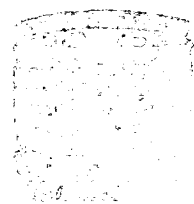


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Sistemas de Optimización de Condiciones de Cultivo en Fermentaciones



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

MA. DE LOURDES RODRIGUEZ GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

| | | |
|---------|--|-------|
| 1. | Introducción | 3 |
| 1 1 | Objetivo | 3 |
| 1.2 | Crecimiento microbiano | 4 |
| 1.2 1 | Cinética de crecimiento | 4-7 |
| 1 2 2 | Cinética de fermentaciones | 7-9 |
| 1.2.3 | Generalidades sobre <u>Streptomyces erythreus</u> | 9-12 |
| 1.2.4 | Condiciones tróficas y fisiológicas de los microorganismos para su crecimiento | 12 |
| 1.2 5 | Componentes necesarios en un medio de cultivo | 12 |
| 1.2.5.1 | Fuente de Carbono | 12-13 |
| 1.2.5.2 | Fuente de Nitrógeno | 13-14 |
| 1.2 5.3 | Factores de crecimiento | 14 |
| 1.2.5 4 | Sales minerales | 14-15 |
| 1.2.6 | Rutas metabólicas más utilizadas por los microorganismos | 15-16 |
| 1.3 | Metabolitos secundarios. Antibióticos | 17- |
| 1.3.1 | Biogénesis de los antibióticos | 17-18 |
| 1.3.2 | Regulación genética de la biosíntesis de antibióticos | 18-19 |
| 1.3.3 | Características del proceso en fermentaciones de antibióticos | 19-20 |
| 1 4 | Revisión bibliográfica sobre eritromicina | 20 |
| 1.4 1 | Estructura de las eritromicinas | 20-22 |
| 1.4.2 | Propiedades fisicoquímicas de las eritromicinas | 22 |

| | | |
|-------|--|-------|
| 1.4.3 | Forma de acción y espectro antimicrobiano | 22-23 |
| 1.4.4 | Biosíntesis de eritromicina | 23-27 |
| 1.5 | Planeación y análisis de experimentos mediante métodos estadísticos | 27-42 |
| 2. | Experimentación y discusión de resultados | 43 |
| 2.1 | Objetivos | 43 |
| 2.2 | Técnicas de medición de los diversos parámetros en la fermentación | 44 |
| 2.3 | Determinación de los parámetros fisicoquímicos que influyen en la producción del antibiótico | 45 |
| 2.3.1 | Influencia de la temperatura | 45 |
| 2.3.2 | Variación del pH durante la fermentación | 45-47 |
| 2.3.3 | Evaporación del medio de cultivo | 47-48 |
| 2.3.4 | Concentración de oxígeno disuelto | 49 |
| 2.3.5 | Presencia de inductores | 49-54 |
| 2.4 | Variación de las fuentes de C y N para seleccionar un medio de producción adecuado | 54-58 |
| 2.5 | Cinética de crecimiento en el medio standard | 58-64 |
| 2.6 | Relación de la producción del antibiótico con la producción de biomasa | 65-66 |
| 3. | Optimización de las condiciones de cultivo mediante métodos estadísticos | 67 |
| 3.1 | Diseño del método Plackett-Burman | 67-75 |
| 3.2 | Diseño del método Box-Wilson | 75-87 |

| | | |
|-----|------------------------------|---------|
| 4. | Conclusiones | 88-89 |
| 5. | Apéndice | 90 |
| 5.1 | Equipo | 90 |
| 5.2 | Reacti vos y materias primas | 90 |
| 5.3 | Técnicas de medición | 90-97 |
| 5.4 | Conservación de cepas | 97-99 |
| 6. | Bibliografía | 100-104 |

1. INTRODUCCION

1.1 Objetivo.

El objetivo fundamental de este trabajo, consiste en la -- formulación, desarrollo y optimización de un medio de cultivo - soluble, para la producción de eritromicina, utilizando una cepa de Streptomyces erythreus.

Demostrar las ventajas que representa el emplear métodos - estadísticos, tanto para la selección de variables, como para - la optimización de las mismas durante la fermentación.

1.2 Crecimiento microbiano.

1.2.1 Cinética de crecimiento.

Para llevar a cabo una experimentación microbiológica, es necesario poseer un conocimiento adecuado del microorganismo en estudio, teniendo siempre presente que se trata de organismos vivos y cambiantes, capaces de responder a los diversos factores del medio que los rodea.

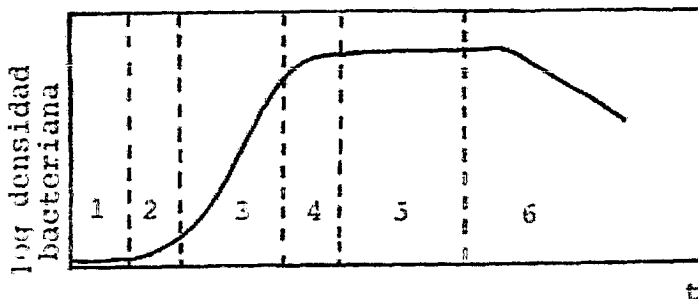
El metabolismo microbiano es la suma total de las reacciones que tienen lugar en la célula, entendiéndose como una actividad muy coordinada, en la que participan numerosos conjuntos de sistemas enzimáticos, mutuamente relacionados, intercambiando materia y energía entre la célula y su entorno.

Una consecuencia del metabolismo es el crecimiento celular el cual se define como el incremento ordenado del número de componentes de una célula viva, reflejándose en la magnitud de la población total.

Uno de los principales índices de que se dispone, para el estudio de los microorganismos es la observación de su comportamiento cinético de crecimiento, abarcando la medición o estimación de las velocidades de síntesis celular y formación de productos y los efectos que el medio ambiente ejerce sobre ellas.

El crecimiento generalmente se mide con la masa celular, - de esta manera, en una curva de crecimiento se observan diferentes fases:

Fig.1.2.1.1 Curva de crecimiento en medio no renovado.



1. Fase de latencia
2. Fase de crecimiento acelerado.

Ambas etapas constituyen la Fase lag, son inmediatas al inóculo, se tiene una etapa de adaptación, con síntesis o representación de enzimas o de componentes estructurales de la célula. Pueden eliminarse, pero en caso de que se presenten, serán proporcionales a la edad del inóculo, a una adaptación enzimática, o bien, al volumen del inóculo.

3. Fase log o exponencial: La velocidad de crecimiento es constante y máxima. La población es casi uniforme en lo que se refiere a la composición química celular, actividad metabólica y otros caracteres fisiológicos.

4. Fase de crecimiento retardado: Corresponde al período en el cual el sustrato limitante está a punto de agotarse.

5. Fase estacionaria: La velocidad de crecimiento es nula, tal vez porque las células ya no se dividen, o bien las células viables están en proporción equivalente con las que mueren. Posiblemente se agota el nutriente esencial y/o se acumulan productos inhibitorios del crecimiento.

En cultivo sumergido, de organismos filamentosos (hongos y Actinomyces) se pueden distinguir la trofofase y la idiofase, la primera es una etapa de nutrición y la segunda una etapa de diversificación. (Bu'lock, J.D., 1965).

6. Fase de declive: La población decrece, teniéndose una tasa de crecimiento negativa.

Se ha asumido por regla general que el crecimiento sigue una curva exponencial y en el caso de que se aparte de ella, se debe a limitaciones en la disponibilidad del sustrato necesario para el crecimiento o por inhibición de los mecanismos de crecimiento.

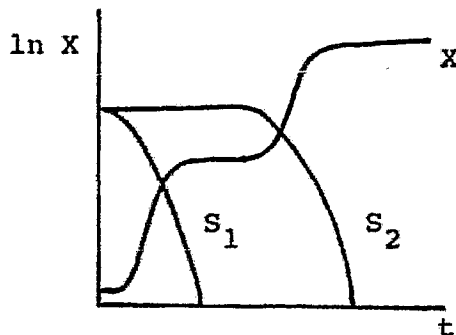
Se conocen 2 excepciones al modelo de crecimiento exponencial:

1. Cuando se utilizan varias fuentes de carbono ej: Glucosa y lactosa, se obtendrá una curva de tipo diáuxico.

Al ser la glucosa una fuente de carbono más fácilmente asimilable, es utilizada primero, además ejerce represión catabólica sobre la utilización de lactosa.

En un medio complejo, en el cual se tiene toda una variedad de compuestos, como aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y otros intermediarios del metabolismo, además de " múltiples fuentes de carbono " se puede esperar este tipo de comportamiento.

Fig.1.2.1.2 Curva de crecimiento diáuxica.



2. Cuando se presenta formación de esferulas las cuales siguen un crecimiento de tipo " raíz cúbica ".

Los hongos en cultivos homogéneos generalmente presentan este tipo de crecimiento.

Se ha demostrado (Pirt, 1960) que el crecimiento es exponencial hasta que la esférula excede cierto diámetro, al llegar a este punto, los sustratos no logran difundirse hacia el interior con la velocidad suficiente, para mantener un crecimiento exponencial en la masa total de la esférula, de esta manera, su interior puede estar muerto o lisado (Camici, Sermonetti & Chain, 1952).

Esto es aceptado ya que la masa de la esférula es proporcional al cubo de su radio, mientras que la superficie de crecimiento periférica se incrementa solo con el cuadrado del radio. De esta manera puede llegar a tenerse un cultivo fisiológicamente heterogéneo.

Las esférulas se forman por aproximación de las ramificaciones de las hifas y el número de ramificaciones es directamente proporcional al incremento de la velocidad de crecimiento, aumentando así la probabilidad de su formación, esto se observó en Penicillium chrysogenum.

Otros factores que influyen en la formación de esférulas son: pH, concentración de iones metálicos y si el medio es complejo o sintético (Pirt, S.J. & Callow, D.S., 1959).

Este tipo de crecimiento produce una mayor viscosidad en el caldo de cultivo, dificultando la transferencia de oxígeno.

1.2.2 Cinética de fermentaciones.

Una vez que se tiene una cepa pura del microorganismo, se lleva a cabo la fermentación, tomando en cuenta para su control diversos índices.

En cultivo en lote, el crecimiento celular se encuentra limitado por la concentración inicial de sustrato y se expresa en términos de la concentración celular (X), de la concentración de sustrato limitante y la de un inhibidor.

En 1942, Monod estableció el siguiente modelo de crecimen-

to celular:
$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s + S}$$

K_s : Cte. de saturación: Concentración de sustrato cuando μ --
equivale a $\frac{1}{2}\mu_{\text{máx}}$.

de forma que:
$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$\frac{dX}{dt}$ = Velocidad de crecimiento celular: Número de divisiones por
unidad de tiempo, en un intervalo dado.

μ : Velocidad específica de crecimiento. Su valor nunca podrá
predecirse, siempre deberá calcularse empíricamente.

La μ está relacionada con el tiempo de duplicación (t_d), -
el cual es el tiempo necesario para que la concentración de cé-
lulas sea el doble de la población original.

Integrando la ecuación $\frac{dX}{dt} = \mu X$ en los límites X y $2X$ se tie-
ne:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

Para el caso particular de crecimiento en forma de esférula
(Righelato, R.C., 1975), el modelo de crecimiento de tipo --
" raíz cúbica " es:

$$\sqrt[3]{x} = \sqrt[3]{x_0} + Kt$$

En cuanto a la formación de producto, éste puede estimarse
como:

Producción: g de producto formado en la unidad de tiempo.

Productividad: g de producto formado por volumen de fermenta-
dor, durante el tiempo total de fermentación.

Productividad específica: g de producto formado por volumen -
de fermentador, por g de célula, durante el tiempo total de --
fermentación.

Para explicar el comportamiento de sistemas simples,

se han propuesto varios modelos de producción de diversos metabolitos:

1. Modelo asociado al crecimiento: El sustrato se convierte estequiométricamente en un solo producto, por lo que su tasa de formación está directamente relacionada con la velocidad de crecimiento.
2. Modelo no asociado al crecimiento: La formación de producto es independiente de la velocidad de crecimiento.
3. Modelo combinado: Es el resultado de la acción conjunta de los casos anteriores.

1.2.3 Generalidades sobre Streptomyces erythreus.

Streptomyces erythreus es un microorganismo perteneciente al Orden VI. Actinomycetales ; Familia III. Streptomycetaceae ; Género Streptomyces (*).

Los Actinomycetales son células que forman un micelio más o menos bien diferenciado, por lo que se asemejan a los hongos inferiores, aunque se distinguen de éstos por la estructura procarionótica de sus células y por la composición química de su pared celular, la cual es de tipo bacteriano y a diferencia de los vegetales inferiores no contiene quitina, ni celulosa. Son Gram (+).

El género Streptomyces posee un micelio vegetativo aéreo - muy ramificado, con células reproductoras especializadas (conidiosporas, esporangiosporas), de forma esférica, dispuestas en cadenas. Al germinar estas células, las hifas crecen hacia afuera y toman una forma alargada, dando la apariencia de ramas. Más tarde se desarrolla un sustrato miceliar con una capa de hifas aéreas, las cuales se fragmentan en la punta, formando conidiosporas.

(*) Clasificación según la 8ª edición (1974) del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

diosporas, que al madurar se desprenden y se desplazan por medio del aire, dando lugar a nuevas colonias miceliares.

Los Streptomyces suelen vivir en el suelo, son mesófilos (T_{Op} 25-40°C). Aerobios estrictos. Pocas especies son parásitas. Son aproximadamente 150 especies, muchas de las cuales producen antibióticos.

1.2.4 Condiciones tróficas y fisiológicas para el crecimiento de los microorganismos.

Entre los microorganismos, existe una gran diversidad de tipos fisiológicos, que se diferencian entre sí por la naturaleza de los factores nutritivos que les son necesarios, así como por las condiciones fisicoquímicas compatibles con su vida, resultando decisivas:

1. Fuentes de energía.

La síntesis de materia viva es un proceso endergónico, que necesita de una fuente de energía, la cual puede ser: Energía radiante, para organismos fotótrofos ; Energía por oxidación de compuestos químicos, para organismos quimiótrofos.

2. Necesidades de oxígeno.

El oxígeno molecular ejerce una influencia primordial en la selección de microorganismos viables en el medio, así como en los productos metabólicos. Según su comportamiento frente al oxígeno, los microorganismos se clasifican en:

a) Aerobios estrictos: Necesitan oxígeno libre en el medio. Fermentación aeróbica. Aproximadamente el 50% del carbono del medio lo utilizan como energético.

b) Anaerobios estrictos: Solo crecen en ausencia de oxígeno molecular.

c) Anaerobios facultativos: Crecen en cualquiera de las condiciones anteriores.

3. pH

El pH influye en los productos finales del metabolismo. - Un cambio de pH en el medio, puede alterar su composición, a sí como la naturaleza de la superficie microbiana, además al disociarse ácidos y bases en algunos casos resulta afectada la floculación de biomasa o su adhesión al vidrio.

Para un pH establecido, la velocidad máxima de crecimiento varía en un rango de 1 a 1.5 unidades de pH.

pH_óp: 3-5 hongos, mohos, levaduras ; 6-8 bacterias.

Algunos microorganismos se desarrollan en los casos extremos de pH.

4. Temperatura.

Determina el índice y magnitud total del crecimiento, además del metabolismo del microorganismo. Según su comporta--miento frente a la temperatura, los microorganismos pueden - ser:

T_óp de crecimiento (°C)

| | |
|---------|-------------|
| 5 - 15 | Psicrófilos |
| 25 - 40 | Mesófilos |
| 45 - 60 | Termófilos |

Algunos hasta 94

Ciertos microorganismos pueden desarrollarse en rangos intermedios. Cada microorganismo tiene una temperatura óptima de crecimiento, que no necesariamente es igual a la óptima - para producción.

5. Concentración iónica.

Generalmente las bacterias toleran las variaciones de concentración iónica mejor que las células de organismos supe--riores. El crecimiento en la mayoría de las especies bacte--rianas se inhibe total o parcialmente cuando la concentración de NaCl en el medio, es superior al 2%, sufriendo plasmólisis

a concentraciones elevadas de sal.

1.2.5 Componentes necesarios en un medio de cultivo.

El crecimiento microbiano es el mejor índice de que el me dio de cultivo contiene todas las sustancias requeridas para la síntesis del material celular y para la generación de energía. Estas sustancias se conocen como nutrientes.

Un medio de cultivo deberá contener estos nutrientes en la cantidad necesaria y balanceada para satisfacer los requerimientos celulares. El diseño del medio de cultivo se basará en los principios de nutrición y observando la composición de la célula.

Es necesario considerar que algunos nutrientes al superar cierta concentración pueden ser inhibitorios del crecimiento o bien ser tóxicos al microorganismo. Cuando se tiene un medio concentrado, las actividades metabólicas pueden verse alteradas o incluso ser letal al microorganismo.

El punto de partida para preparar un medio son los compuestos mineral base, con los cuales se tienen los nutrientes inorgánicos.

Deberá tenerse presente que la capacidad de crecimiento y de síntesis de productos en un determinado medio, están dadas por las características genéticas del microorganismo.

1.2.5.1 Fuente de Carbono.

Según el tipo de aporte de Carbono que requieran, los microorganismos son:

- a) **Autótrofos:** La energía para el desarrollo del microorganismo se obtiene en ausencia de toda materia orgánica preformada, a partir de CO_2 y CO_3^{\ominus}
- b) **Heterótrofos:** Necesitan el aporte de compuestos orgánicos

que sirvan como fuente de energía y de Carbono.

El Carbono es el elemento más abundante en las células microbianas, constituyendo aproximadamente el 50% del peso seco de las mismas.

El principal sustrato en las fermentaciones son los carbohidratos, siendo la fuente más común para suministrar Carbono.

Las materias primas más utilizadas son:

Glucosa (pura (monohidratada), jarabe de glucosa), sacarosa (azúcar de mesa, azúcar morena o melazas), almidón de maíz o de papa, harina de maíz, extracto de malta -- (contiene maltosa y dextrinas), licor de maíz, lactosa, cebada, sorgo, líquido sulfitado de papelería.

También se pueden utilizar compuestos orgánicos como:

Ácidos grasos (acetato, propionato, butirato, isovalerato); osas y polioles (xilosa, ribosa, arabinosa, fructosa); ácidos dicarboxílicos (succinato, fumarato, glutarato); ácidos, alcoholes y cetonas (citrato, piruvato); ácidos aminados (alanina, serina, treonina); compuestos aromáticos no nitrogenados (benzoato, fenol, quinato); -- compuestos nitrogenados (butilamina, benzilamina); hidrocarburos (metano, parafinas de $C_{12} - C_{20}$).

1.2.5.2 Fuente de Nitrógeno.

El Nitrógeno constituye alrededor del 15% del peso seco de las células.

Todos los microorganismos utilizan Nitrógeno mineral ya sea como amoníaco o sales amoniacales. Pocas especies son capaces de asimilar nitrato o nitrito o de fijar el Nitrógeno atmosférico, pero en tal caso lo han de convertir primero a amoníaco mediante procesos enzimáticos de reducción.

Algunos microorganismos son incapaces de sintetizar compuestos nitrogenados indispensables, siendo así auxótrofos para aminoácidos, bases púricas o pirimídicas, etc.

Las fuentes de Nitrógeno más empleadas son:

Licor de maíz (contiene nitrógeno aminado, además nucleósidos y vitaminas) ; urea ; extracto de levadura ; peptona -- grado bacteriológico ; harina de soya desgrasada ; residuos solubles de destilación (producidos a partir de maíz y cebada) Pharmamedia y Proflo (derivados de la semilla de algodón).

1.2.5.3 Factores de crecimiento.

Son metabolitos esenciales, que ciertos microorganismos -- son incapaces de sintetizar. Se dice que son auxótrofos para dichos factores que se producen en baja concentración (10^{-6} a 10^{-10} M).

Estos factores de crecimiento intervienen en reacciones -- enzimáticas, ya que constituyen parte de la estructura de diversas enzimas. Ej: vitaminas.

Generalmente son aportados al medio con la fuente de Carbono y Nitrógeno (en el extracto de levadura, extracto de hígado, residuos de destilación), por lo que resulta más económico agregarlos con otros nutrientes, que en forma pura.

Una concentración elevada de estos factores ej: 25 µg/l puede resultar perjudicial ej: la biotina afecta la permeabilidad celular.

