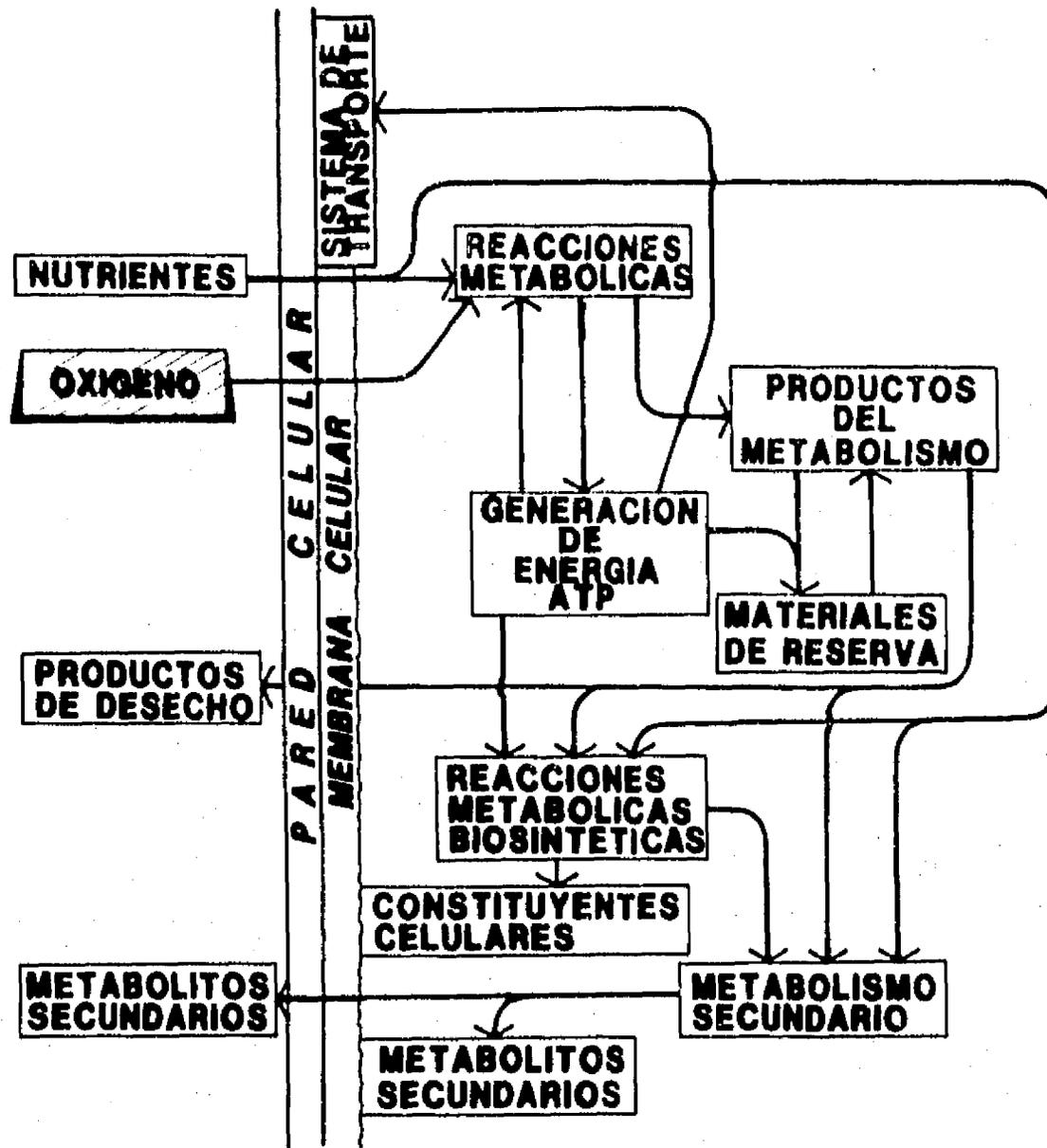


Fig. 66. Esquema general de la participación del oxígeno en el metabolismo microbiano (Mukhopadhyay y Chose, 1976).

entonces la reacción no procede y se acumula glucosa-6-P. Es entonces cuando esta glucosa-6-P se dirige hacia la ruta biosintética de estreptomina, donde de manera ordenada se convierte en inositol-1-P, en glucosa-1-P y en glucosamina-6-P que son los primeros intermediarios de la biosíntesis de estreptomina. Las reacciones enzimáticas involucradas en este camino aparentemente no son controladas por los niveles de energía, las dos fosforilaciones que ocurren, son precedidas de desfosforilaciones. Otros posibles puntos de control en el ciclo del ácido cítrico son las conversiones de piruvato en acetil CoA y de isocitrato a α -cetoglutarato, que se ven inhibidas por la presencia de altos niveles de ATP. Al verse afectada la actividad en este ciclo, la síntesis de material celular se podría también ver reducida. En la Figura 67 se muestra un esquema en donde se han integrado los caminos que toma la glucosa y los posibles puntos de control citados.

Dado que prácticamente en todos los casos el porcentaje de incremento en masa celular fue muy bajo en relación al aumento en el título de estreptomina, podría decirse que las células al estar siendo más eficientes para la síntesis de estreptomina es porque bien podrían estar sujetas a un control por carga energética, mecanismo en el cual los caminos generadores de ATP (catabólicos) se inhiben por altas cargas energéticas, mientras que los caminos que requieren ATP (anabólicos) son estimulados por altas cargas de energía (Stryer, 1988).