1.2.5.4 Sales minerales.

La mayoría de los elementos químicos forman parte de la célula viva y son indispensables para el crecimiento. Sin embargo solo el Azufre y el Fósforo representan una fracción importante del peso de la célula, debido a su participación en la estructura de los ácidos nucleicos y las proteínas.

El Azufre y el Fósforo generalmente son asimilados como -- sulfatos y fosfatos, en cantidades relativamente importantes, - del orden de 0.5 gr/l.

Los otros elementos minerales se necesitan en concentraciones mucho menores, siendo oligoelementos: K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} (se añade de 0.03 a 0.3 gr/l) PO_4^{\equiv} , SO_4^{\equiv} (en concentraciones de mg/l).

Zn, Mo, Co, Cu generalmente están como impurezas del agua o de los demás ingredientes del medio de cultivo, es tan baja su concentración que puede resultar difícil demostrar que son esenciales.

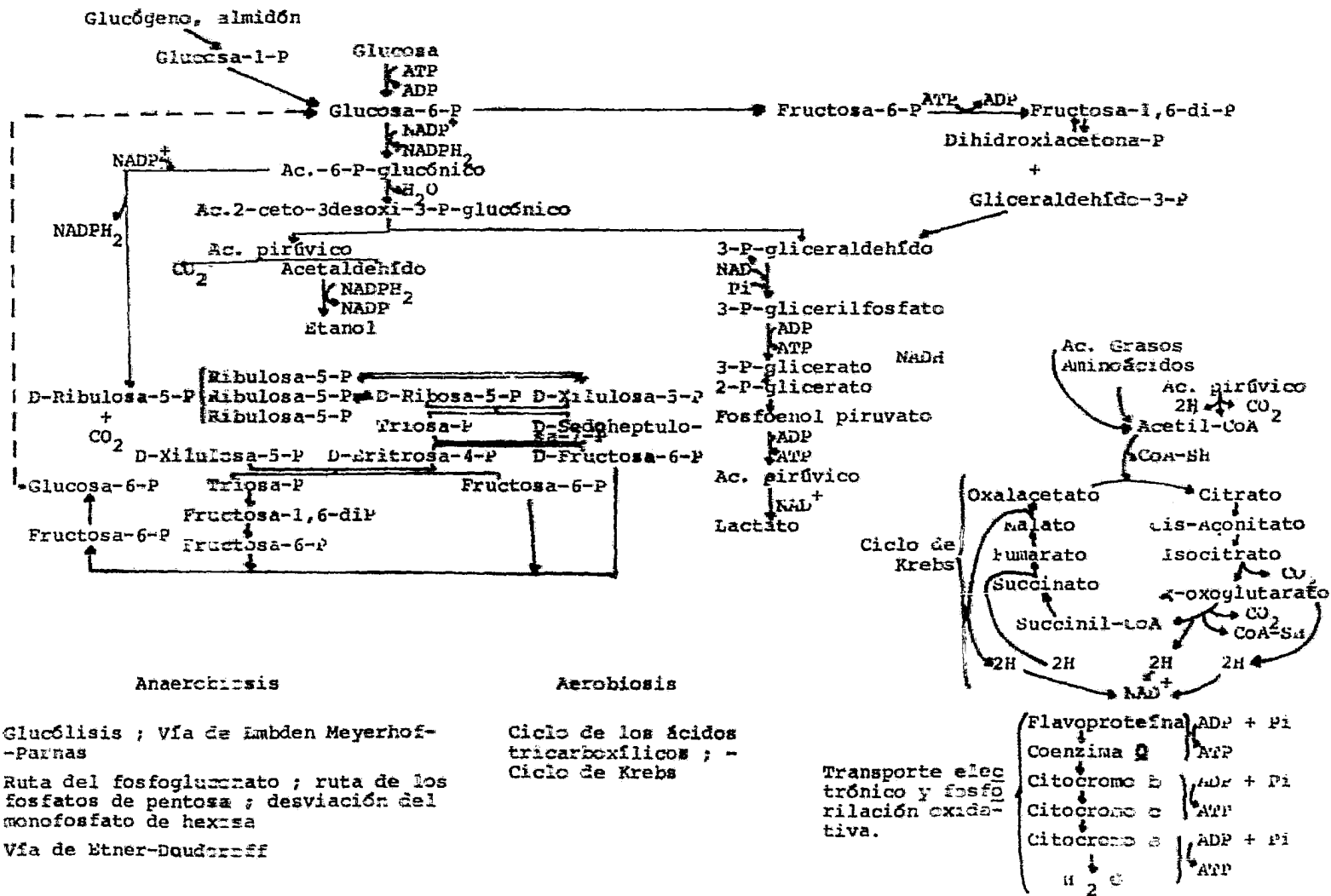
1.2.6 Rutas metabólicas más utilizadas por los microorganismos

La explotación industrial de los microorganismos constituye la industria de las fermentaciones.

La palabra fermentación viene del latín " Fervere " que -- significa " hervir " y abarca todas las reacciones sucesivas de oxidorreducción, en las cuales los compuestos orgánicos, fuente de Carbono y energía, sirven como donadores y aceptores de electrones. Dichos compuestos constituyen los productos de la fermentación que se acumulan en el medio, son numerosos y provie--nen principalmente de la fermentación de glúcidos.

En el esquema que se muestra a continuación, se presentan las principales rutas metabólicas utilizadas por los microorganismos:

Fig. 1.2.6.2 Principales rutas metabólicas utilizadas por los microorganismos



1.3 Metabolitos secundarios. Antibióticos.

Además de los metabolitos primarios o normales, los cuales corresponden a estructuras esenciales y funciones celulares específicas, se han aislado una gran cantidad de compuestos, los cuales tienen una restringida distribución taxonómica, se producen en la fase estacionaria del ciclo de crecimiento y no son indispensables para la célula, estas especies químicas se conocen con el nombre de Metabolitos Secundarios, de los cuales los más estudiados son los antibióticos.

Se define como antibiótico a " toda sustancia químicamente definida, producida por microorganismos y que aún a muy bajas concentraciones ejerce una acción inhibitoria del crecimiento o bien la destrucción de bacterias u otros microorganismos in vivo o in vitro " (Simon, P., Meunier, R., 1970).

A partir del descubrimiento de la penicilina, por A. Fleming (1928), se han encontrado alrededor de 2000 antibióticos, muchos de los cuales provienen de hongos y bacterias -- (1500 producidos por Actinomycetos) y otros sintetizados artificialmente. Se descubren cada año de 50 a 100 nuevos antibióticos.

Al trabajar con antibióticos se tiene el inconveniente de que existen microorganismos que les son resistentes, ya sea de manera natural (no poseen el sistema biológico sobre el que actúa el antibiótico) o adquirida (sufren una modificación estructural del sistema biológico sensible al antibiótico ; -- producen una nueva enzima que les permite usar otra ruta metabólica o que destruye al antibiótico).

1.3.1 Biogénesis de los antibióticos.

Por qué se producen los antibióticos?.

Esta es una pregunta acerca de la cual se ha especulado -- mucho, sin embargo no se ha llegado a ninguna conclusión defini

tiva. Algunos motivos pueden ser:

1. Son productos de rutas alternativas, dentro de las cuales las rutas normales fueron modificadas bajo circunstancias especiales. Tal sería el caso de la necesidad de disponer de sustratos diferentes ; por cambios genéticos en la ruta biosintética (en la síntesis de ácidos grasos, para la producción de antibióticos macrólidos) ; por defectos en el transporte de oxígeno, favoreciéndose la formación de compuestos específicos. (Wiley, P.F. et al., 1957).
2. Se cree que algunos antibióticos contienen en su molécula productos de desecho. (Foster, J.W., 1949).
3. Ciertos antibióticos aparecen como componentes celulares, tal es el caso de la bacitracina, que se encuentra en la unidad estructural primaria de la espora de Bacillus licheniformis.

1.3.2 Regulación genética de la biosíntesis de antibióticos.

La producción de metabolitos secundarios está sometida a regulación de las vías metabólicas, puede darse a diferentes niveles:

1. Mecanismos involucrados en las vías biosintéticas específicas para la formación de metabolitos secundarios: Retroinhibición. Se ha podido demostrar en el caso del cloramfenicol (Martin, J.F., 1978), en el cual la primera enzima de la ruta biosintética (arilamina sintetasa) que cataliza la conversión del ácido corísmico a p-aminofenilalanina, es reprimida por el cloramfenicol mismo.
2. Mecanismos que controlan la formación de precursores intermedios de los antibióticos: La regulación por retroalimentación de la síntesis de antibióticos por metabolitos primarios es un ejemplo de estos mecanismos. Tal es el caso de la biosíntesis de penicilina, inhibida al tenerse L-lisina.

na, ya que no permite la síntesis de aminoácido, precursor intermediario de la bencilpenicilina. (Martin, J.F., 1978).

Al añadir α -aminoácido al medio de fermentación, el efecto de la lisina es reversible (Demain, A.L. and Masurekar, - P.S., 1974).

3. Mecanismos que regulan el metabolismo energético de la célula: En este caso la represión catabólica juega un papel muy importante. Se ha demostrado en presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables, como glucosa o citrato. La glucosa puede inhibir la formación de β -galactosidasa, aún en presencia de lactosa, asimilándose así primero ; puede reprimir ciertas enzimas de la respiración y transporte electrónico, obligando a la célula a seguir la vía glucolítica ; afecta a nivel AMP_c .

Este tipo de represión se ha comprobado en la biosíntesis de penicilina, actinomicinas. (Gallo, M. and Katz, E., 1972)

1.3.3 Características del proceso en fermentaciones de antibióticos.

Las principales diferencias de la producción de antibióticos, con respecto al proceso de producción de biomasa o metabolitos primarios, son:

1. En la primera fase del crecimiento se generan energía y metabolitos, por el metabolismo primario, utilizándose para el crecimiento, no se forma producto. En la segunda fase, cuando el crecimiento es lento o prácticamente se detiene, se obtiene la máxima velocidad de producción del antibiótico.
2. Los organismos utilizados, son en su mayoría Streptomyces y hongos, cada uno sufre cambios morfológicos más o menos notables en el transcurso de la fermentación. Ej: La morfología micelial en la fase de alta productividad de eritromicina, -- cambia de filamentos delgados a hifas gruesas y ramificadas,

que forman anillos y espirales ; la producción de eritromicina disminuye abruptamente cuando se inicia la autólisis. -- (Bonsjak, et al., 1976).

Deberá tomarse en cuenta la posible presencia de mutantes, los cuales dan mayor viscosidad al medio. Se cree de todos modos, que la viscosidad del medio aumenta en cierta etapa del proceso.

3. Comparado con bacterias y levaduras, las velocidades de metabolismo de Streptomyces y hongos son más lentas. Pueden variar con las condiciones ambientales y según la forma y estructura celular.
4. Control e interrelación de variables. En el caso de metabolitos secundarios, la interrelación de las variables es mayor que para metabolitos primarios y aún después de conocer los mecanismos reguladores de la biosíntesis, éstos datos -- pueden resultar insuficientes para identificar cada factor limitante de la producción, de manera individual.
5. La producción del medio es compleja y se dificulta el medir crecimiento y producción cuando hay sólidos. Debido a la naturaleza del producto final resulta difícil medir en línea.

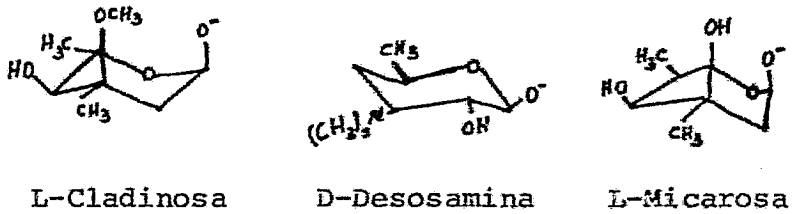
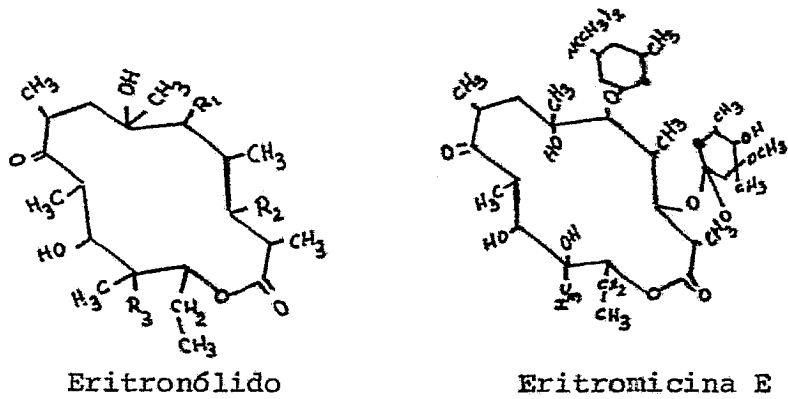
1.4 Revisión bibliográfica sobre eritromicina.

1.4.1 Estructura química de las eritromicinas.

Las eritromicinas, son un grupo de antibióticos macrolí-- dos, no poliénicos, producidos por Streptomyces erythreus, estructuralmente presentan como característica común la parte aglicona o eritronólido (anillo lactona macrocíclico, altamente sustituido, que contiene un oxígeno y 13 átomos de C). (Wiley et al., 1957).

Los azúcares que se unen al anillo lactona, mediante enla

Fig. 1.4.1.1. Estructura de las eritromicinas.



| | R_1 | R_2 | R_3 |
|----------------|------------|--|-------|
| Eritromicina A | desosamina | cladinososa | OH |
| Eritromicina B | desosamina | cladinososa | H |
| Eritromicina C | desosamina | micarosa | OH |
| Eritromicina D | desosamina | micarosa | H |
| Eritromicina E | desosamina | cladinososa (unida -- por enlace éster) | OH |

ces glucosídicos, pueden ser: Neutrales (cladinosa o micarosa) se unen al C-3 ; aminados (desosamina) se unen al C-5 .

En la naturaleza se presentan 4 tipos de eritromicina: A, B, C, D. Recientemente se aisló la eritromicina E, que representa un estado tardío de la ruta biosintética de este antibiótico. (Martin, J.F., et al., 1975). Fig. 1.4.1.1

La eritromicina A es la única que certifica la FDA, además es la forma más común y con mayor actividad antibiótica.

1.4.2 Propiedades fisicoquímicas de las eritromicinas.

| Eritromicina | A | B | C |
|-------------------------------------|---|---|---|
| P _f (°C) | 136-140 | 191-195 (202-203) | 121-125 |
| Peso molecular | 733 | 717 | 717 |
| Fórmula empírica | C ₃₇ H ₆₇ O ₁₃ N | C ₃₇ H ₆₇ O ₁₂ N | C ₃₆ H ₆₃ O ₁₃ N |
| [α] _D ²⁵ MeOH | -73.5° | | |

La eritromicina se detecta en el ultravioleta a λ 278nm. Debido al grupo amino de la desosamina, es básica (pK'_a 8.6). Ligeramente soluble en agua y lábil en medio ácido, por lo que para suministrarla en forma oral, se utilizan ésteres de la base, capaces de resistir la acidez gástrica ej: Ilotycin, etil-succinato (Oleinick, N.L., 1975).

1.4.3 Forma de acción y espectro antimicrobiano.

Las eritromicinas inhiben la síntesis de proteínas de -- ciertas bacterias (Herrel, W.E., 1958 ; Martin, W.J. and Wel lman, W.W., 1967), resultando altamente efectivas contra organismos Gram (+) y algunos Gram (-) (Mao, J.C.H. and Putterman M., 1968). Se utilizan principalmente contra infecciones causadas por estafilococos, pneumococos y estreptococos (grupo - A beta-hemolítico).

Los bacilos coliformes Gram (-), bacilos entéricos, mico-

bacterias y hongos patógenos, así como levaduras, protozoarios y células de animales superiores, son altamente resistentes a estos antibióticos. Algunos mutantes resistentes acumulan extracelularmente a la eritromicina, formando un complejo de baja estabilidad antibiótico-ribosoma, más no la destruyen. (Taubman, S.B. et al., 1963).

Para que la eritromicina sea activa, necesita un pH del medio de 5.5-8.5 . Además la actividad inhibitoria solo se tiene cuando los 2 azúcares están unidos al eritronólido. (Wilhelm, J.M. et al., 1968).

La inhibición de la síntesis de proteínas se efectúa mediante el enlace de la molécula de eritromicina a la subunidad 50s de los ribosomas de las bacterias sensibles, llegando a la saturación. Esta inhibición ocurre después de la activación de los aminoácidos y la transferencia de éstos al tRNA (bloquea el movimiento de los ribosomas a lo largo del mRNA) (Tanaka, S. et al., 1973). Se sugiere existe una acción compleja (Oleinick, N.L., 1975).

La eritromicina no es activa sobre ribosomas de mamíferos (Firkin, F.C. et al., 1969).

1.4.4 Biosíntesis de eritromicina.

Como se mencionó anteriormente, la molécula de las eritromicinas está constituida por 2 partes: el eritronólido (anillo lactónico) y los azúcares (neutral y aminoazúcar).

Se ha visto que el mecanismo básico de polimerización de ácidos grasos y los anillos lactónicos de antibióticos macrolíidos es virtualmente el mismo. A pesar de todo, se tienen marcadas diferencias estructurales entre los ácidos grasos (palmítico, etc) y el eritronólido de las eritromicinas (Corcoran, J.W., 1974).

Para comenzar la biosíntesis de los ácidos grasos, es ne-

cesaria la activación de los monómeros de acetato y malonato - por la coenzima A, para formar los ésteres de la misma. Posteriormente se tiene una secuencia de seis pasos sucesivos, catalizados por seis enzimas del S.S.F.A. (sistema sintetasa de los ácidos grasos), mediante reacciones de condensación, reducción y deshidratación. Fig. 1.4.4.1

Suponiendo que el sistema enzimático puede utilizar al 2-metilmalonato en el paso catalizado por la enzima condensante y a partir de ahí tener una serie de reacciones similares a la formación de ácidos grasos, se puede plantear un modelo hipotético de la formación del eritronólido. Una diferencia notable en relación a la síntesis de ácidos grasos, es que para la formación de la molécula del eritronólido, ninguna de las cetonas es eliminada antes de la lactonización (Corcoran, J.W., 1974).

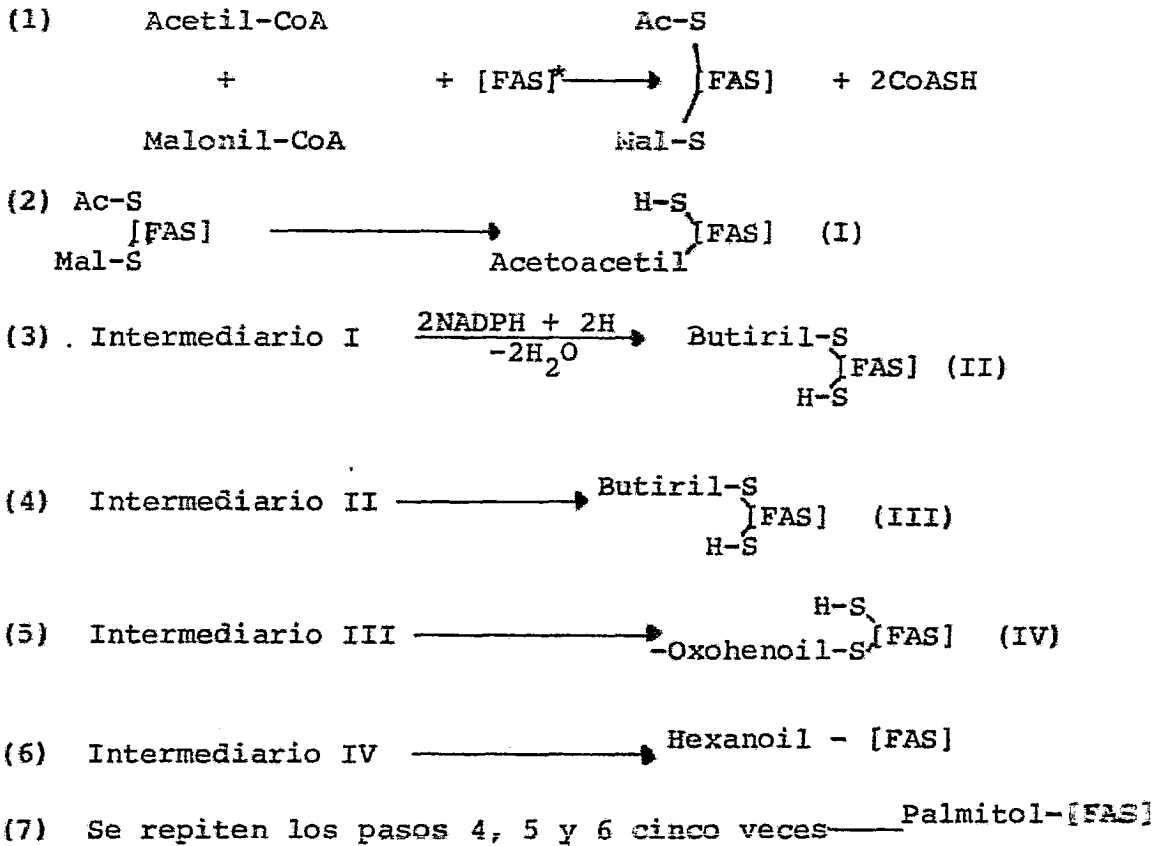
En la biosíntesis del antibiótico el paso inicial es la formación de la lactona, seguido por la adición secuencial de los azúcares (Corcoran, J.W., 1974) siendo esta última la etapa limitante de la velocidad de síntesis.

Fig. 1.4.4.2

Mediante estudios con trazadores, se llegó a las siguientes conclusiones sobre la biosíntesis del eritronólido:

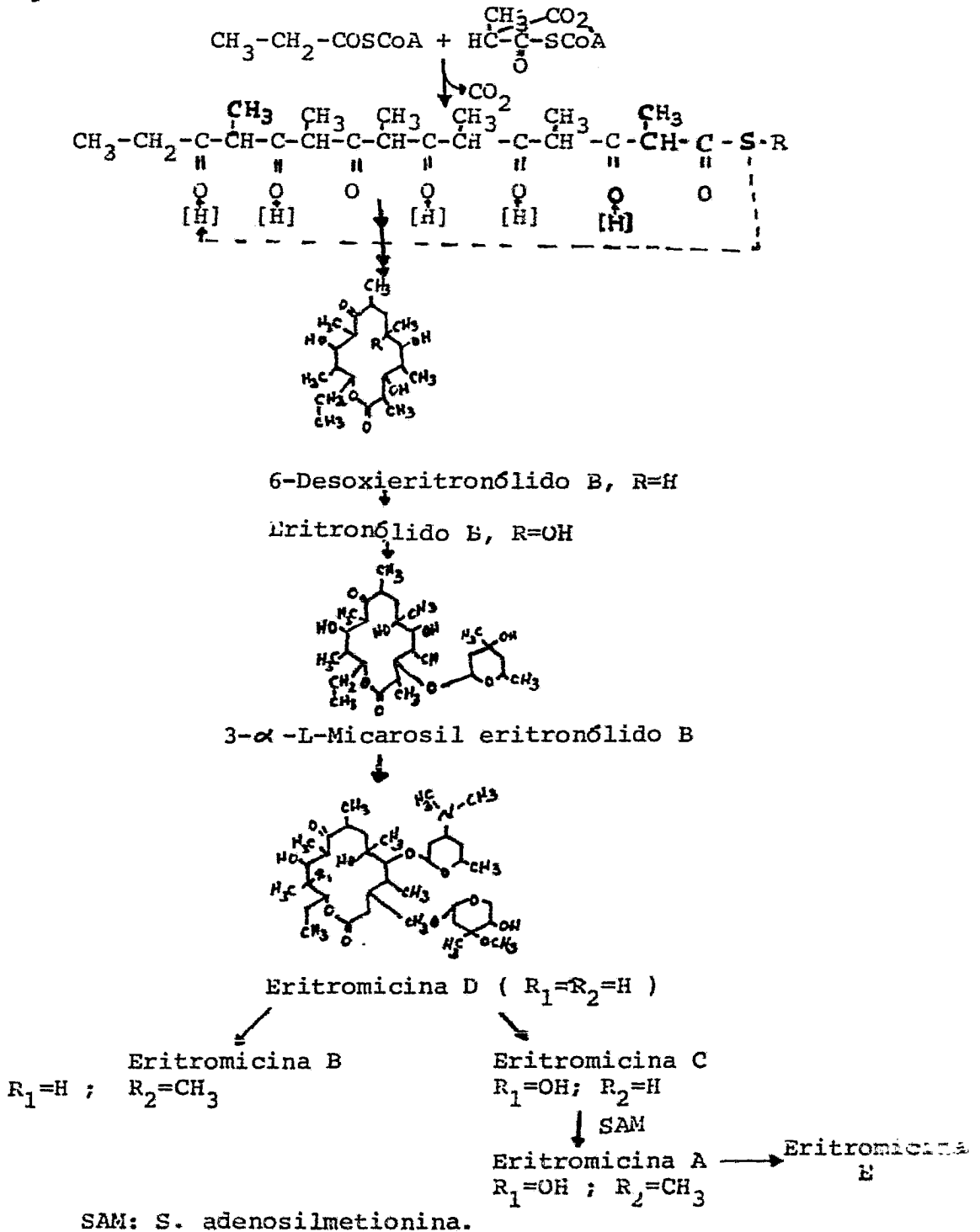
El anillo lactónico se forma a partir de condensaciones sucesivas de propionil CoA y 2-metilmalonil CoA. Una molécula de propionil CoA es utilizada para la unidad C₃ terminal y las otras 6 unidades son derivadas de 2-metilmalonil CoA (posiblemente por enlaces enzimáticos), de esta manera se obtiene el intermediario β -policetónico, después de algunas modificaciones se produce el 6-desoxieritronólido B, el cual al hidroxilarse en el C-6 forma el eritronólido B (este paso requiere de oxígeno y es fuertemente inhibido en presencia de CO (Vyngantas, A.M. y Corcoran, J.W., 1974).. Posteriormente se --

Fig. 1.4.4.1 Mecanismo de formación del palmitato:



*[FAS]= Sistema sistetasa de ácidos grasos.

Fig. 1.4.4.2. Biosíntesis de eritromicina.



transfiere el residuo L-micarosa de la dTDP-L-micarosa para -- sustituir al grupo 3-OH de la lactona.

La desosamina sustituye al OH del C-5 dando eritromicina D.

Más tarde la micarosa sufre una metilación, produciéndose eritromicina B, o bien el C-12 se hidroxila dando la eritromicina C, que a su vez se metila formándose eritromicina A (Celmer, W.D., 1965 ; Grisebach, H., 1967). Se ha visto que la concentración de eritromicina C es igual a la de eritromicina A al comenzar la fase de formación del antibiótico, pero durante la fase de crecimiento tardío, la concentración de eritromicina C disminuye rápidamente. En mutantes dependientes de metionina, en presencia de pequeñas cantidades de este aminoácido, se favorece la producción de eritromicina C.

A partir de la eritromicina A, algunas cepas de Streptomyces erythreus producen eritromicina E, en la cual la cladinosa es adicionada por la vía del orto éster (Martin, J.F. et al., 1975). Esta eritromicina es la que posee menor actividad antibiótica.

Con estudios traza se ha demostrado que los grupos metilo provienen de metionina.

1.5 Planeación y análisis de experimentos mediante métodos estadísticos.

El objetivo más importante en un proceso, es trabajar bajo condiciones óptimas, para así obtener un máximo rendimiento y mejor calidad del producto, en un mínimo de tiempo, al menor costo posible.

El proceso de optimización, depende del tipo de sistema que se tenga en estudio, pudiéndose utilizar diferentes modelos matemáticos: (Kafarov, 1976).

| | | |
|---|---|--|
| Métodos de optimización usados en -- Química e -- Ing. Química | 1. Métodos Analíticos | 1.a Optimización por búsqueda directa del extremo. |
| | | 1.b Método de múltiplos de Lagrangian. |
| | | 1.c Cálculo de variaciones. |
| | | 1.d Principio de Maximidad de Pontryagin. |
| | 2. Programa Matemático | 2.a Programa Geométrico. |
| | 2.b Programa Lineal. | |
| | 2.c Programa Dinámico. | |
| 3. Métodos de Gradiente | 3.a Todas las formas. | |
| 4. Optimización mediante control con computadora y modelo de adaptación | 4.a Todas las formas. | |
| 5. Optimización estadística. | 5.a Análisis regresional. | |
| | 5.b Análisis de correlación ; Método Brandon ; Método Box-Wilson; Método Plackett-Burman ; etc. | |

1.a Optimización por búsqueda directa del extremo.

Es un proceso determinístico representado por funciones diferenciales. Es utilizado para maximizar o minimizar una sola función, la cual es específicamente analítica. No se maneja más de una variable independiente debido a la complejidad del procedimiento dimensional, ej: En el análisis de una curva parabólica.

1.b Método de múltiplos de Lagrangian.

Proceso determinístico descrito por funciones diferenciales restringidas por desigualdades. Empleado para maximizar o minimizar una función, mediante igualdad de ecuaciones. Es un método muy eficaz en los casos de programación que deben reducir el número de dimensiones involucradas ej:

Para reducir las dimensiones de un tanque de fermentación.

1.c Cálculo de variaciones.

Método basado en la solución de funciones mediante la ecuación de Euler. Se utiliza para la optimización de reactores adiabáticos multicapa ; condiciones óptimas de temperatura para reacciones exotérmicas irreversibles, en camas de flujo cerrado ; condiciones óptimas de temperatura para reactores químicos, en caso de reducción del rango de temperatura.

1.d Principio de maximidad de Pontryagin.

Se basa en diversos teoremas y sistemas de ecuaciones diferenciales simultáneas. Se aplica a problemas de control automático (Pontryagin, L. et al., 1961 ; Boltyansky, V. -- 1966).

2.a Programa Geométrico.

Método basado en la optimización de funciones algebraicas del tipo: $F(x_1, x_2, \dots, x_n) = \sum_{j=1}^n C_j P_j(x_1, x_2, \dots, x_n)$

x: son números reales C: constante positiva.

Un ejemplo de su aplicación es: para minimizar tiempos de filtración (Kermode, R., 1967).

2.b Programa Lineal.

Método mediante el cual se maximiza o minimiza una función de tipo lineal, con variables a optimizar mayores o iguales a cero.

Es muy utilizado en la manufactura de productos con los cuales se logra obtener una máxima restitución de materias primas ; empleo óptimo del equipo ; disminución de costos por transporte.

2.c Programa Dinámico.

Programa en el cual el proceso se divide en etapas y se -

optimiza cada una de ellas de manera independiente a las demás. Se usa una ecuación funcional de tipo:

$$F_N(x) = \max_{Y_{N-1}} (\Phi_N(Y_N) + F_{N-1}(x-Y_N))$$

En donde: $F_N(x)$ es la función a optimizar ; $N=n^a$ de etapas restantes del proceso ; x =variable de estado ; $F_{N-1}(x-Y_N)$ = función objetivo para (N-1) etapas sucesivas, después de de cidir el valor Y_N .

Aplicación: en procesos multietapas: destilación, extracción, absorción. Reactores de cascada, reactores de interacción en cadena, etc.

3.a Métodos de Gradiente.

Método que reduce el número de valores de las variables in dependientes, generando así un máximo cambio en la función ob jetivo. Se emplea en reactores sencillo y de interacción en cascada.

4.a Optimización por computadora y modelo de adaptación.

Se emplean programas adaptados a computadoras. Utilizado en sistemas complejos de Ingeniería Química.

5.a Optimización estadística.

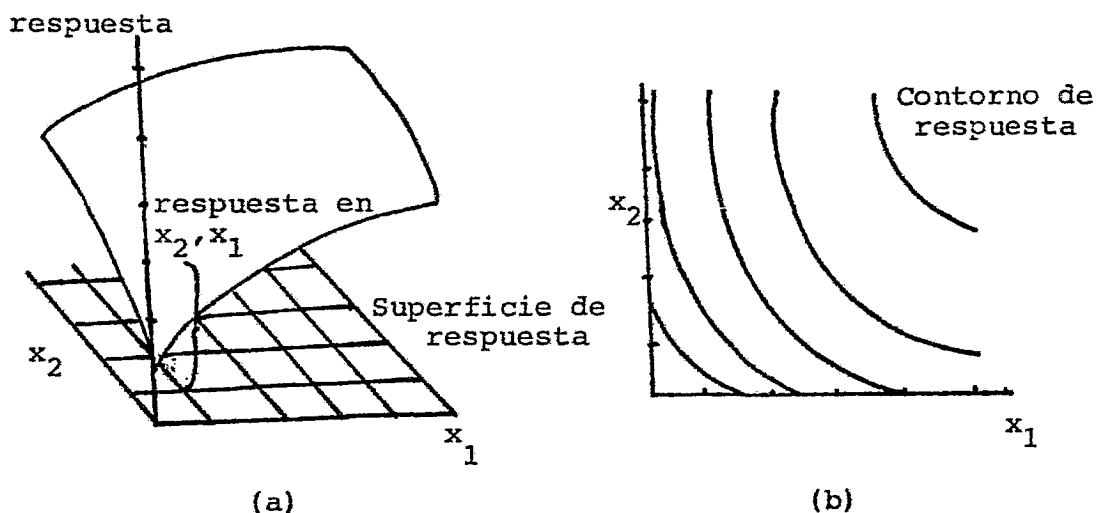
En estos métodos se elabora un modelo conceptual del fenómeno en estudio, mediante un determinado diseño. Generalmente se basa en una variación simultánea de todas las variables del proceso, permitiendo de esta manera estimar la inter acción de variables con un número reducido de experimentos.

Dentro del rango de optimización estadística se encuentran los análisis regresional y los de correlación, los cuales aplicados correctamente, pueden proporcionar límites adecuados para establecer una relación entre las variables del proceso y las condiciones óptimas.

En estos métodos las variables independientes se denominan

" factores " y el espacio coordinado " espacio factorial ". - En el espacio factorial, la semblanza geométrica de las funciones de respuesta, es la " superficie de respuesta ", de esta manera se manejan los datos en una línea y una región óptimas.

Fig. 1.5.1 (a) Superficie de respuesta.
(b) Representación del contorno de superficie.



Para simplificar el trabajo, es necesario seleccionar una función simple, desde el punto de vista matemático, para después de una forma progresiva hacerla más compleja y asimilar las relaciones del sistema real. El modelo más sencillo de que se dispone es el de tipo " lineal " siendo, en este caso, muy útil la ecuación de regresión, en la que se encuentran condensados todos los datos que contiene una matriz inicial y expresa la contribución de cada factor o variable del proceso a la respuesta.

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{u,j=1}^k b_{uj} x_u x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} x_j^2 + \dots$$

- | | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| b_0 : término independiente | b_j : términos lineales |
| | b_{jj} : términos cuadráticos |
| | b_{uj} : interacción de términos |

El coeficiente de regresión es una variación que experimenta la respuesta, debido a una variación unitaria variable. Se calculan por el método de mínimos cuadrados.

Pueden presentarse diversos casos particulares:

- Regresión lineal con una variable: $\hat{y} = b_0 + b_1x$ los coeficientes se calculan por medio de determinantes.
- Regresión parabólica: $\hat{y} = b_0 + b_1x + b_2x^2$ Al tenerse una ecuación de regresión polinomial de cualquier orden, en el método de mínimos cuadrados, se buscará resolver el sistema de ecuaciones lineales, mediante un sistema de ecuaciones normales.
- " Análisis de correlación " La dependencia de una variable independiente (el experimentador puede ajustarla al nivel -- que desee) con una dependiente (es la respuesta) se denomina correlación.
- Método de correlación múltiple: $\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$
Se resuelve mediante un sistema de ecuaciones normales. En muchos casos es necesario el auxilio de una computadora.
- Análisis regresional en forma de matrices: Se elabora una matriz en donde las variables independientes deberán ser linealmente independientes. Se utiliza la variable dummy $x_0 = 1$ (Nalimov, V. et al., 1965).

$$\hat{y} = b_0x_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k$$

- Desarrollo de ecuación de regresión múltiple por el método de Brandon: $\hat{y} = af_1(x_1)f_2(x_2) \dots f_j(x_j) \dots f_k(x_k)$ en donde $f_j(x_j)$ es función de x_j (Brandon, D., 1959).

En el diseño experimental se busca una estrategia con la cual se obtenga un modelo adecuado, con un mínimo de experimentos. Los diseños factoriales son los más indicados, debido a que son los que más se acercan al diseño ideal y se pueden gra

ficar fácilmente. (Box, G. et al., 1978).

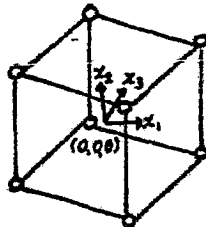
En un diseño factorial se fija un cierto número de valores o niveles para cada factor, el cual varía lentamente de un experimento a otro. Si todas las combinaciones posibles de factores, son usadas, el experimento es un diseño factorial completo.

Dentro de los diseños factoriales, los más importantes son los de 2 niveles, debido al ahorro de experimentos que representan ej: Para un diseño factorial de $2 \times 3 \times 5$ se necesitan 30 experimentos (se deben variar los factores uno a uno y no se observan las interacciones), si en cambio se utilizan 2 niveles será: $2 \times 2 \times 2 = 2^3 = 8$ experimentos.

En este tipo de diseño, se tiene un punto central, o nivel base, un nivel superior (+1) y un nivel inferior (-1), con lo cual se obtiene un modelo ortogonal.

Geométricamente, el diseño se puede interpretar como un cubo, en el que cada esquina representa uno de los 8 experimentos.

Fig. 1.5.2 Representación geométrica de un diseño factorial con 2 niveles.



Todas las combinaciones posibles en 2 niveles, quedan representadas en una matriz, la cual se elabora mediante la ecuación $N=2^k$ en donde: $N=n^2$ de experimentos ; $K=n^2$ de variables. Para que se cumpla la ortogonalidad, todas las columnas de vectores deberán sumar cero, con esto se reduce la dificultad para calcular los coeficientes de regresión, pues al ser diagonal el número de experimentos, en la matriz inversa los

coeficientes de regresión serán independientes.

Ecuación de regresión:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{1,2} x_1 x_2 + b_{1,3} x_1 x_3 + b_{2,3} x_2 x_3 + b_{1,2,3} x_1 x_2 x_3$$

Con la ecuación de regresión, la cual se obtiene al finalizar los experimentos, se pueden estimar las interacciones entre las variables, así como sus efectos, todo ello simplificado por el Algoritmo de Yates, cuyo procedimiento se basa en una secuencia de sumas y diferencias de los resultados obtenidos en los experimentos.

Ventajas de los experimentos factoriales:

1. Son los diseños experimentales más perfectos de que se dispone.
2. Fáciles de planear y calcular.
3. Al ser balanceados, cualquier error de experimentación, -- sistemático tiende a eliminarse.
4. Los ejes de regresión (columna de niveles de cada factor) son perfectamente ortogonales, o sea, se calculará que todas las variables tengan un grado de influencia similar, para que de esta forma se refleje en la respuesta su acción verdadera y no opaque a otras variables.
5. Se ahorra tiempo y se reduce el costo de experimentación.

Desventajas:

1. Puede darse el caso de que se trabaje fuera de la región de interés.
2. Si los niveles superior e inferior no se eligen correctamente, pueden tenerse 2 inconvenientes: Si el rango de trabajo es muy pequeño, el error experimental puede dominar los resultados ; si el rango es muy amplio el modelo lineal no se cum-

ple.

Existen varios métodos que por sus características de eficiencia y fácil estructura, pueden aplicarse al diseño y optimización de procesos.

- Método Plackett-Burman. (Fabila, C.G., 1980).

Este método se basa en un diseño factorial completo, elaborándose una matriz, mediante combinaciones maestras de niveles. Con estas combinaciones maestras pueden llegar a observarse hasta 100 factores de manera simultánea, las más comunes son:

N= 8 + + + - + - -

N= 12 + + - + + + - - - + -

N= 16 + + + + - + - + + - - + - - -

N= 20 + + - - + + + + - + - + - - - - + + -

N= 24 + + + + + - + - + + - - + + - - + - + - -

N= n^a de experimentos.