En virtud de que el oxígeno resulta ser un elemento esencial en las fermentaciones de estreptomina y que bien pudiera estar involucrado en los caminos biosintéticos y de crecimiento de la célula a través de un control de la carga energética, sería ideal estudiar más a fondo el efecto del oxígeno a nivel de las enzimas involucradas en la ramificación de las rutas que toma la glucosa-6-P en las fermentaciones de *S. griseus*. Aquí es necesario enfatizar, que hasta la fecha no se han reportado estudios de este tipo, tal vez, debido a que el oxígeno al ser un gas presenta dificultades para ser manipulado, su baja solubilidad en sistemas acuosos que se reduce más aún en presencia de sales, además de la dificultad de rastrearlo dentro de las células, son algunos aspectos que han impedido el avance de estudios encaminados a establecer el papel regulador del oxígeno en caminos degradativos y biosintéticos. Otro aspecto no menos interesante, sería tomar como base los resultados hasta ahora obtenidos y seguir optimizando la fermentación integrando el nivel de oxigenación a la lista de variables, es decir, que durante la optimización se traten simultáneamente las condiciones de operación y los ingredientes del medio de cultivo, ya que no pueden descartarse ninguna de las variables que tienen efecto sobre la actividad microbiana como son las relaciones entre carbono, nitrógeno, fósforo y oxígeno, además de la fuerza iónica, el pH y la presencia de estimuladores y cofactores, entre otros.

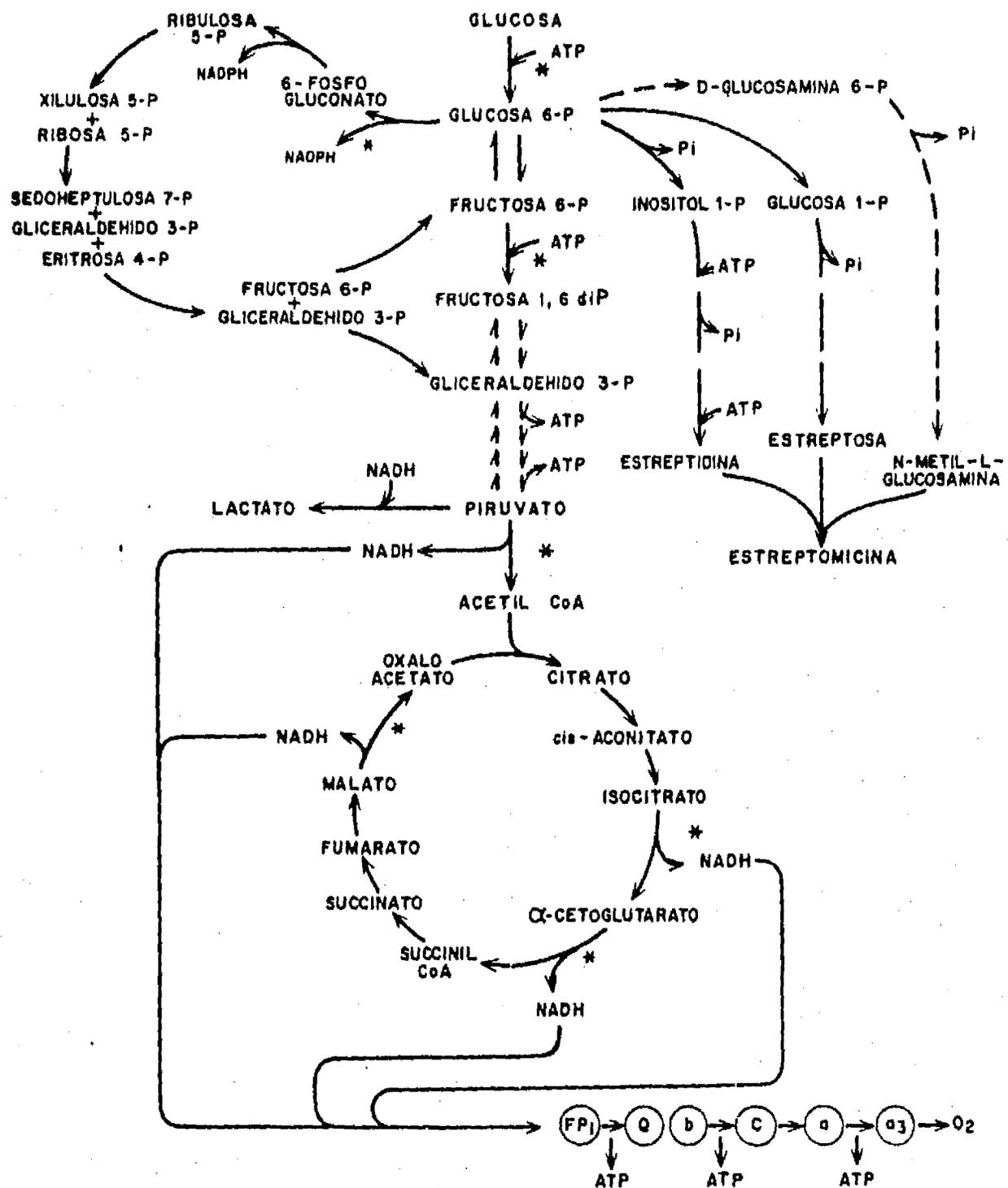


Fig. 67. Integración de rutas metabólicas y biosintéticas en *Streptomyces griseus*. * Reacciones sujetas a control.