Cada diseño se emplea para estudiar N-1 variables. Pueden utilizarse dummies para completar la matriz, en el caso de contar con un número reducido de variables, pero nunca se deben usar más de 3.

La matriz obtenida debe ser ortogonal y responde a un balance de bloques, por lo que permite estimar los efectos de los factores principales al analizar la ecuación de regresión

Ejemplos de bloques de variables son: A , B, AB, C, AC,etc

Debido a esta ventaja es utilizado para " evaluar el grado de influencia de las diferentes variables consideradas " y así emplearlas en la posterior optimización del proceso en cu
est
ión.

Este método permite utilizar un número elevado de variables (ej: 11) de manera simultánea, por lo que tiene aplicación a nivel laboratorio. Es rápido y se elabora con un míni

mo de experimentos.

Presenta la desventaja de los métodos factoriales, además de que deberá conocerse ampliamente el proceso con el cual se va a trabajar.

- Método Box-Wilson. (Rose, L.M., 1981).

Corresponde a un diseño factorial completo, en el cual se deberá diseñar una matriz con $N-2$ experimentos y cuya estructura como en el método anterior, corresponde a combinaciones maestras y presenta ortogonalidad.

Para elaborar la matriz puede usarse un número elevado de variables, aunque por razones prácticas, es aconsejable no variar simultáneamente más de 4 ó 5 variables con 2 niveles.

Para elegir los niveles superior (+1) e inferior (-1) de los factores, se parte de que se tiene una región local para experimentación, en vecindad con un punto central.

Posterior a la experimentación, los resultados se ajustan a un modelo lineal, mediante la ecuación de regresión correspondiente, siendo posible de esta manera, determinar los valores de los efectos de los factores, tanto solos, como en interacción con otras variables.

En este último paso es de gran utilidad el análisis residual, mediante el cual es posible conocer las deficiencias del modelo y su eventual mejora. Si los residuos (todo aquello -

no considerado en la regresión) son cero, puede tenerse la seguridad de que el modelo matemático está reflejando la realidad.

Este método permite encontrar " los niveles óptimos de variación de los factores considerados ".

El método Box-Wilson es de muy importante aplicación en la optimización de procesos.

Ventajas: -

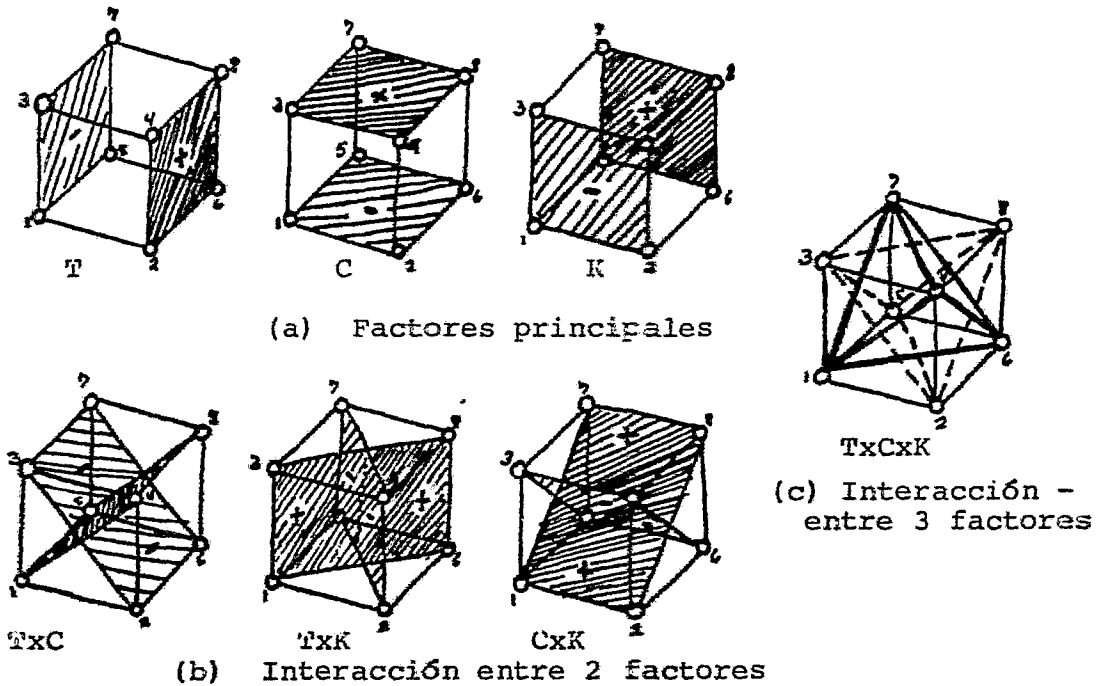
- A pesar de ser un modelo lineal, puede llegar a ajustarse para revelar el modelo real.
- Es rápido y preciso.
- Al permitir el uso de numerosas variables, de manera simultánea, puede aplicarse a investigaciones de laboratorio.
- Siempre se obtiene una mejora en el proceso.
- Es un algoritmo sistemático, lo cual es de gran valor en una situación compleja.
- No se ha demostrado otra alternativa válida.

Desventajas:

- Desventajas de los métodos factoriales.
- Si las variables elegidas no son las adecuadas puede trabajarse en otra región experimental.
- Es primordial la intuición personal y la experiencia del investigador.

Fig. 1.5.3 Representación geométrica de las interacciones entre factores, para un diseño factorial con 2 niveles.

Fig. 1.5.3 Representación geométrica de las interacciones, para un diseño factorial con 2 niveles.



- Método de Operación Evolucionaria (EVOP).

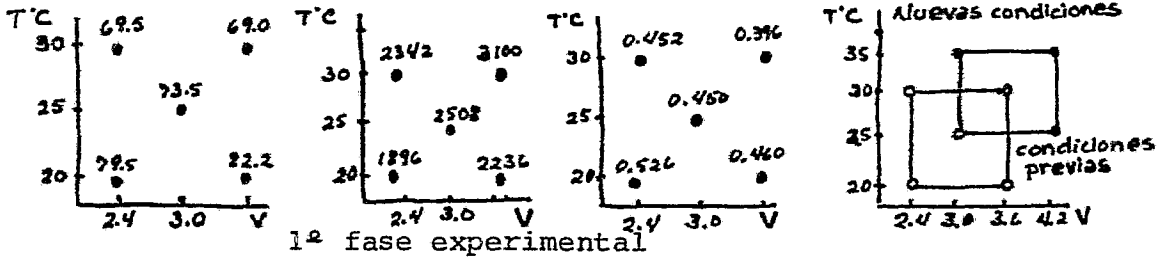
Con la técnica EVOP, el proceso en estudio se divide en una serie de fases consistentes en un ciclo repetitivo, Cada ciclo puede comprender un diseño factorial completo o fraccionado. Al terminar cada etapa, se separa el punto con mayor producción y se emplea como centro experimental de la fase siguiente. (Box, G. et al., 1978).

Para pasar de una fase a otra, las modificaciones deberán ser mínimas, para que de esta manera puedan detectarse diferencias muy pequeñas con respecto al proceso normal, además de que el error experimental queda prácticamente eliminado.

Al llegar al óptimo deseado, los resultados se ajustan a un modelo lineal, mediante la ecuación de regresión correspondiente.

te.

Gráficamente el procedimiento es de la forma siguiente:
(Box, G., 1957). Fig. 1.5.4.



- (a) Rendimiento del producto (%).
- (b) Producción por día.
- (c) Costo por unidad de producto.
- (d) Diseño de la 2ª fase.

Variables independientes: Temperatura de reacción, velocidad.

Variables dependientes: Rendimiento, producción, costos.
(a optimizar)

Cada ciclo se trabajó con un diseño factorial completo, para 2 variables (2^2) con un centro experimental.

(Lowe, G., 1964 ; Lipovchak, M., 1964 ; Carpenter, B. et al 1965).

Ventajas:

- Es un método con el cual se detectan variaciones mínimas.
- Tiene aplicación a nivel planta piloto y escala industrial, ya que si se utilizaran métodos en los cuales se detecten cambios fuertes, las condiciones de operación podrían resultar - peligrosas o de costo muy elevado.

Desventajas:

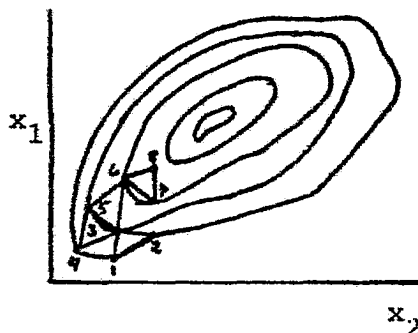
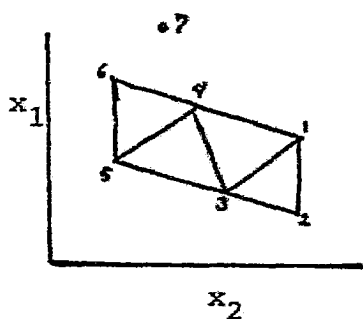
- Se deben variar pocos factores (ej:3) ya que de otra forma resultaría complicado detectar interacciones.
- No es útil a nivel laboratorio.

- Método EVOP SIMPLEX. (Kafarov, V. 1976).

Es una variación del método EVOP, ya que también es repetitivo, en este caso se elabora una figura geométrica, definida por un número de puntos equivalente al número de factores más uno. Los puntos son equidistantes en el espacio dimensional, por lo que cumplen con la propiedad de ortogonalidad. Ej: - Para un solo factor se tendrá una línea (2 puntos) ; para 2 factores, se tendrá un triángulo (3 puntos) ; etc.

Es aconsejable no manejar más de 4 variables simultáneamente, pues su diseño geométrico será difícil de visualizar.

Diseño para 2 factores:



Después de obtener el diseño del primer experimento, se busca el punto con rendimiento menor y en su cara opuesta, se plantea el nuevo SIMPLEX. Se continúa de la misma manera hasta llegar a la región óptima deseada.

Este método se utiliza en la optimización de procesos en planta piloto y laboratorio, aunque resulta más lento que los métodos anteriores.

Ventajas:

- Se considera que al tenerse un movimiento rápido de los factores, no es necesario reducir experimentalmente el error para cada punto.

Desventajas:

- Es un método lento.
- Restringido a un número reducido de variables.
- No proporciona la retroalimentación científica del EVOP.
- Método EVOP ROTATORIO. (Fabila, C.G., 1980).

Este método está representado por una ecuación cuadrática, debido a que este tipo de ecuación no puede ser ortogonal, se ideó un método mediante el cual la ecuación de regresión conserve su precisión, aún cuando se tengan rotaciones de los ejes coordenados, durante la optimización. Esto es que posea la propiedad de rotabilidad o girabilidad.

El procedimiento es el siguiente:

A un determinado diseño factorial (ej: Con experimentos - 1, 2, 3, 4) se le añaden experimentos sobre los ejes (ej: - 5, 6, 7, 8) y a una distancia del origen o centro experimental, que sea proporcional a la esfera que envuelve el factorial (ej: 2). Con el objeto de disminuir correlaciones entre los coeficientes de regresión, se añade un número determinado de experimentos centrales (ej: 9, 10, 11, 12, 13) que - permiten adicionalmente, calcular el error experimental. Los experimentos girables pueden constar hasta de 7 factores, un número más elevado de ellos, traería consigo un exceso de experimentos. (Box, G. and Wilson, K.).

Componentes para diseños centrales. Compuestos girables - de 2^a orden:

| No. factores. | No. de puntos Factorial | No. de puntos en estrella | Centro | Total | Vector de α |
|---------------|-------------------------|---------------------------|--------|-------|--------------------|
| 2 | 4 | 4 | 5 | 10 | 1.4142 |
| 3 | 8 | 6 | 6 | 20 | 1.6818 |
| 4 | 16 | 8 | 7 | 31 | 2.0000 |
| 5 | 16 | 10 | 6 | 32 | 2.3784 |
| 6 | 32 | 12 | 9 | 53 | 2.8282 |
| 7 | 64 | 14 | 10 | 88 | 3.3636 |

El número de experimentos necesarios se calcula mediante la ecuación:

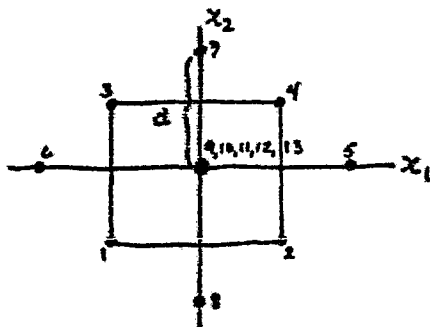
$$NEXP = 2^q + 2q + EXP_0$$

q: n° de factores. Hasta q=4 se usa el factorial completo ; - de q=5 en adelante medio factorial confundido por su interacción superior. El n° de experimentos centrales (EXP_0) depende de cada diseño. α es el valor de la distancia de la estrella en unidades experimentales: $\alpha = 2^{q/4}$ hasta q=4 y $\alpha = 2^{(q-1)/4}$ para q > 4.

La matriz planteada es de la siguiente forma:

| N | x_0 | x_1 | x_2 |
|---|-------|-----------|-----------|
| 1 | +1 | +1 | +1 |
| 2 | +1 | +1 | -1 |
| 3 | +1 | -1 | -1 |
| 4 | +1 | -1 | +1 |
| 5 | +1 | $+\alpha$ | 0 |
| 6 | +1 | $-\alpha$ | 0 |
| 7 | +1 | 0 | $+\alpha$ |
| 8 | +1 | 0 | $-\alpha$ |
| 9 | +1 | 0 | 0 |

Representación de las variables, sobre los ejes coordenados.



Finalmente se puede obtener una ecuación de regresión, -- que presente ortogonalidad.

Ventajas:

- Es un método rápido.

Desventajas:

- Se debe trabajar con un número reducido de variables.
- Es un método laborioso tanto en el diseño de experimentos, - como en cálculos.

2. EXPERIMENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS.

2.1 Objetivos.

La fase experimental de este trabajo se dividió en 3 etapas, abordando en cada una de ellas objetivos bien definidos:

- I. Utilizando una cepa de Streptomyces erythreus elaborar un medio de cultivo soluble, para la producción de eritromicina, con el fin de una posterior aplicación en cultivos continuos.
 - a) Determinar que parámetros fisicoquímicos pueden influir en la producción del antibiótico.
 - b) Probar diversas fuentes de C y N para seleccionar y estandarizar un medio que proporcione el máximo de producción.
- II. Estudiar la cinética de crecimiento del Streptomyces erythreus en el medio de cultivo standard.
- III. Por medio de los métodos estadísticos Plackett-Burman y -Box-Wilson, optimizar las condiciones de producción de eritromicina en el medio elegido.

2.2 Técnicas de medición de los diversos parámetros en la fermentación.

Durante la fermentación se midieron los siguientes parámetros:

1. Concentración de eritromicina en el caldo de fermentación. Método de Bioensayo.
2. Concentración de carbohidratos totales en el caldo de fermentación. Método de Antrona.
3. pH. en el medio de cultivo. Se utilizó un potenciómetro equipado con electrodo de vidrio.
4. Determinación de la concentración celular:
 - a) Densidad óptica (D.O)
 - b) Peso seco (p.s)
 - c) Paquete micelial (P.M.V)

2.3 Determinación de los parámetros fisicoquímicos que influyen en la producción del antibiótico.

En base a los estudios reportados en la literatura, se -- consideraron las principales variables que pueden afectar la -- producción de eritromicina, tales como:

1. Temperatura.
2. Variación del pH durante la fermentación.
3. Evaporación del medio de cultivo.
4. Concentración de oxígeno disuelto.
5. Presencia de inductores.

Con este fin se utilizó un medio de cultivo complejo, con la siguiente formulación:

| | | | |
|-----------------------------|------|------------------------------|-------------|
| Glucosa | 10 g | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 6 g |
| Melazas | 10 g | NaCl | 2.5 g |
| Ca(CO ₃) | 8 g | H ₂ O | cbp 1000 ml |
| pH antes de esterilizar 7.6 | | | |

2.3.1 Influencia de la temperatura.

Se trabajó a 37°C y 34°C observándose que la mejor temperatura, tanto para el crecimiento del micelio, como para la -- producción de eritromicina es de 37°C.

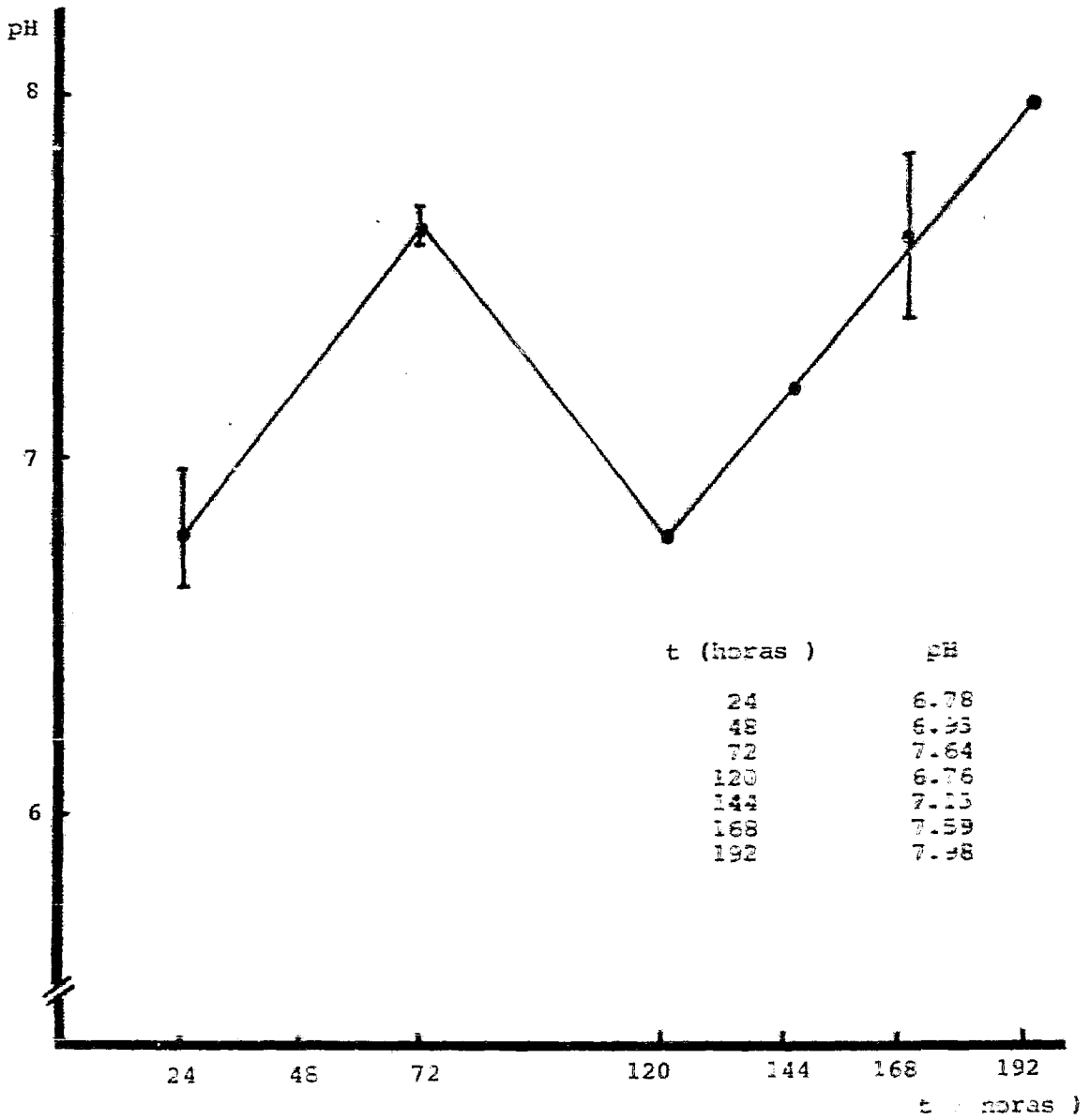
2.3.2 Variación del pH durante la fermentación.

Durante las primeras horas, se observó un aumento en el -- pH, a las 72 horas comenzó a descender, para finalmente a las 120 horas aumentar de nuevo hasta un pH de 8.

Se ha comprobado que en casi todos los medios, el pH presenta este tipo de variación. Se supone es originada por la -- desaparición de azúcares del medio y subsecuente utilización -- de ácidos orgánicos intermediarios, sumado a la aparición de -- compuestos nitrogenados, resultantes de la lisis celular (Stark W.M. & Smith, R.L., 1961 ; Gros, I. et al., 1978). El aumen-

Fig. 2.3.2.1

VARIACION DEL pH DURANTE LA
FERMENTACION
(pH v.s. t)



to de pH corresponde al período de producción del antibiótico, a su vez dicha producción es paralela al consumo de carbohidratos.

Es muy importante tomar en cuenta la variación del pH con la esterilización, para así evitar que salga de los rangos de producción o de estabilidad de la eritromicina. Fig. 2.3.2.1

2.3.3 Evaporación del medio de cultivo.

Este es un punto muy importante, ya que si la evaporación alcanza límites considerables, pueden tenerse errores en la interpretación de resultados, así como problemas de transferencia de masa.

Se han reportado pérdidas de un 10-20% en volumen para matraces agitados. (Solomons, G.L., 1969).

También se ha demostrado que el tipo de tapón tiene una gran influencia, ya que en parte dependerá de su volumen y tipo de material el grado de evaporación. No debe olvidarse que un tapón húmedo facilita la contaminación.

La temperatura de incubación y la velocidad de agitación también influyen en este caso, mas no sucede así con el volumen inicial del medio de cultivo.

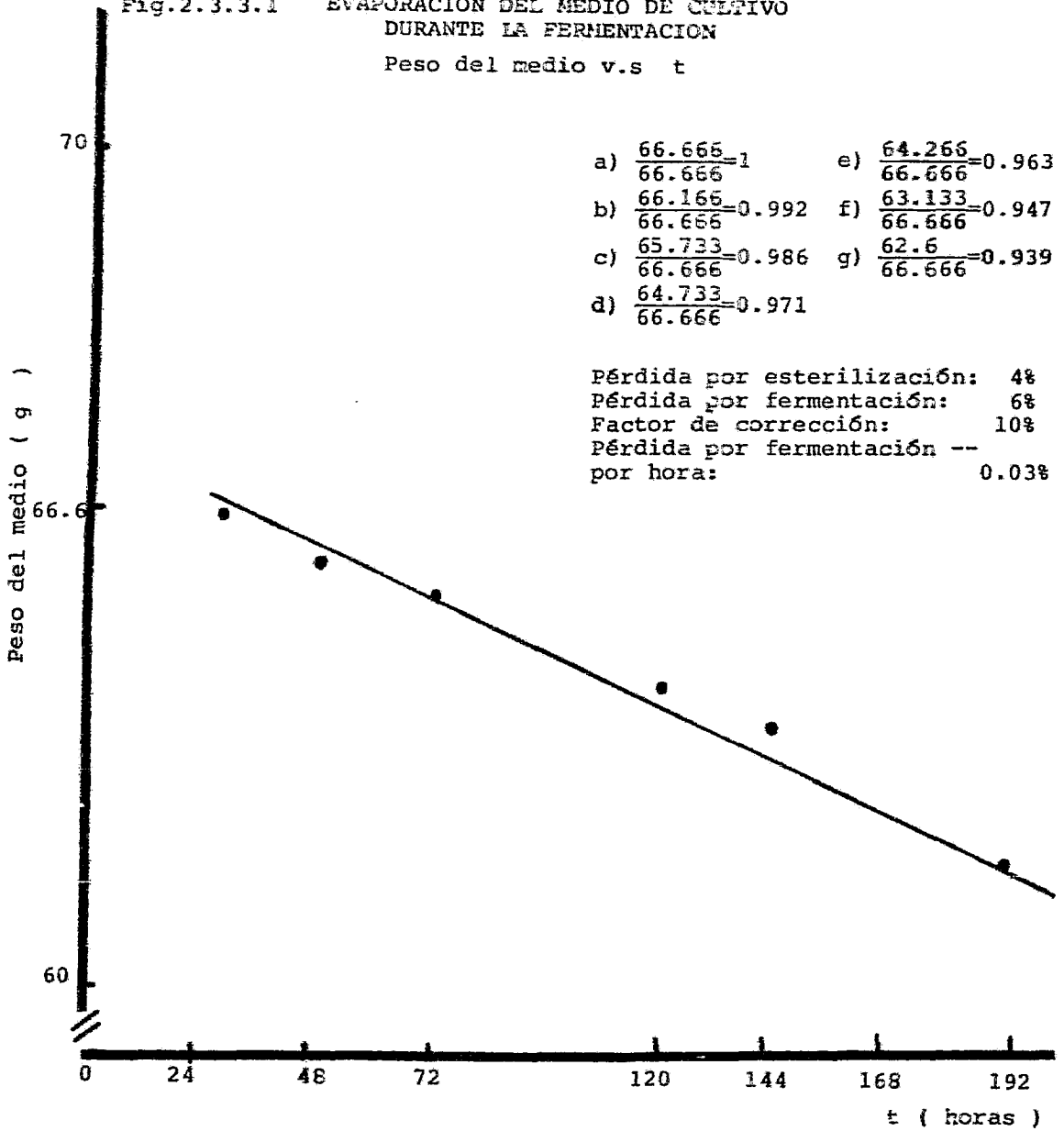
Condiciones de experimentación:

Medio inoculado ; tiempo de fermentación 192 horas ; T 37°C ; agitación 200 rpm ; Matraces Erlen Meyer de 250 ml con 70 ml - de medio.

Posterior a la pérdida por esterilización, se observó una evaporación continua de 0.03%/hora, llegando hasta un 10% de pérdida, lo que se utilizó como factor de corrección en los experimentos sucesivos. Fig. 2.3.3.1

La evaporación del medio se calculó por diferencia de peso.

Fig.2.3.3.1 EVAPORACION DEL MEDIO DE CULTIVO DURANTE LA FERMENTACION
Peso del medio v.s t



- a) $\frac{66.666}{66.666}=1$
- b) $\frac{66.166}{66.666}=0.992$
- c) $\frac{65.733}{66.666}=0.986$
- d) $\frac{64.733}{66.666}=0.971$
- e) $\frac{64.266}{66.666}=0.963$
- f) $\frac{63.133}{66.666}=0.947$
- g) $\frac{62.6}{66.666}=0.939$

Pérdida por esterilización: 4%
Pérdida por fermentación: 6%
Factor de corrección: 10%
Pérdida por fermentación --
por hora: 0.03%

2.3.4 Concentración de Oxígeno Disuelto.

La concentración de oxígeno disuelto es sumamente importante y en fermentaciones aerobias puede llegar a ser un factor limitante, por lo que deberá encontrarse en concentración superior a la crítica.

En la biosíntesis de eritromicina, el oxígeno es necesario para la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico a ácido acético, el cual es un intermediario obligatorio en la síntesis (Páca, J. et al., 1978).

Durante la fase de producción del antibiótico, el micelio es más denso, por lo que aumenta la viscosidad del medio y se dificulta la transferencia de oxígeno.

Se ha demostrado que la transferencia de oxígeno a través de tapones de algodón es menor conforme el tapón es más denso, teniéndose además un aumento en la concentración de CO_2 en el matraz.

Considerando todo lo anterior, se fijó un volumen de medio de aproximadamente un tercio del volumen del matraz. Se usaron tapones de algodón y gasa de volumen uniforme y una agitación promedio de 200 rpm.

2.3.5 Presencia de inductores.

Se utilizó n-propanol como inductor de la biosíntesis de eritromicina, ya que es un precursor del propionil-CoA, el cual entra a formar parte del anillo lactona. Se ha encontrado que las cepas de Streptomyces erythreus, con alta productividad requieren de una elevada actividad de la propionato cinasa durante la fase estacionaria de crecimiento (aproximadamente a las 72 horas). Si el alcohol n-propílico se añade durante el primer período de fermentación, puede suprimir la biosíntesis del antibiótico.

Se planeó un experimento para conocer el tiempo de adi--

ción y concentración más adecuados para el inductor.

MEDIO DE REFERENCIA
PRODUCCION 2000 µg/ml

| | | | |
|----------------------------------|--------|------------------------------|---------|
| Harina de soya (desgrasada) | 33 g | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.4 g |
| Almidón de maíz | 31.5 g | CaCO_3 | 7.2 g |
| Dextrina | 30.4 g | H_2O cbp | 1000 ml |
| pH antes de esterilizar | 7.2 | | |

Condiciones de cultivo:

Matraces Erlen Meyer de 250 ml

Vol. medio 50 ml

Vol. inóculo 2 ml

Edad del inóculo 36 horas

Corrección de volumen 10%

pH antes de esterilizar 7.2

Temperatura de incubación 37°C

Agitación 200 rpm

Tiempo total de fermentación 200 horas

Concentración del inductor (n-propanol) (%):

0.5 ; 3.0 ; 5.0 ; 6.0 ; 8.0 ; 12.0

Tiempo de adición posterior al inóculo (horas):

0 ; 24 ; 36 ; 48 ; 72

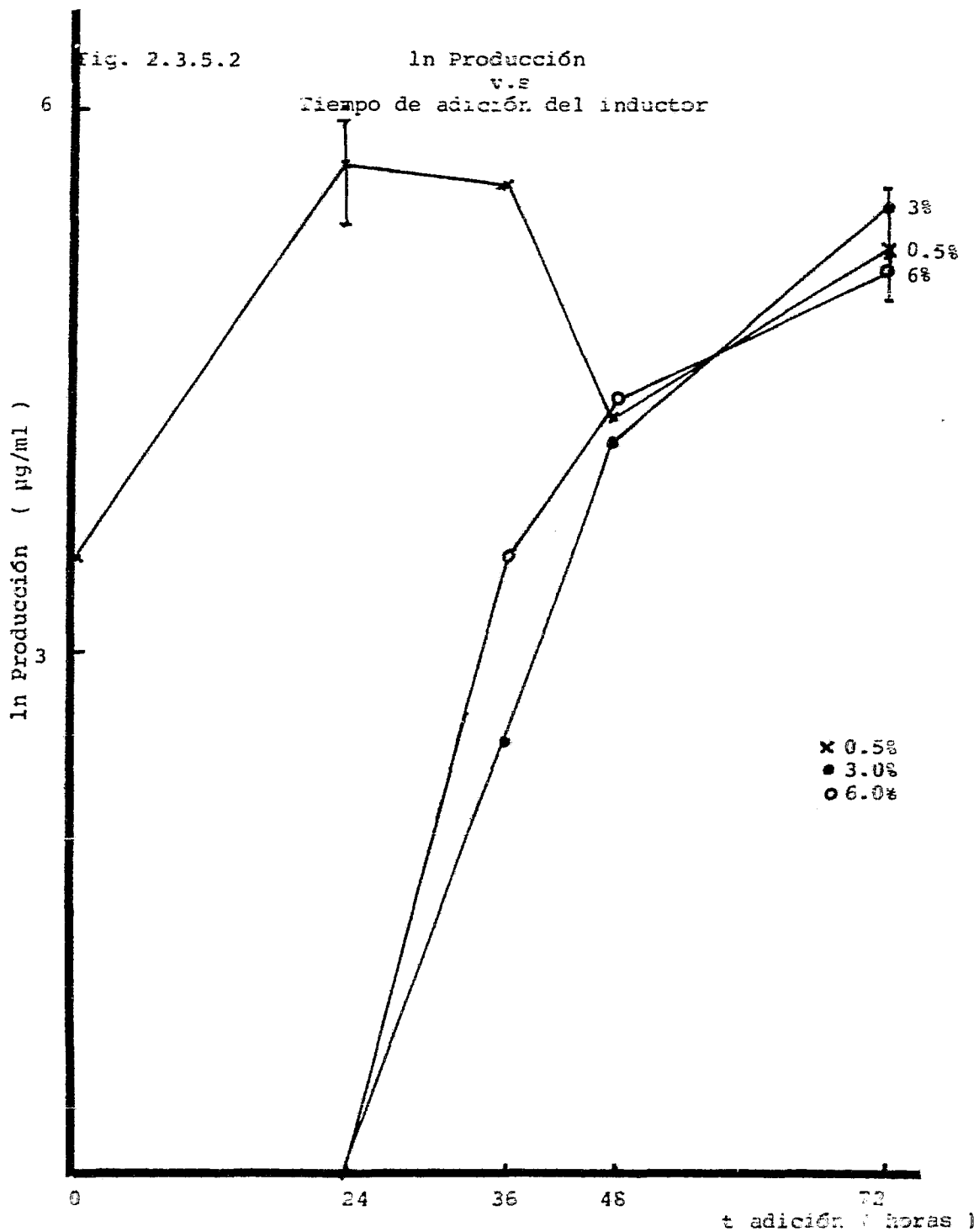
Como se observa en la Fig. 2.3.5.1 se encontró que la producción se favorece con bajas concentraciones de n-propanol, observándose que la concentración óptima de inductor es de 0.5% adicionado a las 24 horas de fermentación. Fig. 2.3.5.2;2.3.5.3

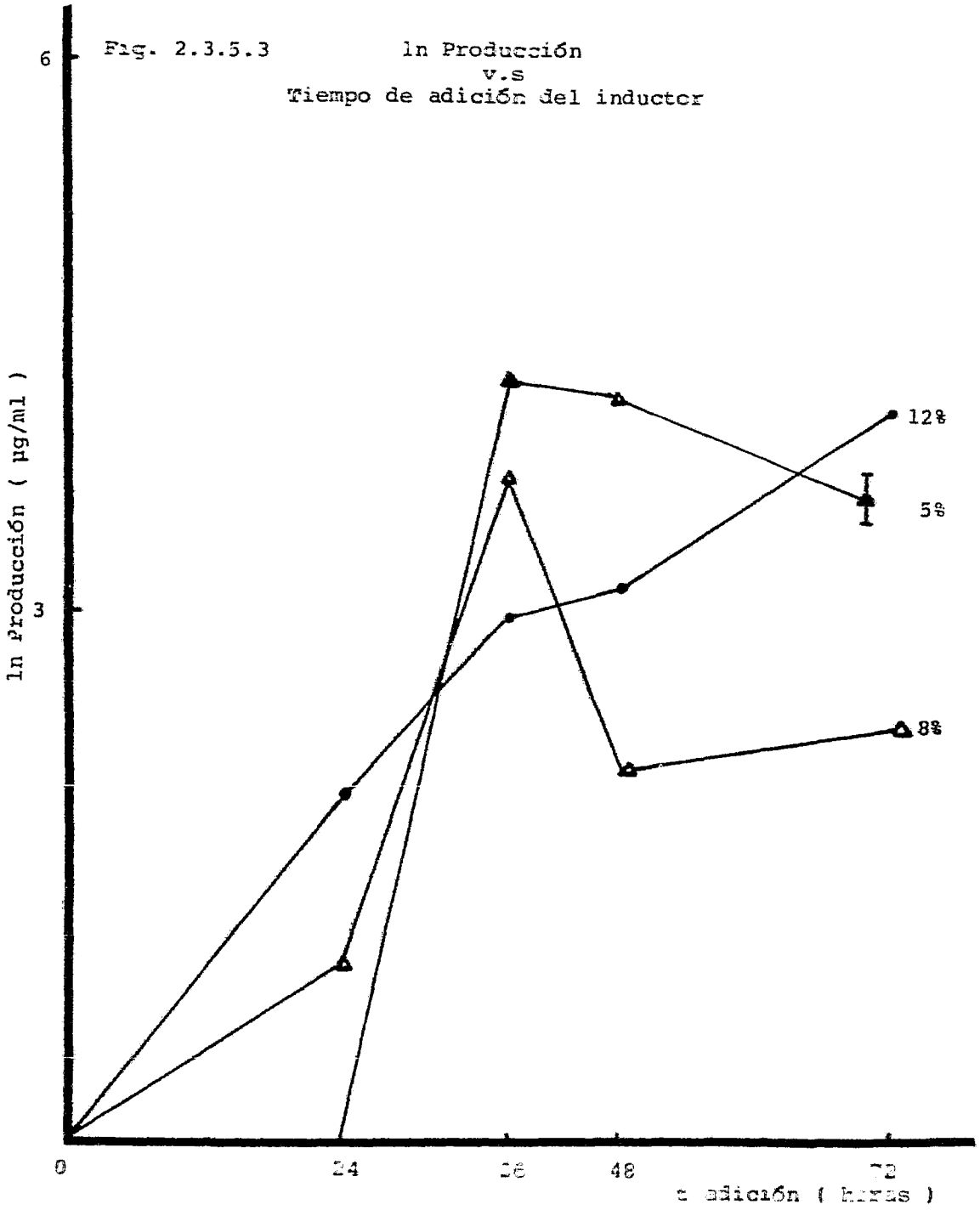
Al utilizar concentraciones de inductor superiores a un 3% la producción se retrasó con respecto a la concentración óptima además de que se obtuvo un rendimiento menor al de los testigos por lo que se considera se inhibe la biosíntesis del antibiótico.

Fig. 2.3.5.1 Tiempo de adición y concentración del inductor (n-propanol).

Testigos: 362.96 ln
247.38 5.894
5.510

| inductor (n-prop.) (%) | t (horas) | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | 0.5 | ln | 3.0 | ln | 5.0 | ln | 6.0 | ln | 8.0 | ln | 12.0 | ln |
| 0 | 36.93 | 3.609 | = | | = | | = | | = | | = | |
| 24 | 511.0 | 6.236 | = | | = | | = | | = | | = | |
| | 257.6 | 5.551 | | | | | | | 9.376 | 2.238 | 7.460 | 2.009 |
| 36 | 323.7 | 5.779 | 11.78 | 2.466 | cont. | | 36.93 | 3.609 | 46.42 | 3.837 | 26.22 | 3.266 |
| | 323.0 | 5.779 | cont. | | 82.18 | 4.408 | 32.95 | 3.494 | cont. | | 16.6 | 2.809 |
| 48 | 82.18 | 4.408 | 73.31 | 4.294 | 82.18 | 4.408 | 103.29 | 4.637 | 8.364 | 2.123 | | |
| | cont. | | 82.18 | 4.408 | 73.31 | 4.294 | 85.0 | 4.442 | = | | 115.71 | 4.751 |
| 72 | 145.81 | 4.980 | cont. | | 36.93 | 3.609 | 205.0 | 5.323 | 11.78 | 2.466 | 65.4 | 4.180 |
| | 323.7 | 5.779 | 288.72 | 5.665 | 46.42 | 3.837 | cont. | | 9.376 | 2.238 | = | |





Las muestras de medio de fermentación se conservaron durante 2 meses, en tubos de vidrio, a 4°C. Al medirse de nuevo la concentración de eritromicina, mediante el método de bioensayo, se notó una fuerte degradación (aproximadamente del 50%). Puede deberse a fenómenos de oxidación del antibiótico, por lo tanto es aconsejable medir la producción en un lapso máximo de una semana.

2.4 Variación de las fuentes de C y N para seleccionar un medio de producción adecuado.

Se probaron diferentes medios de cultivo, variando las fuentes de C y N con el fin de encontrar el de máxima producción. Se utilizaron medios reportados en la literatura o bien con aplicación industrial en la producción de antibióticos, para después probar otras fuentes de C y N.

Las condiciones de experimentación fueron las mismas que en el experimento anterior, añadiendo n-propanol a las 24 horas en un 0.5%.

Medios probados:

| | | | |
|---|----------|---|--------|
| (C) Licor de maíz P = 1.19 | 4.033 ml | (C,N) Harina de soya (desgrasada) | 3.3 g |
| (C) Lactosa | 90.00 g | (C) Sacarosa | 6.0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2.5 g | (C) Dextrosa | 3.0 g |
| (N) (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.45 g | (N) (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.24 g |
| CaCO ₃ | 1.0 g | CaCO ₃ | 7.2 g |
| H ₂ O cbp | 1000 ml | KH ₂ PO ₄ | 1.25 g |
| pH antes est. | 7.9 | H ₂ O cbp | 100 ml |
| | | pH antes est. | 8 |

| | | | |
|----------------------|--------|----------------------------------|--------|
| (C) Glucosa | 0.15 g | (C) Glucosa | 0.15 g |
| (C) Melazas | 1.5 g | (C) Melazas | 1.5 g |
| (N) Pharmamedia | 5.0 g | (N) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.3 g |
| CaCO ₃ | 0.8 g | CaCO ₃ | 0.8 g |
| NaCl | 0.25 g | NaCl | 0.25 g |
| H ₂ O cbp | 100 ml | H ₂ O cbp | 100 ml |
| pH antes est. | 7.3 | pH antes est. | 7 |

Adición de 2.3 ml de sol. 0.05M -
de sacarosa a las 96 horas.