VIII. CONCLUSIONES

1. Con un medio conteniendo levadura de cerveza autolisada, glucosa, sales industriales grado alimenticio y agua de la llave, Streptomyces griseus ATCC 12475 produjo un título de estreptomicina de 240 mg/l en 3 días, que fue el más alto en comparación con otros medios probados, por lo que fue seleccionado para la producción del antibiótico.
2. El mismo medio de cultivo presentó ventajas para ser utilizado durante la propagación de las esporas del microorganismo.
3. S. griseus ATCC 12475 mostró variabilidad en la producción de estreptomicina, de 4.28% en un mismo experimento y de 10.94% en diferentes experimentos, por lo que se incluyeron tres repeticiones de cada variable a evaluar.
4. El tipo de matraces, la fracción de llenado de los mismos y la velocidad de agitación, influyeron de manera importante sobre la producción de estreptomicina. El título más alto, de 295 mg/l, se alcanzó en matraces con deflectores de 250 ml conteniendo 50 ml de medio (fracción de llenado de 0.2), a una velocidad de agitación de 200 rpm.
5. El agua de la llave no afectó negativamente la producción de estreptomicina y no se requirió la adición de los elementos traza Fe^{++} , Zn^{++} y Ca^{++} .
6. A un pH inicial entre 5.5 y 6.5, se obtuvo el máximo título del antibiótico.
7. El título de producción de estreptomicina no se vió disminuído al eliminar del medio de cultivo sulfato de magnesio y nitrato de sodio, por lo que se redujo a 4 el número de ingredientes.
8. La metodología de superficie de respuesta mostró ser una herramienta útil para la optimización del medio de cultivo.
9. Con el medio optimizado se alcanzó un título de estreptomicina de 421 mg/l, que corresponde a un aumento del 52% con respecto al medio sin optimizar.
10. En fermentadores de 14 litros se confirmó que la transferencia de oxígeno determina el título de estreptomicina. El valor más alto, de 835 mg/l en 3 días, se alcanzó a una velocidad de agitación de 625 rpm y un suministro de aire a través de un difusor de anillo, de 15 l/min (1.5 vvm).

11. Se obtuvo un modelo matemático que describe el efecto conjunto de las velocidades de agitación (N , expresada en seg^{-1}) y de aeración (V_S , expresada en cm/seg) sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno $(k_{L,a})_{\text{agua}}$ (expresado en h^{-1}) en fermentadores de 14 litros con difusor de anillo, que no ha sido reportado hasta la fecha:

$$(k_{L,a})_{\text{agua}} = 20.23 (N^3)^{0.318} (V_S)^{0.042}$$

12. Se obtuvo un modelo matemático que expresa la influencia del $(k_{L,a})_{\text{agua}}$ (expresado en h^{-1}) sobre el título de producción (EM), que hasta ahora no ha sido reportado:

$$EM = 9.21 (k_{L,a})_{\text{agua}} - 816.59$$

13. Se obtuvo un modelo matemático que expresa la productividad volumétrica máxima, P_{max} (expresada en $\text{mg}/\text{l} \times \text{h}$) en función del $(k_{L,a})_{\text{agua}}$ (expresado en min^{-1}), que hasta la fecha no se ha reportado:

$$P_{\text{max}} = 0.21 (k_{L,a})_{\text{agua}}^{3.57}$$

14. El rendimiento de producto en base a sustrato, $Y_{EM/S}$ (expresado en mg/g glucosa) también se relacionó con el $(k_{L,a})_{\text{agua}}$ (expresado en min^{-1}), mediante el siguiente modelo matemático que no se ha reportado hasta ahora:

$$Y_{EM/S} = 24.45 (k_{L,a})_{\text{agua}} - 37.24$$

15. Adicionalmente se obtuvo un modelo matemático que expresa el efecto del $(k_{L,a})_{\text{agua}}$ (en min^{-1}) sobre la velocidad específica de crecimiento máxima, μ_{max} (en h^{-1}), que al igual que las expresiones anteriores, no ha sido reportado a la fecha:

$$\mu_{\text{max}} = 0.0156 (k_{L,a})_{\text{agua}} + 0.0802$$

16. La disponibilidad de las mananas presentes en las paredes celulares de las levaduras, parece jugar un papel importante en la producción del antibiótico por *S. griseus* ATCC 12475, ya que el título más alto se obtuvo con levadura de cerveza autolisada. No obstante, el residuo de cervecera parece ser una buena opción para sustituir a la levadura de cerveza autolisada en el medio de cultivo.

17. Cuando el proceso fermentativo se escaló a nivel de planta piloto bajo el criterio de $(k_{La})_{\text{agua}}$ constante, se obtuvo un título de estreptomycin de 795 mg/l, que es muy cercano al obtenido en 14 litros, sin embargo, éste se alcanzó a las 90 h de fermentación, posiblemente debido al efecto del escalamiento sobre el proceso mismo.

18. La velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial (μ_{max}) fue 0.121, 0.127 y 0.130 h^{-1} , para las tres escalas de operación, matraces, 14 litros y planta piloto, respectivamente.

19. El incremento en la masa celular obtenido en las 3 escalas de operación se ajustó a un modelo logístico de crecimiento, el cual se ha explotado muy poco en el campo de las fermentaciones:

$$x = \frac{x_{\text{max}}}{1 + K e^{-kt}}$$

20. El modelo cinético de formación de estreptomycin, que hasta la fecha no ha sido reportado, mostró ser parcialmente asociado al crecimiento microbiano en las 3 escalas de operación.

21. El proceso fermentativo fue mejorado durante el desarrollo del trabajo, ya que se logró incrementar el título de estreptomycin en 3.4 veces y el título de producción específica en 2.3 veces.

22. La experiencia adquirida al haber llevado este trabajo desde un nivel laboratorio hasta planta piloto, permitirá sentar las bases de la estrategia para desarrollar el proceso ahora con cualquier mutante hiperproductora obtenida en el laboratorio, o bien para adquirir, asimilar, adaptar y dominar una tecnología extranjera para la producción fermentativa de estreptomycin, si ese fuera el caso.