Estos medios tuvieron una baja producción 50µg/ml.

También se adicionaron inductores metálicos que favorecen
la producción de eritromicina:

| | | |
|----------------------------------|---|---|
| A) CoCl·6H ₂ O | B) FeSO ₄ ·MgSO ₄ | 10 ppm a las 24 horas de fer <u>mentación</u> . |
| I. (C) Glucosa | (%) 0.2 | II. (C) Glucosa (%) 0.2 |
| (C) Melazas | 1.0 | (C) Melazas 1.0 |
| (N) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.6 | (N) Urea 0.1 |
| NaCl | 0.25 | NaCl 0.25 |
| CaCO ₃ | 0.8 | CaCO ₃ 0.8 |
| H ₂ O | 100 ml | H ₂ O 100 ml |
| pH antes est. | 7.9 | pH antes est. 7.6 |
| pH final A) | 8.3 | pH final A) 8.6 |
| B) | 7.8 | B) 8.1 |

| | | | | | |
|---------------------------------|-----|------|--------------------------|-----|--------|
| III. (C) Sacarosa | (%) | 0.1 | IV. (C,N) Harina de soya | (%) | 3.3 |
| (N) Urea | | 0.1 | (desgrasada) | | |
| NaCl | | 0.25 | (C) Maizena | | 3.15 |
| Amortiguador de carbonatos pH 7 | | | (C) Dextrina | | 3.04 |
| pH antes est. 7.0 | | | (N) $(NH_4)_2SO_4$ | | 0.24 |
| pH final A) 9.8 | | | $CaCO_3$ | | 0.72 |
| B) 9.7 | | | H_2O | | 100 ml |
| | | | pH antes est. | | 7.6 |
| | | | pH final A) 6.4 | | |
| | | | B) 6.2 | | |

Producción µg/ml:

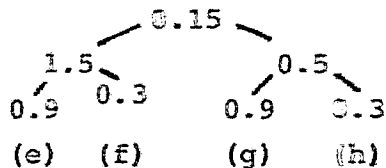
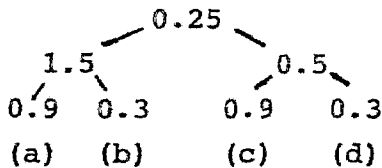
| | | | |
|------------|-----------|------------|-----------|
| I.A. 265 | II.A 86.3 | III.A 17.3 | IV.A 39.7 |
| I.B. 198.1 | II.B 55.6 | III.B 14.2 | IV.B 30 |

La mayor producción se obtuvo con el medio^a I.A. siendo de 265 µg/ml. No se puede considerar definitiva la influencia de los inductores metálicos debido a la presencia de melazas, cuya composición no es bien conocida.

Los pH variaron en límites elevados, lo que no permite una buena producción, ni estabilidad del antibiótico.

El medio n^a I.A se tomó como base para algunas variaciones, en la fuente de Carbono y Nitrógeno.

A. Glucosa +/- 0.05% B. Melazas +/- 0.5% C. $(NH_4)_2SO_4$ +/- 0.3%



El medio con mayor producción fué el (f):

Glucosa 0.15% Melazas 1.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%

| Producción ($\mu\text{g}/\text{ml}$): | Medio (f) | Medio base |
|---|-----------|------------|
| A las 96 horas de fermentación | 316 | 140.9 |
| A las 200 horas de fermentación | 410 | 160.1 |

Los resultados muestran que la producción se favoreció al disminuir la concentración de glucosa y sulfato de amonio y aumentar el contenido de melazas, obteniéndose un incremento de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con respecto al medio base.

Todo esto parece indicar que las melazas contenían al resto de los componentes del medio en cantidad suficiente, o bien proporcionaron sales inorgánicas o compuestos que favorecen la producción.

Finalmente el medio con el cual se obtuvo una mayor producción fué:

| | |
|--------------------------|---------|
| (C) Extracto de malta | 10 g |
| (N) Extracto de levadura | 4 g |
| (C) Glucosa | 10 g |
| H ₂ O cbp | 1000 ml |
| pH antes esterilizar | 7.5 |

La producción estimada fué de: 1840 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Este medio se eligió como medio standard para todos los estudios restantes en este trabajo, ya que cumple con las siguientes características:

1. Permite un buen crecimiento del micelio y producción de eritromicina.

La máxima producción a nivel industrial, utilizando cepas mutadas, fué reportada en Francia, con un valor de 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con este medio se produjo aproximadamente el 60% (sin cepa mutada) por lo que se considera un nivel aceptable.

2. Es un medio de cultivo soluble.
3. Los resultados obtenidos se pueden aplicar para la optimización del medio de cultivo a nivel de producción del antibiótico.
4. Se puede conocer de manera aproximada la composición del medio.

2.5 Cinética de crecimiento del Streptomyces erythreus en el medio de cultivo standard.

Condiciones de cultivo:

| | | | |
|---------------------|----------|------------------|-----|
| Matraces Fermbach | 3 l | Temperatura (°C) | 37 |
| Vol. de medio std. | 1 l | Agitación rpm | 200 |
| Vol. de preinóculo | 50 ml | | |
| Edad del preinóculo | 36 horas | | |

Se trabajó con 4 matraces que se muestrearon cada 4 horas siguiéndose la fermentación durante un tiempo total de 108 horas.

En el análisis de las curvas de crecimiento obtenidas, se observa que el Streptomyces erythreus presenta una curva de crecimiento diáuxica, en la que se observan fases estacionarias a las 36-60 horas y 84-92 horas. Fig. 2.5.1 ; 2.5.2 ; 2.5.3.

Aproximadamente a las 80 horas se tiene una caída en el crecimiento, posiblemente se debe a que falta un nutriente y el microorganismo debe adaptarse nuevamente al medio.

Este microorganismo presenta una $\mu=0.036 \text{ hr}^{-1}$
tiempo de duplicación $t_d=10.896 \text{ hr}$

El consumo de carbohidratos es constante, observándose un mayor consumo cerca de las 24 y 40 horas, esto coincide con la etapa de crecimiento exponencial y parte de la fase estacionaria, por lo que tal vez utilice los carbohidratos tanto como

fuerza de energía, como para la formación del anillo macrólido de manera simultánea.

Los azúcares restantes son pocos y puede deberse a que -- aún no termina la fermentación, o bien, son carbohidratos que no asimila el microorganismo. Fig. 2.5.5

Fig. 2.5.1.

CURVA DE CRECIMIENTO
Streptomyces erythreus
ln (D.O) v.s t

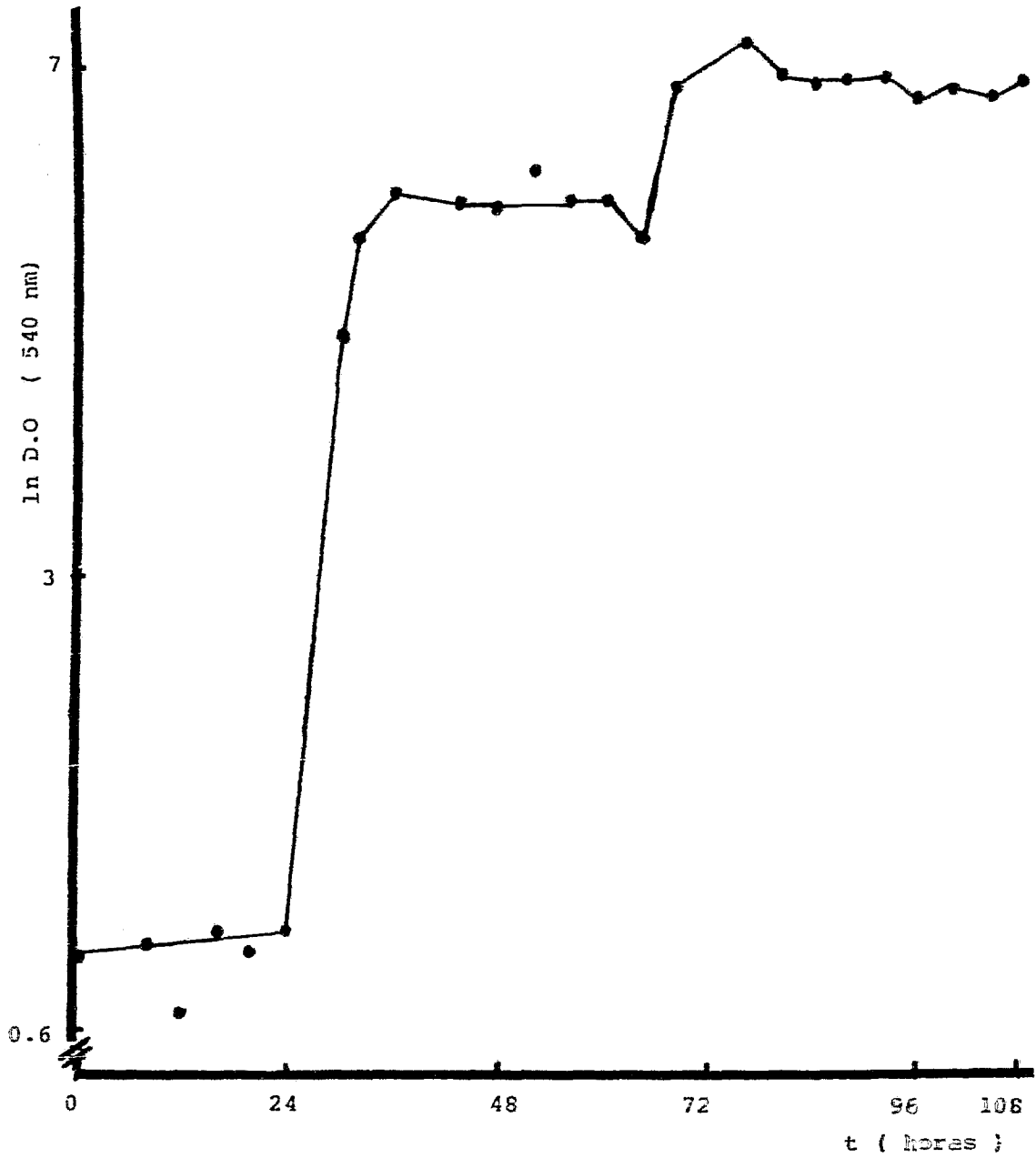


Fig. 2.5.2

CURVA DE CRECIMIENTO
Streptomyces erythreus
ln peso seco (p.s) v.s tiempo

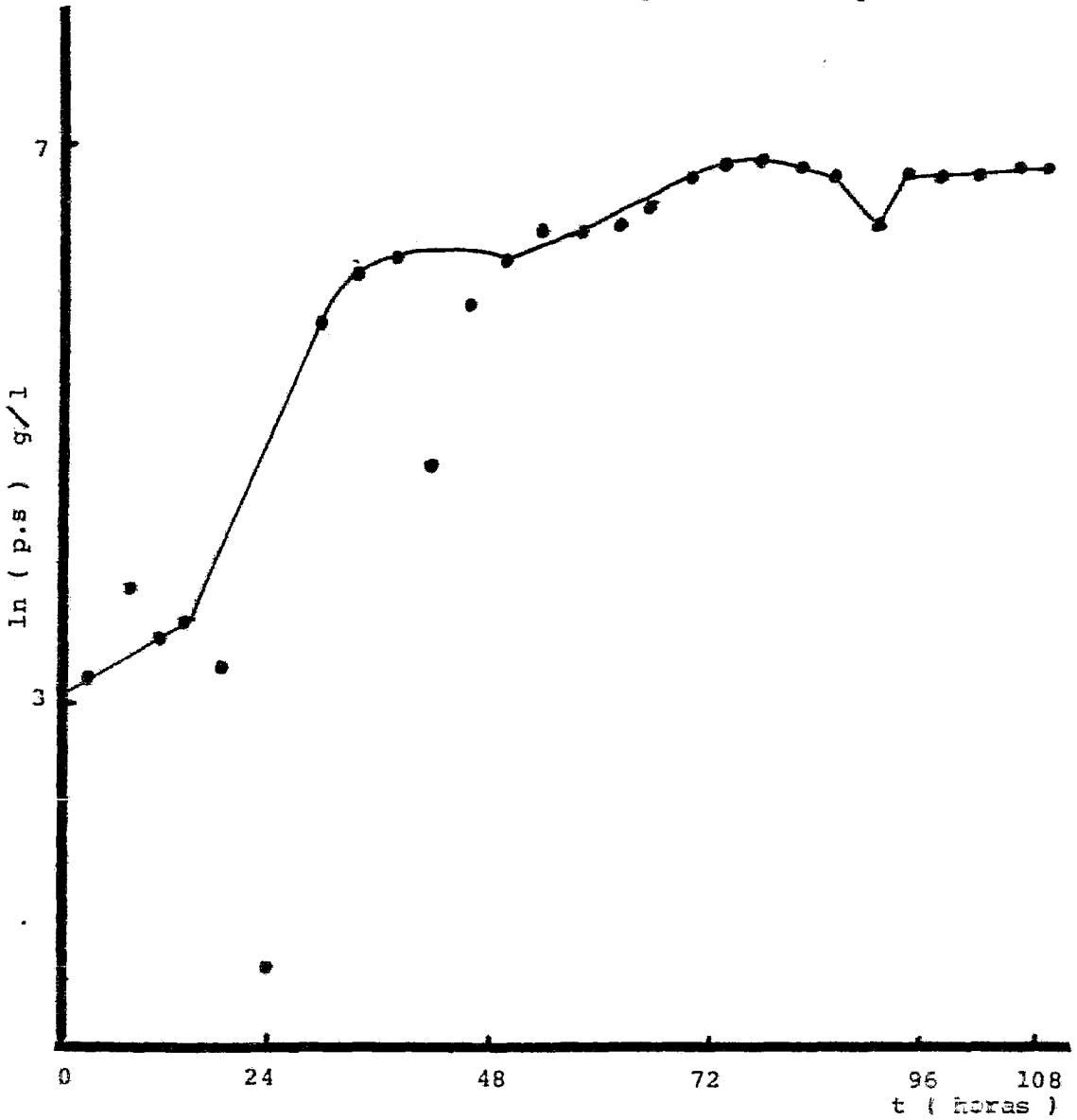


Fig. 2.5.3. CURVA DE CRECIMIENTO
Streptomyces erythreus
ln (PMV) v.s t

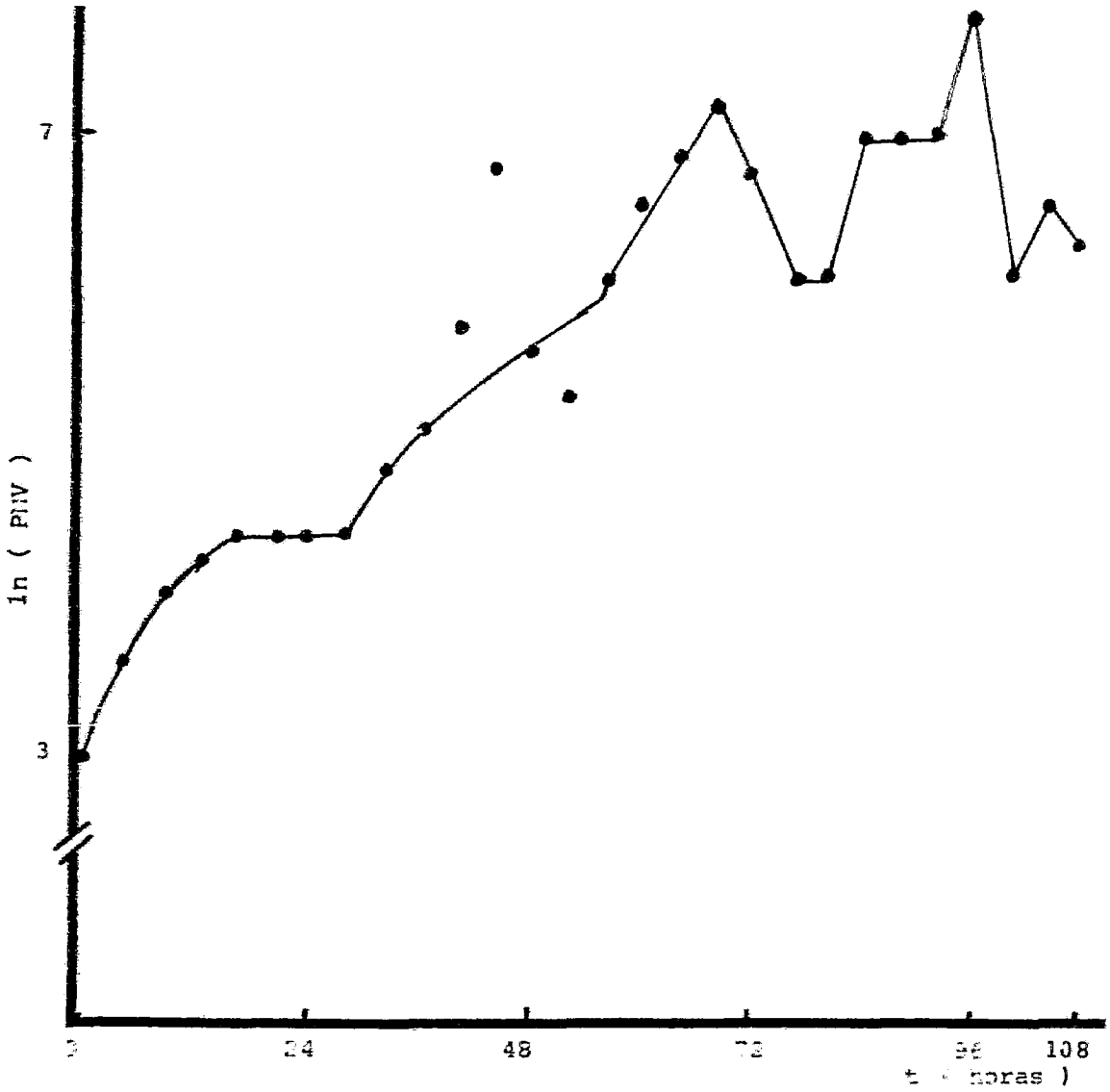


Fig. 2.5.4

CURVA DE CRECIMIENTO
Streptomyces erythreus
D.O v.s p.s

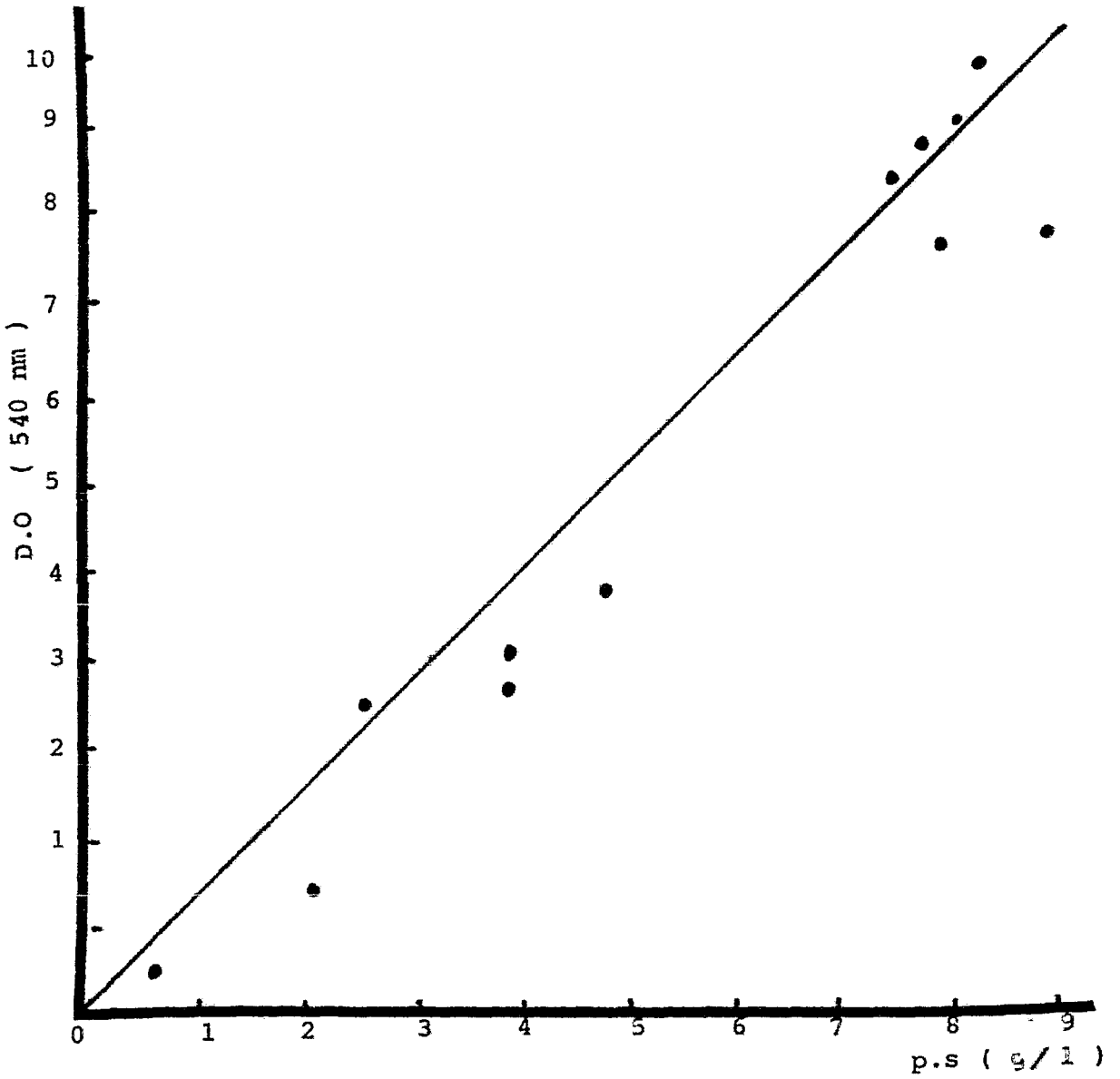
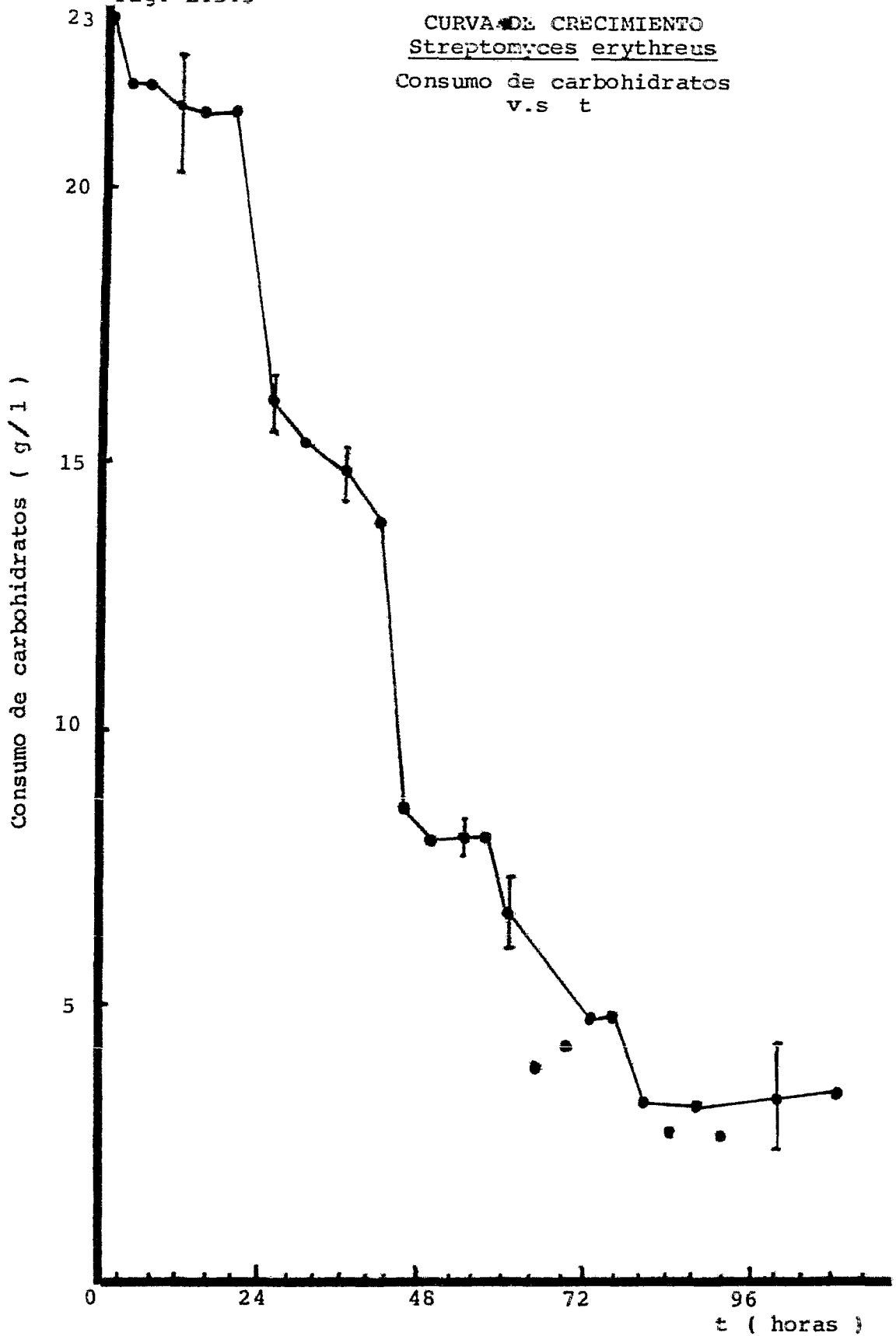


Fig. 2.5.5

CURVA DE CRECIMIENTO
Streptomyces erythreus
Consumo de carbohidratos
v.s t



2.6 Relación de la producción del antibiótico, con la producción de biomasa.

Condiciones:

Matraces Erlen Meyer de 250 ml

Vol. medio std. 50 ml

Factor de corrección de vol. 10%

Agitación 200 rpm

T (°C) 37

Edad del preinóculo 36 horas

Tiempo de fermentación 196 horas.

Mediante la gráfica, se concluye que la producción de eritromicina es proporcional al crecimiento. Fig. 2.5.6

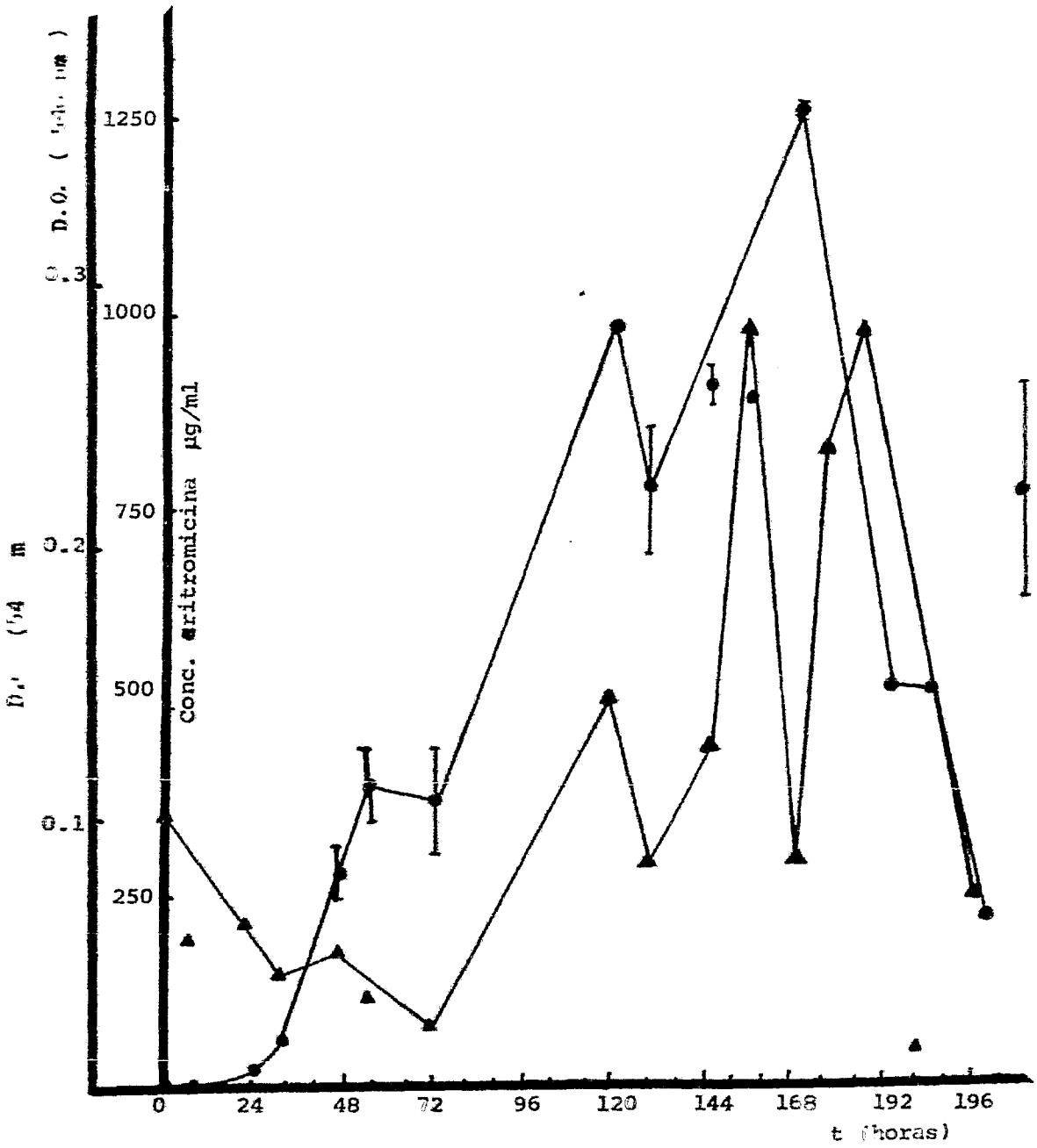
Aún antes de comenzar la fase estacionaria se tiene una ligera producción del antibiótico, observándose la mayor producción a las 120 horas (985.9 µg/ml) y 168 horas (1250.2 µg/ml)

Después de 72 horas de fermentación hay un incremento apreciable en la producción de eritromicina, lo que coincide con el aumento de pH demostrado en estudios previos.

Entre las 24 y 48 horas, comienza a aumentar la pendiente de producción del metabolito, coincidiendo con el consumo elevado de carbohidratos.

Fig. 2.3.6

PRODUCCION DE ERITROMICINA



D.O. ▲
Conc. eritromicina ●

3. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO MEDIANTE METODOS ESTADISTICOS.

3.1 Diseño del método Plackett-Burman.

El primer paso hacia una optimización definitiva del medio de producción, es determinar el grado de influencia de las principales variables presentes en el sistema. Esto se logra mediante el método estadístico Plackett-Burman.

La selección de variables se basó en reportes de la literatura y en los experimentos realizados con anterioridad. Se eligieron 6 factores, por considerarlos el número máximo de variables que presentan influencia en la producción del antibiótico: Temperatura, pH, agitación, concentración de carbono, concentración de nitrógeno y concentración del inductor (n-propanol).

Debido a que el método Plackett -Burman es un diseño factorial completo, con 2 niveles, se procedió a elaborar la matriz correspondiente de 8 experimentos, en base a que:
 $n^* \text{ de experimentos} - 1 = \text{combinación} ; (8-1=7)$ se adicionó la variable (0), conocida como Dummie, cuyo valor es 1 y solamente se utiliza para completar la matriz.

Posteriormente se establecieron los límites superior (+1) e inferior (-1) para cada variable, tomando como centro experimental al medio standard y cuidando que el número de unidades adicionadas, fuera el mismo que se restó para el límite inferior

Variables:

1. Temperatura: (-)35°C std 37°C (+)39°C +/-2

Se observaron los casos extremos, tanto para crecimiento - del microorganismo, como para la producción del antibiótico. Se ha demostrado que para que se produzca el metabolito secundario, las condiciones de crecimiento no son las óptimas, por lo tanto, se tiene crecimiento a 35°C (-2 unidades).

Para el límite superior se aumentaron 2 unidades (39°C), a esta temperatura aún crece el microorganismo.

Se consideró que si la producción de eritromicina es proporcional a la concentración de biomasa, es de esperarse que si el microorganismo crece, se tendrá producción.

También se tomó en cuenta que a altas temperaturas, puede presentarse fragmentación del micelio, baja transferencia de oxígeno (disminuye su solubilidad en el medio), decrece la viscosidad del medio.

El rango de variación no fué menor, debido a que es difícil variar solo 1°C, en las agitadoras donde se trabajó.

2, Agitación: (-)100 rpm std.200 rpm (+)300 rpm +/-100

En el caso de que se tenga un número muy bajo de revoluciones, la agitación puede tener un efecto mínimo, por el contrario, si es muy elevado puede romperse el micelio.

3. pH: (-)6.5 std.7.5 (+)8.5 +/-1 Antes de esterilizar

La producción de eritromicina se presenta en un rango de pH de 6-8. La eritromicina es lábil a medios ácidos (5.5) y en medios muy alcalinos no hay producción.

Considerando que el pH del medio std. baja ligeramente -- con la esterilización y que durante la fermentación se tienen variaciones de 1 a 2 unidades de pH, de nuevo se consideraron los casos extremos.

4. Concentración
de C (-)2 g/l std.4 g/l (+)6 g/l +/-2

Fuentes de C presentes en el medio: Glucosa y extracto de malta.

El Streptomyces erythreus necesita un fuerte aporte de C para sintetizar el antibiótico y para su crecimiento.

Solamente se varió la concentración de glucosa, ya que si se varían simultáneamente 2 fuentes de C, no se sabrá con -- certeza de cual de las 2 proviene el mayor efecto. Se eligió a la glucosa debido a que se encuentra en una forma más pura y se sabe exactamente cuanta se tiene. La concentración del extracto de malta quedó constante, pero se tomó en cuenta el porcentaje de glucosa libre que contiene (Solomons, 1969).

La glucosa es necesaria para la formación del macrólido, - sin embargo se debe recordar la posible presencia de una re- presión catabólica por glucosa, a nivel de AMP_c. Se ha lle- gado a observar inhibición del crecimiento con concentra- ciones superiores a 5% (Rivière, J., 1975). Dicha concentra- ción se eligió como nivel máximo. Para calcular la concen- tración de glucosa, se tomó en cuenta la glucosa pura y la - glucosa libre presente en el extracto de malta, suponiendo - que al aparecer nueva dextrosa proveniente de dextrinas, ya no estaría en límites superiores al máximo, si se considera que la glucosa inicial ha sido utilizada.

5. Concentración de N:

| | | | |
|-----------------------|----------------|---------------|---------|
| (-) 0.1 g N/l | std. 0.28g N/l | (+) 0.46g N/l | +/-0.18 |
| Extracto de levadura: | | | |
| (-) 1.42 g/l | std. 4.0 g/l | (+) 6.57g/l | +/-2.57 |

El N puede ejercer una regulación metabólica, si se en -- cuenta en concentraciones superiores a 0.5g N/l. Probable_{mente} actúa sobre los intermediarios del metabolismo primario y secundario (a nivel enzimático), desviando hacia el meta_{bolismo} primario, de esta manera el nitrógeno no se utilizaría para la producción del antibiótico, sino para el crecimiento del microorganismo.

Se consideró el N total presente en el extracto de levadu_{ra} (Solomons, 1969) para no exceder el límite máximo y así

fijar el nivel superior.

6. Concentración de inductor (n-propanol).

(-) 0.2% std. 0.5% (+) 0.8% +/- 0.3%

El inductor permite obtener una mayor producción de eritromicina, en este caso favorece la formación de propionato, el cual es un precursor del antibiótico.

Se sabía, que en caso de exceder una concentración límite ya no actuaría como inductor, sino que por el contrario inhibiría la biosíntesis de eritromicina. Si se trata del caso opuesto, con una concentración de inductor muy baja, éste no ejercerá efecto alguno en la producción del metabolito deseado.

La mínima concentración que se había probado fué de 0.5% por lo que se tomó como referencia.

En caso de no saber que parámetros utilizar para fijar -- los límites superior e inferior, se pueden tomar como base de cálculo las necesidades mínimas de la célula, con respecto a ciertos nutrientes, en base a su composición.

Para poder realizar la parte experimental del método Plackett-Burman, se siguieron las condiciones siguientes:

Matraces Erlen Meyer de 250 ml

Vol. medio 50 ml

Edad del preinóculo 36 horas

Vol. de preinóculo 2.5 ml

Adición del inductor a las 24 horas

Factor de corrección por evaporación 10%

El medio std. se utilizó como centro experimental.

PLACKETT-BURMAN

| Exp. No. | VARIABLE | | | | | | (0) |
|----------|----------|---|---|---|---|---|-----|
| | A | B | C | D | E | F | |
| 1 | + | + | + | - | + | - | - |
| 2 | - | + | + | + | - | + | - |
| 3 | - | - | + | + | + | - | + |
| 4 | - | - | - | + | + | + | - |
| 5 | + | - | - | - | + | + | + |
| 6 | + | + | - | - | - | + | + |
| 7 | + | + | + | - | - | - | + |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - |

| Variable | Unidad | Centro exp. | Nivel (-1) | Nivel (+1) | Unidad exp. |
|-------------------------------------|--------|-------------|------------|------------|-------------|
| A: Glucosa (fuente c) | g/l | 4.0 | 2.0 | 6.0 | 2.0 |
| B: E. Levadura (fuente N) | g/l | 4.0 | 1.42 | 6.37 | 2.57 |
| C: Temperatura | °C | 37 | 35 | 39 | 2.0 |
| D: Agitación | rpm | 200 | 100 | 300 | 100 |
| E: Conc. inductor (n-propanol) | % | 0.5 | 0.2 | 0.8 | 0.3 |
| F: pH antes esterilizar | | 7.5 | 6.5 | 8.5 | 1.5 |

Resultados del Plackett-Burman.

| Exp. No. | D.O. | peso seco (mg/ml) | Producción (µg/ml) | Producción esp. (µg/gr×10 ³) |
|----------|--------|----------------------|-----------------------|---|
| 1 | 2.7 | 2.216 | 83.7 | 37.770 |
| 2 | 10.221 | 7.89 | 10.1 | 1.280 |
| 3 | 0.69 | 0.521 | 2.0 | 3.846 |
| 4 | 0.525 | 0.45 | 0 | 0 |
| 5 | 1.35 | 1.133 | 125.0 | 110.326 |
| 6 | 3.55 | 2.8 | 731.93 | 261.400 |
| 7 | 1.75 | 1.369 | 84.0 | 61.358 |
| 8 | 1.63 | 1.304 | 145.2 | 111.349 |

Análisis de resultados del Plackett-Burman.

| Variable | Efecto (10 ³) | t |
|----------|---------------------------|-------|
| A | 88.594 | 1.236 |
| B | 34.071 | 0.475 |
| C | -94.705 | 1.322 |
| D | -54.010 | 0.753 |
| E | -70.860 | 0.989 |
| F | 39.670 | 0.553 |
| O | 71.632 | |

$$V_{\text{eff}} 5.131 \times 10^9 \quad S_{\text{eff}} 71.632 \times 10^3$$

Tabla. 3.1.1 Plackett-Burman. Producción específica obtenida ($\mu\text{g/g} \times 10^3$)

| Exp. | A | B | C | D | E | F | (O) |
|------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | + 37.770 | + 37.770 | + 37.770 | - 37.770 | + 37.770 | - 37.770 | + 37.770 |
| 2 | - 1.280 | + 1.280 | + 1.280 | - 1.280 | - 1.280 | + 1.280 | - 1.280 |
| 3 | - 3.846 | - 3.846 | + 3.846 | + 3.846 | + 3.846 | - 3.846 | + 3.846 |
| 4 | - 0.000 | - 0.000 | - 0.000 | + 0.000 | + 0.000 | + 0.000 | - 0.000 |
| 5 | +110.326 | -110.326 | -110.326 | +110.326 | +110.326 | +110.326 | +110.326 |
| 6 | +261.400 | +261.400 | -261.400 | -261.400 | -261.400 | +261.400 | +261.400 |
| 7 | + 61.358 | + 61.358 | + 61.358 | - 61.358 | - 61.358 | - 61.358 | + 61.358 |
| 8 | -111.349 | -111.349 | -111.349 | -111.349 | -111.349 | -111.349 | -111.349 |

Se procedió a analizar los resultados de producción específica obtenidos. Tabla.3.1.1 (Fabila, C.G., 1980).