IX. RECOMENDACIONES

Al inicio de este trabajo quedó demostrado que no es posible confiar en la información existente sobre los títulos de producción de las cepas adquiridas, ya que hay muchos factores que no permiten reproducir los valores reportados. Entre estos factores están la composición de las materias primas utilizadas y la adaptación de los microorganismos a éstas. Realizar un trabajo de esta naturaleza lleva muchos años, más aún si se trata de cepas mejoradas de las cuales debe evaluarse su estabilidad. De ahí la conveniencia de desarrollar una tecnología propia que además de generar un "know-how" adaptado a nuestros recursos, permita acumular una experiencia valiosa en el momento de escalar el proceso a nivel comercial.

Dos aspectos son fundamentales durante el desarrollo de una tecnología que sea atractiva comercialmente. Primero, que el proceso sea eficiente, esto significa que se alcancen altas productividades y rendimientos del antibiótico, a través del manejo de cepas sobreproductoras. Segundo, que el proceso sea económico, lo cual puede darse en la búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición y en la simplicidad de las operaciones de producción y recuperación.

En cuanto a la investigación que queda pendiente por realizar si se desea desarrollar una tecnología propia, se plantean los siguientes aspectos importantes:

1. Establecer programas para el constante mejoramiento genético de la cepa con el fin de obtener cepas estables altamente productoras.
2. Adaptar las cepas mejoradas a los medios de cultivo conteniendo materias primas industriales disponibles en el mercado nacional, y evaluar la producción de estreptomicina en fermentadores de 14 litros.
3. Realizar estudios que definan la metodología más apropiada para la preservación de cepas sobreproductoras, por largos períodos de tiempo.
4. Realizar investigación para esclarecer si la cepa utilizada produce -manosidasa, con el fin de hacer las adecuaciones al proceso fermentativo que permitan aumentar los títulos de estreptomicina.
5. Evaluar el efecto de glutamato, lisina, glucosamina y prolina sobre la producción de estreptomicina, ya que de acuerdo a la literatura éstos estimulan la biosíntesis del antibiótico.

6. Estudiar los efectos del cambio de escala sobre el comportamiento del microorganismo con el fin de optimizar el proceso a nivel de planta piloto. El problema prioritario a resolver será la reducción de la fase de adaptación.

7. Desarrollar los procesos de recuperación de estreptomycin a partir del caldo de fermentación, con el fin de obtener datos que retroalimenten la formulación del medio de producción.

Otras recomendaciones generales son:

8. Los cambios en la viscosidad a lo largo de la fermentación, hacen a los cultivos de S. griseus un modelo atractivo para realizar estudios reológicos de fluidos no-Newtonianos.

9. Las ecuaciones que describen el efecto conjunto de la agitación y la aeración sobre la transferencia de oxígeno, así como el efecto de esta última sobre la producción de estreptomycin, podrían ser empleadas para predecir el comportamiento de la cepa en diferentes reactores.

10. Aplicar diseños experimentales con base estadística para la optimización de las condiciones de operación de cualquier proceso biotecnológico.

X. REFERENCIAS

- Aharonowitz, Y., 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 209-233.
- Anuarios Estadísticos de Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos, 1979-1988. Secretaría de Programación y Presupuesto, Coordinación de los Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática.
- Atkinson, B. and F. Mavituna, 1983. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. The Nature Press, New York, pp 360-363.
- Bader, F.G., 1986. Physiology and fermentation development. En *The Bacteria*, Vol. IX: Antibiotic-producing Streptomyces. Ed. S.W. Greener and L.E. Day, Academic Press, New York, pp: 281-321.
- Bailey, J.E. and D.F. Ollis, 1977. *Biochemical Engineering Fundamentals*, International Student Edition, McGraw - Hill Kogakusha, Ltd., Tokio, pp. 418.
- Barabás, G., I. Szabó, A. Ottenberger, V. Zs-Nagy and G. Szabó, 1980. An enzymatic release of antibiotic-containing peptidoglycan fragments from streptomycin-producing Streptomyces griseus. *Can. J. Microbiol.* 26: 141-145.
- Baron, A.L., 1950. Synthetic medium for streptomycin production. *Chem. Abstr.* 44: 10270c (British Patent 639,863; 1950).
- Bartholomew, W.H., E.O. Karow and M.R. Sfat, 1950a. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. *Ind. Eng. Chem.* 42(9): 1801-1809.
- Bartholomew, W.H., E.O. Karow, M.R. Sfat and R.H. Wilhelm, 1950b. Effect of air flow and agitation rates upon fermentation of Penicillium chrysogenum and Streptomyces griseus. *Ind. Eng. Chem.*, 42(9): 1810-1815.
- Bartholomew, W.H., E.O. Karow and M.R. Sfat, 1950c. Design and operation of a laboratory fermentor. *Ind. Eng. Chem.* 42(9): 1827-1830.
- Bartholomew, W.H., 1960. Scale-up of submerged fermentations. *Adv. Appl. Microbiol.* 2: 289-300.
- Benedict, R.G., L.A. Lindenfelser, F.H. Stodola and D.H. Traufler, 1951. Studies on S. griseocarneus and the production of hydroxystreptomycin. *J. Bacteriol.* 62: 487-497.

Blanch, H.W. and S.M. Bhavaraju, 1976. Non-Newtonian fermentation broths: rheology and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng.* 18: 745-790.

Bylinkina, E.S. and V.V. Birukov, 1972. The problem of scale-up in antibiotic biosynthesis. Proceedings of the IV International Fermentation Symposium: Fermentation Technology Today, Society of Fermentation Technology, Kyoto, Japan: 105-115.

Bormann, E.J. and E. Wolleschensky, 1979. Streptomycin by fermentation. *Chem. Abstr.* 92: 92705j (1980).

Bormann, E.J., Reiche, R., Meyer, K., Ehrhardt, M., 1984. Fermentative production of streptomycin. *Chem. Abstr.* 100: 173168x (Patent Germany East 160,614; 1983).

Box, G.E.P. and K.N. Wilson, 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Royal Statist. Soc., Series B*, 13(1): 1-45.

Calam, C.T., 1967. Media for industrial fermentations. *Process Biochem.*, June: 19-22.

Carvajal, F., 1953. Phage problems in the streptomycin fermentation. *Mycologia* 45: 209-234.

Carvajal, F., 1957. Production of streptomycin by culture immune to phage. U.S. Patent 2,808,364.

Cejka, A., 1985. Preparation of media. *En Biotechnology Vol. 2: Fundamentals of Biochemical Engineering*, Ed. H.J. Rehm and G. Reed, Verlag-Chimie, Federal Republic of Germany, pp:629-698.

Cella, R. and L.C. Vining, 1975. Resistance to streptomycin in a producing strain of Streptomyces griseus. *Can. J. Microbiol.* 21: 463-472.

Centro para la Innovación Tecnológica, 1985. Evaluación Tecnológica de la Producción de Estreptomina (Reporte interno). UNAM. México, D.F.

Chattopadhyay, J.P. and S.K. Bose, 1980. Control of plant infections by antibiotics and antagonistic organisms. *Proc. Biochem.* June/July: 27-28.

Chen, S.L., 1981. Optimization of batch alcoholic fermentation of glucose syrup substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 1827-1836.

Chen, S.L. and F. Gutmanis, 1982. Optimization of batch fermentation of whole ground corn mash. *Process Biochem.*, Nov/Dec: 2-5.

Cheynier, V., M. Feinberg, C. Chararas and C. Ducauze, 1983. Application of response surface methodology to evaluation of bioconversion experimental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(2): 634-639.

Claridge, C.A., 1979. Aminoglycoside antibiotics. En *Economic Microbiology* Vol. 3, Ed. A.H. Rose, Academic Press, New York, pp. 151-238.

Coc, D.M., 1955. Progress report on the use of streptomycin for the control of bacterial spot of tomatoes under field conditions on south Florida sandy soils. *Plant Disease Reporter* **39**(3): 215-218.

Colinsgworth, D.R., 1950. Streptomycin production using fermentation solubles. *Chem. Abstr.* **44**: 5551b (U.S. Patent 2,504,067; 1950).

Crueger, W. and A. Crueger, 1984. *Biotechnology: a textbook of Industrial Microbiology*. Ed. T.D. Brock. Science Tech. Inc., Madison, WI, USA, pp. 197-200.

Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, 1986. Secretaría de Salud. Mexico, D.F.

Datar, R., 1986. Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochem.* **21**(1): 19-26.

Davis, B.D., 1987. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* **51**(3): 341-350.

Demain, A. and E. Inamine, 1970. Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (α -D-mannosidase) formation. *Bacteriol. Rev.* **34**(1): 1-19.

Desrochers, M., L. Jurasek and M.G. Paice, 1981. Production of cellulase, β -glucosidase and xylanase by Schizophyllum commune grown on a cellulose-peptone medium. *Dev. Ind. Microbiol.* **22**: 675-684.

DeWitt, J.P., J.V. Jackson and T.J. Paulus, 1989. Actinomycetes. En *Fermentation process development of industrial organisms*. Ed. J.O. Neway. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 1-71.

Difco Manual, 1972. 9th Edition, Difco Lab. Detroit, Michigan, USA.

Distler, J., K. Klier, W. Piendl, O. Werbitzky, A. Böck, G. Kresze and W. Piepersberg, 1985a. Streptomycin biosynthesis in Streptomyces griseus I. Characterization of streptomycin-idiotrophic mutants. *FEMS Microbiol. Lett.* **30**: 145-150.

Distler, J., K. Mansouri and W. Piepersberg, 1985b. Streptomycin biosynthesis in Streptomyces griseus II. Adjacent genomic location of biosynthetic genes and one of two streptomycin resistance genes. FEMS Microbiol. Lett. 30: 151-154.

Distler, J., A. Ebert, K. Mansouri, K. Pissowotzki, M. Stockmann and W. Piepersberg, 1987. Gene cluster for streptomycin biosynthesis in Streptomyces griseus: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. Nucleic Acids Res. 15(19): 8041-8056.

Donovick, R., Koerber, W.L. and Rake, G.W., 1950. Streptomycin. Chem. Abstr. 44: 10270a (U.S. Patent 2,516,682; 1950).

Draper, N.R. and Smith, N., 1981. Applied regression analysis. 2nd Edition, John Wiley & Sons., Inc., New York. pp 507-509.

Dulaney, E.L., 1948a. Production of streptomycin with a new Actinomyces griseus mutant. U.S. Patent 2,545,572.

Dulaney, E.L., 1948b. Observations on Streptomyces griseus. II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. J. Bacteriol. 56: 305-313.

Dulaney, E.L., 1949. Observations on Streptomyces griseus. III. Carbon sources for growth and streptomycin production. Mycologia 41(1): 1-10.

Dulaney, E.L., 1951. Process for production of streptomycin. U.S. Patent 2,571,693.

Egorov, N.S., T.G. Yudina, Zh.K. Loriya and R.N. Zeleneva, 1981. A medium for the synthesis of exoproteases by Bacillus thuringiensis. Appl. Biochem. Microbiol. 17(5): 501-505.

Encyclopaedia Britannica, 1976. 15th Edition.

Epps, W.M., 1957. Control of seed potato rotting in South Caroline. Plant Disease Reporter 41(3).

Fannin, T.E., M.D. Marcus, D.A. Anderson and H.L. Bergman, 1981. Use of a fractional factorial design to evaluate interactions of environmental factors affecting biodegradation rates. Appl. Environ. Microbiol., 42(6): 936-943.

Ferguson, J.H., H.T. Huang and J.W. Davison, 1957. Stimulation of streptomycin production by a series of synthetic organic compounds. Appl. Microbiol. 5: 339-343.

Florent, J., 1985. Streptomycin and commercially important aminoglycoside antibiotics. En "Comprehensive Biotechnology, the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine". Vol. 3. Ed. H.W. Blanch, S.

- Drew and D.I.C. Wang. Pergamon Press, Oxford, pp. 137-162.
- Freedman, D., 1969. The shaker in bioengineering. *Process Biochem.* March: 35-40.
- Garner, H. R., H.Kuffer, P.A. Tetrault, M. Fahmy, M.V. Mallet, R.A. Faust, R.L. Phillips and N. Bohonos, 1953. Factors affecting streptomycin yields. *Amer. J. Bot.* 40(5): 289-296.
- Hacking, A.J., 1986. Economic aspects of biotechnology. Ed. por Cambridge University Press, New York, pp. 64.
- Hara, O. and T. Beppu, 1982. Induction of streptomycin-inactivating enzyme by A-Factor in Streptomyces griseus. *J. Antibiot.* 35(9): 1208-1215.
- Heggestad, H.E., M.O. Neas and J. Grosso, 1956. Comparison of various streptomycin dust and spray treatments for wildfire control in tobacco plant beds. *Plant Disease Reporter* 40(1): 48-51.
- Hewitt, W., 1977. Microbiological assay, an introduction to quantitative principles and evaluation. Ed. Academic Press, New York.
- Hockenull, D.J.D., G.C. Ashton, K.H. Fantes and B.K. Whitehead, 1954. Glucose utilization by Streptomyces griseus. *J. Gen. Microbiol.* 10: 353-370.
- Hockenull, D.J.D., 1960. The biochemistry of streptomycin production. *Progr. Ind. Microbiol.* 2: 131-165.
- Horinouchi, S., Y. Kumada and T. Beppu, 1984. Unstable genetic determinant of A-Factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* 158(2): 481-487.
- Hotta, K. and J. Ishikawa, 1988. Strain- and species-specific distribution of the streptomycin gene cluster and kan-related sequences in Streptomyces griseus. *J. Antibiot.* 41(8): 1116-1123.
- Hu, W.S. and A.L. Demain, 1979. Regulation of antibiotic biosynthesis by utilizable carbon sources. *Process Biochem.* Sept.: 2-6.
- Inamine, E., B.D. Lago and A.L. Demain, 1969. Regulation of mannosidase, an enzyme of streptomycin biosynthesis. *En Fermentation Advances*, Ed. D. Perlman, Academic Press, Inc., New York, pp. 199-221.
- Inoue, S., Y. Nishizawa and S. Nagai, 1982a. Effects of phosphate and asparagine on streptomycin formation by Streptomyces griseus in pH-stat cultures. *J. Ferment. Technol.* 60(2): 105-110.

Inoue, S., Y. Nishizawa and S. Nagai, 1982b. Stimulation of streptomycin formation by Streptomyces griseus grown in a phosphate deficient culture. J. Ferment. Technol. 60(5): 417-422.

Inoue, S., Y. Nishizawa and S. Nagai, 1983. Stimulatory effect of ammonium on streptomycin formation by Streptomyces griseus growing on a glucose minimal medium. J. Ferment. Technol. 61(1): 7-12.

J.A.O.A.C., Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists, 1970. Washington D.C., USA.

Karow, E.D., W.H. Bartholomew and M.R. Sfat, 1953. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. Agric. Food Chem. 1(4): 302-306.

Kase, H., 1985. Aminoglycoside antibiotics. En "Comprehensive Biotechnology, the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine". Vol. 3. Ed. H.W. Blanch, S. Drew and D.I.C. Wang. Pergamon Press, Oxford, pp. 69-82.

Kaufmann, M.J. and D.W. Chamberlain, 1957. Effect of antibiotics against Pseudomonas glycinea bacterial smudge soy bean (coerper) stapp. Plant Disease Reporter 41(9).

Kavanagh, F., E. Grinnan, E. Allanson and D. Tunin, 1960. Dihydrostreptomycin produced by direct fermentation. Appl. Microbiol. 8: 160-162.

Kawasaki, K. and col., 1957. Streptomycin. Chem. Abstr. 51: 11666g (Japanese Patent 3750; 1956).

Kempf, J.E. and P. Sayles, 1946. The influence of the rate of aeration on oxidation-reduction potentials and streptomycin production by Actinomyces griseus. J. Bacteriol. 51: 596-597.

Kirby, J.P., 1980. Microbiological, chemical and clinical findings of aminoglycoside antibiotic research. Proc. Biochem. Oct/Nov: 14-23.

Kirby, R. and E. Lewis, 1981. Unstable genetic elements affecting streptomycin resistance in the streptomycin-producing organisms Streptomyces griseus NCIB 8506 and S. bikiniensis ISP 5235. J. Gen. Microbiol. 122: 351-355.

Kirshbaum, A. and B. Arret, 1967. Outline of details for official microbiological assays of antibiotics. J. Pharmac. Sci. 56(4): 511-515.

- Knier, B. and H. Grisebach, 1980a. Biosynthesis of streptomycin. Purification and properties of a dTDP-L-Dihydrostreptose: streptidine-6-phosphate dihydrostreptosyltransferase from Streptomyces griseus. Eur. J. Biochem. 105: 139-144.
- Knier, B. and H. Grisebach, 1980b. Biosynthesis of streptomycin. Enzymatic formation of dihydrostreptomycin 6-phosphate from dihydrostreptosyl streptidine 6-phosphate. J. Antibiot. 33(4): 416-419.
- Kubo, H. and col., 1960. Streptomycin manufacture with synthetic culture medium. Chem. Abstr. 57: 13019c (1961).
- Kumada, Y., S. Horinouchi, T. Uozumi and T. Beppu, 1986. Cloning of a streptomycin-production gene directing synthesis of N-methyl-L-glucosamine. Gene 42: 221-224.
- Maddox, I.S. and S.H. Richert, 1977. Use of response surface methodology for the optimization of microbiological media. J. Appl. Bacteriol., 43: 197-204.
- Marlatt, R.B., 1955. Effectiveness of streptomycin as a control for common bacterial blight of pinto bean. Arizona Agricultural Experiment Station, Mesa.
- Martin, J.F., 1977. Control of antibiotic synthesis by phosphate. Adv. Biochem. Eng. 6: 105-127.
- Martin, J.F. and A.L. Demain, 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44(2): 230-251.
- Marty, J.L., 1985. Application of response surface methodology to optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. Appl. Microbiol. Biotechnol., 22: 88-91.
- McDaniel, L.E., 1950. Process for producing streptomycin on medium containig whole yeast. U.S. Patent 2,515,461.
- McDaniel, L.E., 1951. Production of streptomycin using soybean meal-distiller's solubles medium. Chem. Abstr. 45: 2638a. (U.S. Patent 2,538,942; 1951).
- McDaniel, L.E. and Hendlin, D., 1951. Production of streptomycin using improved nutrient medium. Chem. Abstr. 45: 2637f (U.S. Patent 2,538,943; 1951).
- McDaniel, L.E., E.G. Bailey, S. Ethiraj and H.P. Andrews, 1976. Application of response surface optimization technics to polyene macrolide fermentation studies in shake flasks. Dev. Ind. Microbiol. 17: 91-98.
- Mead, R. and J. Pike, 1975. A review of response surface methodology from a biometric viewpoint. Biometrics, 31: 803-851.

- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- Miller, P.W., 1956. Preliminary comparison of agri-mycin 100 and copper compounds for the control of walnut blight in Oregon. *Plant Disease Reporter* 40(7): 626-627.
- Miller, A.L. and J.B. Walker, 1970. Accumulation of streptomycin-phosphate in cultures of streptomycin producers grown on a high-phosphate medium. *J. Bacteriol.* 104(1): 8-12.
- Monteanu, V. and col., 1981. Streptomycin biosynthesis. *Chem. Abstr.* 97: 4647a (1982).
- Moresi, M. and E. Sebastiani, 1979. Optimization of whey fermentation in a shaken-flask fermenter. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8: 63-71.
- Moresi, M., C. Nacca, R. Nardi and C. Palleschi, 1979. Factor analysis in a whey fermentation by Kluyveromyces fragilis. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 49-61.
- Mukhopadhyay, S.N. and T.K. Ghose, 1976. Oxygen participation in fermentation, Part 1: Oxygen microorganisms interactions. *Process Biochem*, June: 19-28.
- Musilek, V., 1963. Prevention of loss of streptomycin production on repeated transfer of Streptomyces griseus. *Appl. Microbiol.* 11: 28-29.
- Myers, R.H., 1971. Response surface methodology. Ed. Allyn and Bacon, Inc., Boston.
- Nakayama, H., Shiratsuchi, S. and Esumi, S., 1960. Streptomycin. *Chem. Abstr.* 54: 3869a (Japanese Patent 7696; 1958).
- Nimi, O., M. Sugiyama, H. Kameoka, H. Tomoeda, K. Ono and R. Nomi, 1981a. Fate of streptomycin in mycelium of the producer organism. *Biotechnol. Lett.* 3(5): 239-244.
- Nomi, R., 1963. Variations in strains of Streptomyces griseus isolated from a degenerating streptomycin-producing culture. *Appl. Microbiol.* 11: 84-89.
- Ohnuki, T., T. Imanaka and S. Aiba, 1985. Self-cloning in Streptomyces griseus of an str gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* 164(1): 85-94.
- Okachi, R. and T. Nara, 1984. The aminoglycosides: properties, biosynthesis and fermentation. En "Drugs and the pharmaceutical sciences". Vol. 22, Biotechnology of industrial antibiotics. Ed. E.J. Vandamme, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp. 329-

365.

Ono, H., R. Crameri, G. Hintermann and R. Hütter, 1983. Hydroxystreptomycin production and resistance in Streptomyces glaucescens. J. Gen. Microbiol. 129: 529-537.

Otten, V.H. y M. Plembel, 1980. Antibióticos amiloglucósidos. 1a. Edición Mexicana, Departamento Científico, Bayer de México, S.A., División Farmacéutica.

Perlman, D. and G.H. Wagman, 1952. Studies on the utilization of lipids by Streptomyces griseus. J. Bacteriol. 63: 253-262.

Perlman, D., B. Greenfield Jr. and E. O'Brien, 1954. Degeneration of a Streptomyces griseus mutant on repeated transfer. Appl. Microbiol. 2: 199-200.

Quintero, R., 1981. Ingeniería bioquímica, teoría y aplicaciones. Ed. Alhambra, México, p. 81-114, 281-284.

Ragan, C.M. and L.C. Vining, 1978. Intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and streptomycin production in cultures of Streptomyces griseus. Can. J. Microbiol. 24: 1012-1015.

Rake, G. and R. Donovan, 1946. Studies on the nutritional requirements of Streptomyces griseus for the formation of streptomycin. J. Bacteriol. 52: 223-226.

Remmers, E.G. and C.G. Dunn, 1961. Process improvement of a fermentation product. Ind. Eng. Chem. 53(9): 743-745.

Rich, S., 1956. Seedlings against Stewart's wilt. Plant Disease Reporter 40(5): 417-419.

Richards, J.W., 1961. Studies in aeration and agitation. Progr. Ind. Microbiol. 3: 141-172.

Rowlands, B., 1987. Comunicación personal

Saudek, E.C. and D.R. Colingsworth, 1947. A bacteriophage in the streptomycin fermentation. J. Bacteriol. 54: 41-42.

Schultz, J.S., D. Reihard and E. Lind, 1960. Statistical methods in fermentation development. Ind. Eng. Chem. 52(10): 827-830.

Scriban, R. 1985. Biotecnología, Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, Traducción de la 2a. edición, pp. 114-118.

Segura, G.D.G., 1990. Mejoramiento genético de una cepa de Streptomyces griseus productora de estreptomina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Shinkawa, H., M. Sugiyama, O. Nimi and R. Nomi, 1985. Molecular cloning and expression in S. lividans of a streptomycin phosphotransferase gene from a streptomycin-producing microorganism. FEBS Lett. 181(2): 385-389.

Shirato, S., S. Esumi and R. Ito, 1961. Industrial fermentation of streptomycin. Chem Abstr. 59: 15919g (1962).

Shirato, S. and H. Motoyama, 1966. Fermentation studies with Streptomyces griseus. II Synthetic media for the production of streptomycin. Appl. Microbiol. 14(5): 706-710.

Sikyta, B., Daskocil, J. and Kasparová, J., 1959. Continuous streptomycin fermentation. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 1(4): 379-392.

Silverman, M. and S.V. Rieder, 1960. The formation of N-metil-L-glucosamine from D-glucose by Streptomyces griseus. J. Biol. Chem. 235: 1251-1254.

Simon, H.J. and E. Jong Yin, 1970. Microbioassay of antimicrobial agents. Appl. Microbiol. 19(4): 573-579.

Singh, A., E. Bruzelius and H. Heding, 1976. Streptomycin. A fermentation study. Eur. J. Appl. Microbiol. 3: 97-101.

Statgraphics (Statistical Graphics System), 1987. Statistical Graphics Corporation, Plus*Ware, STSC, Inc. 2115 East Jefferson Street; Rockville, Mariland 20852, USA.

Stryer, L., 1988. Biochemistry, Third Edition, W.H. Freeman & Co., New York, pp. 325-326.

Swartz, R.W., 1979. The use of economic analysis of penicillin G manufacturing costs in stablishing priorities for fermentation process improvement. Ann. Rep. Fermentation Proc. 3: 75-110.

The American Type Culture Collection, 1978. Catalogue of strains I, 13th edition, USA.

Thornberry, H.H. and H.W. Anderson, 1948. Synthetic medium for Streptomyces griseus and the production of streptomycin. Arch. Biochem. 16: 389-397.

Tohyama, H., T. Shigyo and Y. Okami, 1984. Cloning of streptomycin resistance gene from a streptomycin producing streptomycete. J. Antibiot. 37(12): 1736-1737.

Tohyama, H., Y. Okami and H. Umezawa, 1987. Nucleotide sequence of the streptomycinphosphotransferase and amidinotransferase genes from Streptomyces griseus. Nucleic Acids Res. 15(4): 1819-1833.

Trussell, P.C., 1951. Streptomycin. Chem. Abstr. 45: 4006b (U.S. Patent 2,541,726; 1951).

Van Suijdam, J.C., N.W.F. Kossen and A.C. Joha, 1978. Model for oxygen transfer in a shake flask. Biotechnol. Bioeng. 20: 1695-1709.

Votruba, J., P. Pilát and A. Prokop, 1975. Application of modified Rosenbrock's method for optimization of nutrient media used in microorganism culturing. Biotechnol. Bioeng. 17: 1833-1837.

Walker, J.B., 1980. Biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. Dev. Ind. Microbiol. 21: 105-113.

Walker, J.B. and M.S. Walker, 1982. Enzymatic synthesis of streptomycin as a model system for study of the regulation and evolution of antibiotic biosynthetic pathways. In Overproduction of microbial products, Ed. V. Krumphanzl, B. Sikyta and Z. Vanek, FEMS Symp. No. 13, Academic Press, New York, pp. 271-281.

Wang, C.H., J.T. Bailey, S. Klungsoyr and C.M. Gilmour, 1958. Studies on the biochemistry of Streptomyces III: Glucose catabolism in Streptomyces griseus. J. Bacteriol. 75: 31-37.

Wang, D.I.C. and R.C.J. Fewkes, 1977. Effect of operating and geometric parameters on the behavior of non-Newtonian, mycelial, antibiotic fermentations. Dev. Ind. Microbiol. 18: 39-56.

Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39(8): 971-974.

Woodruff, H. B. and M. Ruger, 1948. Studies on the physiology of a streptomycin-producing strain of Streptomyces griseus on proline medium. J. Bacteriol. 56: 315-321.

Wright, S.L. and G.H. Richardson, 1982. Optimization of whey-based or nonfat dry milk-based media for production of pH controlled bulk lactic cultures. J. Dairy Sci., 65: 1882-1889.

Zaumeyer, W.J. and R.E. Wester, 1956. Control of downy mildew of lima beans with streptomycin. Plant Disease Reporter 40(9): 776-780.