1. Se define como efecto a la influencia de cada factor en la respuesta, al pasar de su nivel bajo (-1) al nivel alto (+1) y se representa como el promedio de los efectos de un factor, cuando los demás factores permanecen constantes.

$$\text{Efecto} = \frac{\text{Respuesta (+)}}{n^2 \text{ variables (+)}} - \frac{\text{Respuesta (-)}}{n^2 \text{ variables (-)}}$$

Ej: para la variable A.

$$\text{Efecto}_A = \frac{37.77+110.326+261.4+61.358}{4} - \frac{1.28+3.846+0+111.349}{4}$$

$$\text{Efecto}_A = 88.594 \times 10^3$$

2. Variancia del efecto (V_{eff})

Indica el grado de dispersión del efecto, con respecto al promedio.

$$V_{\text{eff}} = \frac{(\text{Efecto dummy})}{n^2 \text{ de dummies}} \quad \text{ej: } V_{\text{eff}} = \frac{71.632 \times 10^3}{1}$$

3. Error standard del efecto ($S. E_{\text{eff}}$).

$$S. E_{\text{eff}} = \sqrt{V_{\text{eff}}} \quad \text{ej: } S. E_{\text{eff}} = 5.131 \times 10^9$$

4. t Student's (t_s)

Es la probabilidad de ocurrencia del efecto, con respecto a una distribución normal.

$$t_s = \frac{\text{Efecto}}{S. E_{\text{eff}}} \quad \text{ej: } t_{sA} = \frac{88.594 \times 10^3}{71.632 \times 10^3}$$

Considerando los valores absolutos de los efectos, se concluye que la mayor influencia la presentan:

- 1ª Temperatura 2ª Concentración de C por glucosa

3.º Concentración de inductor (n-propanol).

El medio con mayor producción fué el n.º 6, por lo que se empleó para la optimización.

3.2 Diseño del método Box-Wilson

Después de determinar los factores que influyen de manera más significativa en la producción del antibiótico, el siguiente paso a seguir fué encontrar las condiciones óptimas del medio.

Para llevar a cabo la optimización del medio de cultivo se utilizó el experimento factorial Box-Wilson.

Un experimento factorial completo es aquel conjunto de observaciones que comprende todas las combinaciones posibles de los niveles de las variables o factores.

Con fines prácticos el mayor número de parámetros que -- pueden variarse es de 4 ó 5, cada uno con 2 niveles. De esta manera si en nuestro sistema encontramos 3 factores, tendremos $2^3=8$ experimentos, todos ellos con condiciones diferentes entre sí.

En base a los resultados obtenidos en el diseño Plackett-Burman, el experimento que registró una mayor producción fué el n.º 6 por lo que se le tomó como centro experimental para el diseño Box-Wilson, con el fin de optimizar las condiciones de producción del antibiótico.

MEDIO No. 6

| | | |
|---------------------------|------|-------|
| Glucosa | 6 | g / l |
| Extracto de levadura | 6.57 | g / l |
| Extracto de malta | 10 | g / l |
| H ₂ O cbp | 1000 | ml |
| pH antes de esterilizar | 8.5 | |

T (°C) 35
Agitación rpm 100
Conc. inductor (n-propanol) (%) 0.2
adición a las 24 horas
Corrección de volumen 10%
Matraces Erlen Meyer de 250 ml
Edad del preinóculo 36 horas
Vol. preinóculo 2.5 ml

Matriz planteada para el método Box-Wilson:

| Interacción de variables | No. experimento | A | B | C |
|--------------------------|-----------------|---|---|---|
| (1) | 1 | - | - | - |
| A | 2 | + | - | - |
| B | 3 | - | + | - |
| AB | 4 | + | + | - |
| C | 5 | - | - | + |
| AC | 6 | + | - | + |
| BC | 7 | - | + | + |
| ABC | 8 | + | + | + |

A: Temperatura

B: Conc. de glucosa

C: Conc. inductor (n-propanol).

La unidad de variación para las variables fué la misma que se utilizó en el diseño Plackett-Burman, excepto para la concentración de inductor, en la cual se empleó un rango más pequeño debido a lo reducido que resultaban los niveles inferiores. El diseño se planteó de la forma siguiente:

| Variable | Temperatura | Glucosa | Inductor n-propanol |
|---------------------|-------------|---------|------------------------|
| Unidades | °C | g/l | % |
| Centro experimental | 35 | 6 | 0.2 |
| Unidad experimental | 2 | 2 | 0.15 |
| Nivel (+1) | 37 | 8 | 0.35 |
| Nivel (-1) | 33 | 4 | 0.05 |

El resto de los parámetros permaneció constante.

Después de 96hr tiempo total de fermentación, los resultados obtenidos fueron:

| Inter-acción | pH _f | D.O | peso seco (mg/ml) | Producción (µg/ml) | Prod. esp. (mg/g cél.) |
|--------------|-----------------|------|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| (1) | 8.3 | 6.37 | 4.892 | 246.000 | 50.286 |
| A | 8.5 | 2.70 | 2.216 | 85.360 | 38.519 |
| B | 8.1 | 6.35 | 4.892 | 188.625 | 38.557 |
| AB | 7.4 | 4.59 | 3.587 | 151.005 | 42.086 |
| C | 8.3 | 7.63 | 5.903 | 432.513 | 73.270 |
| AC | 8.4 | 1.72 | 1.402 | 68.169 | 48.602 |
| BC | 8.1 | 6.67 | 5.153 | 166.045 | 32.222 |
| ABC | 7.6 | 5.30 | 4.175 | 83.480 | 19.995 |

Para calcular los efectos e interacciones, se utilizó el Algoritmo de Yates, el cual se recomienda seguir debido a que permite manejar un mayor número de factores y comprobar paso a paso los cálculos hechos. (Fabila, C.G., 1980).

Partiendo de que se conocen los tratamientos y sus respuestas, se elabora una tabla de la manera siguiente: En la primera columna se colocan los tratamientos seguidos, en la segunda columna se colocan las respuestas (en este caso la producción específica), para la elaboración de las demás columnas primero se

suman los renglones de respuestas, por pares (ej: (1) + a ; - b + ab ...) después, nuevamente por pares, al segundo renglón se le resta el renglón anterior (ej: a - (1) ; ab - b ...) - se continúa con el mismo procedimiento, hasta que el resultado obtenido de la suma de los 2 primeros renglones, sea igual a la suma de la columna de respuestas (2ª columna).

Para comprobar estos cálculos, se suman los cuadrados de los renglones de cada columna y deberá observarse que el resultado obtenido en la 3ª columna es igual al doble de la suma de los cuadrados de la 2ª columna y que el resultado obtenido en la 4ª columna es igual al cuádruplo de la suma de los cuadrados de la 2ª columna ; la siguiente será ocho veces dicha suma y así sucesivamente.

Para calcular los efectos individuales, se dividirá la primera línea del efecto total (última columna calculada) entre el número de experimentos o tratamientos. El divisor de las siguientes líneas del efecto total es un medio del número de experimentos. Los cocientes obtenidos son los efectos individuales.

El signo de los efectos individuales se calcula multiplicando el signo del nivel de las variables, por el signo del efecto total correspondiente, ej: Para la variable A los signos de los niveles son: -, +, -, +, -, +, -, + = + suponiendo que - su efecto total tuviera signo (-) el efecto individual sería negativo. Si se tienen interacciones de las variables, entonces primero se multiplican por el signo del efecto total.

Una vez calculados los efectos individuales, se dividen entre 2 cada uno de ellos y a los nuevos valores se les llama coeficientes de regresión, siendo éstos los coeficientes de las variables de la ecuación codificada.

ALGORITMO DE YATES

| | | | | | | Efecto | |
|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----|------------|--|
| I | II | III | IV | V | Div | Individual | |
| (1) | 50.286 | 88.805 | 169.448 | 343.537 | 8 | 42.942 | |
| A | 38.519 | 80.643 | 174.089 | - 45.126 | 4 | -11.281 | |
| B | 38.557 | 121.872 | - 8.231 | - 77.817 | 4 | .-19.454 | |
| AB | 42.086 | 52.217 | - 36.895 | 27.727 | 4 | 6.934 | |
| C | 73.270 | - 11.767 | - 8.162 | 4.641 | 4 | 1.160 | |
| AC | 48.602 | 3.529 | - 69.655 | - 28.664 | 4 | - 7.166 | |
| BC | 32.222 | - 24.668 | 15.296 | - 61.493 | 4 | -15.373 | |
| ABC | 19.995 | - 12.227 | 12.441 | - 2.855 | 4 | - 0.713 | |
| S | 343.537 | | | | | | |
| SCC | 16438.973 | 32877.946 | 65755.779 | 131511.56 | | | |

De esta manera se llegó a la ecuación codificada:

$$Y=42.942-5.64A-9.727B+3.467AB+0.58C-3.583AC-7.686BC-0.356ABC$$

Esta ecuación se obtuvo con los niveles de variación (+1) y (-1), es decir, con valores codificados.

Para obtener valores más objetivos, la ecuación deberá transformarse a unidades reales, mediante la siguiente ecuación de corrección:

$$\text{Unidad de variación} = \frac{\text{Variable real} - \text{Centro experimental}}{\text{Unidad experimental}}$$

De aquí se conocen los valores del centro experimental y de la unidad experimental de cada variable, de manera que al sustituirlos en la ecuación codificada, se obtuvo la ecuación real
Ej: Para la variable A.

$$x_A = \frac{X_A - 35}{2} \quad \text{se sustituye como:} \quad -5.64 \left(\frac{X_A - 35}{2} \right)$$

Ecuación real:

$$\hat{Y} = 262.641 - 6.345X_A - 34.229X_B + 451.002X_C + 0.984X_A X_B - 8.383X_A X_C - 4.854X_B X_C - 0.593X_A X_B X_C$$

A continuación se verificaron los resultados de la ecuación, sustituyendo en ella los valores reales. Los resultados experimentales (Y) deberán ser iguales o muy cercanos a los obtenidos en la ecuación \hat{Y} .

Los valores que se sustituyen, son los indicados por los niveles en la matriz inicial, ej: Para A : Se tiene +, -, + los valores que se sustituirán en la ecuación: X_A 37 ; X_B 4 ; X_C 0.05

Si después se resta al valor \hat{Y} obtenido con la ecuación, el valor Y experimental, se obtienen los residuos, los cuales indican que tanto se aleja o acerca el modelo, a la realidad.

| | Y | \hat{Y} | residuos |
|-----|--------|-----------|----------|
| (1) | 50.286 | 50.064 | -0.222 |
| A | 38.519 | 38.276 | -0.243 |
| B | 38.557 | 38.182 | -0.375 |
| AB | 42.086 | 41.758 | -0.327 |
| C | 73.270 | 73.064 | -0.206 |
| AC | 48.602 | 48.371 | -0.231 |
| BC | 32.222 | 31.843 | -0.379 |
| ABC | 19.995 | 19.574 | -0.421 |

De los resultados obtenidos se concluye:

1. La mayor influencia favorable a la producción, la presenta la concentración de inductor (n-propanol) cuando no se encuentra interactuando en nivel alto, con ninguna de las otras variables.
2. Los residuos obtenidos son muy cercanos a cero, lo que corrobora, que el modelo obtenido es válido y muy cercano a la realidad.
3. Las variables consideradas, así como sus rangos, fueron los adecuados.

4. Debido al bajo valor de los residuos, no es necesaria ninguna modificación a los factores.
5. Al interactuar las 3 variables, la producción es mayor si se encuentran en su nivel bajo.
6. Se demuestra la rapidez y eficiencia del método.

Los resultados revelan que el medio No.5, con concentración elevada de inductor, es el medio óptimo para la producción de eritromicina.

| | | |
|-------------------------------|-------|-----|
| Glucosa | 4 | g/l |
| Extracto de levadura | 6.37 | g/l |
| Extracto de malta | 10 | g/l |
| H ₂ O | 1000 | ml |
| pH antes de est. | 8.5 | |
| T (°C) | 33 | |
| Agitación rpm | 100 | |
| Conc. inductor (n-propanol) | 0.35% | |
| Corrección de volumen | 10 | % |
| Vol. medio | 50 | ml |
| Matraces Erlen Meyer | 250 | ml |

La producción del antibiótico, en relación a las interacciones entre las diferentes variables utilizadas es:

C > (1) > AC > AB > A y B > BC > ABC

Lo que presenta apreciable interés para el análisis de los resultados, en la optimización del medio de cultivo.

- a) Conc. de glucosa (C).- La concentración óptima de glucosa fué de 4 g/l correspondiente al nivel (-1) esto indica que en una concentración superior, podría resultar desfavorable para la producción del antibiótico. Se puede objetar que es

una cantidad igual a la que se utilizó en el medio standard - al iniciar el método Plackett-Burman y menor a la del centro experimental en el Box-Wilson ; por ello es necesario recordar que las condiciones fisicoquímicas en el primer caso fueron totalmente diferentes y en el segundo caso se variaron la temperatura y la concentración de inductor.

Se observó que la producción aumenta cuando tanto la concentración de glucosa, como la temperatura, están en sus niveles bajos. Considerando que el crecimiento es función principalmente de la temperatura y que el medio optimizado tuvo una mejor producción que el medio base, se puede concluir que para este medio una concentración superior a 4 g/l ejerce un efecto desfavorable sobre la síntesis de eritromicina.

b) Conc. de extracto de levadura (N).- La concentración de 6.37 g/l es la óptima para la producción del antibiótico. -- Con los datos obtenidos con el método Plackett-Burman, se observa que a mayor concentración de nitrógeno, la producción - de biomasa aumenta, pero también es mayor el rendimiento del metabolito en estudio. Esto puede derivarse de que ambas producciones se relacionan directamente.

Si la concentración de nitrógeno es muy baja, tal vez no satisface las necesidades básicas del microorganismo, por lo que éste no se multiplica, redundando en una baja producción de eritromicina.

Por lo tanto, a esta concentración se favorece la síntesis y no se puede considerar que existe una desviación total hacia el metabolismo primario.

El extracto de levadura, proporciona además vitaminas y aminoácidos que intervienen en la biosíntesis del eritronólido. Ej: Metionina.

c) pH.- El nivel de pH óptimo fué de 8.5 antes de est.(+1)

En cierto modo se esperaba este resultado, ya que al esterilizar, el pH de este medio disminuye aproximadamente hasta 7 teniéndose después las variaciones habituales de la fermentación de eritromicina. La producción máxima se obtuvo con un pH de 7.5-8 a 33°C. Al tener pH iniciales, menores, la estabilidad del antibiótico disminuye, así como pueden resultar afectados los componentes del medio.

La producción aumentó al incrementarse el pH, aproximadamente después de 48 horas de fermentación.

En este tipo de fermentación, se tiene la desventaja de no poder controlar el pH, por lo que no puede darse una respuesta contundente en cuanto a su influencia favorable sobre la producción.

- d) Temperatura.- El nivel óptimo de temperatura fue 33°C -- (-1). Inicialmente, en el método Plackett-Burman, se observó que es la variable con mayor influencia sobre la biosíntesis de eritromicina.

Se comprobó que a menor temperatura, se favorecen las producciones, tanto del antibiótico, como de biomasa, teniendo ésta última rangos semejantes en todos los experimentos.

Esto indica que es una temperatura que favorece el crecimiento del microorganismo, aunque no es la temperatura óptima de crecimiento, además al disminuir el valor de esta variable, se induce al microorganismo a una mayor producción del metabolito secundario deseado. Fig. 3.2.2 ; 3.2.3

El efecto es aún más favorable con concentración elevada de inductor (0.35%) y concentración baja de glucosa (4 g/l) tal vez se debe a que a esta temperatura el microorganismo utiliza al inductor para sintetizar el antibiótico y no tanto para la síntesis de ácidos grasos y crecimiento.

Fig. 3.2.3 Producción de eritromicina v.s. t
T: 37°C ; pH antes est. 8.5 ; Agitación 100 rpm

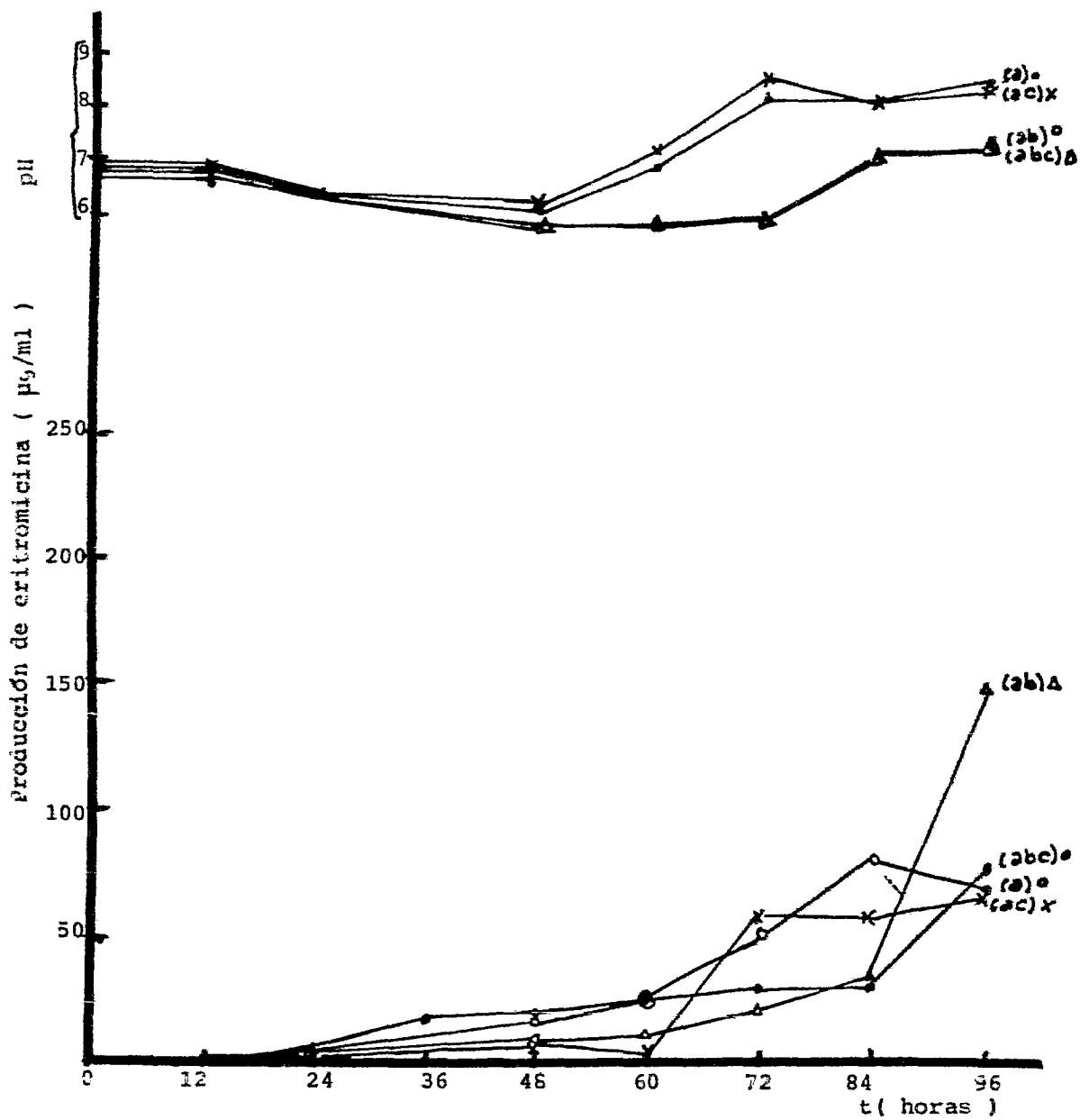
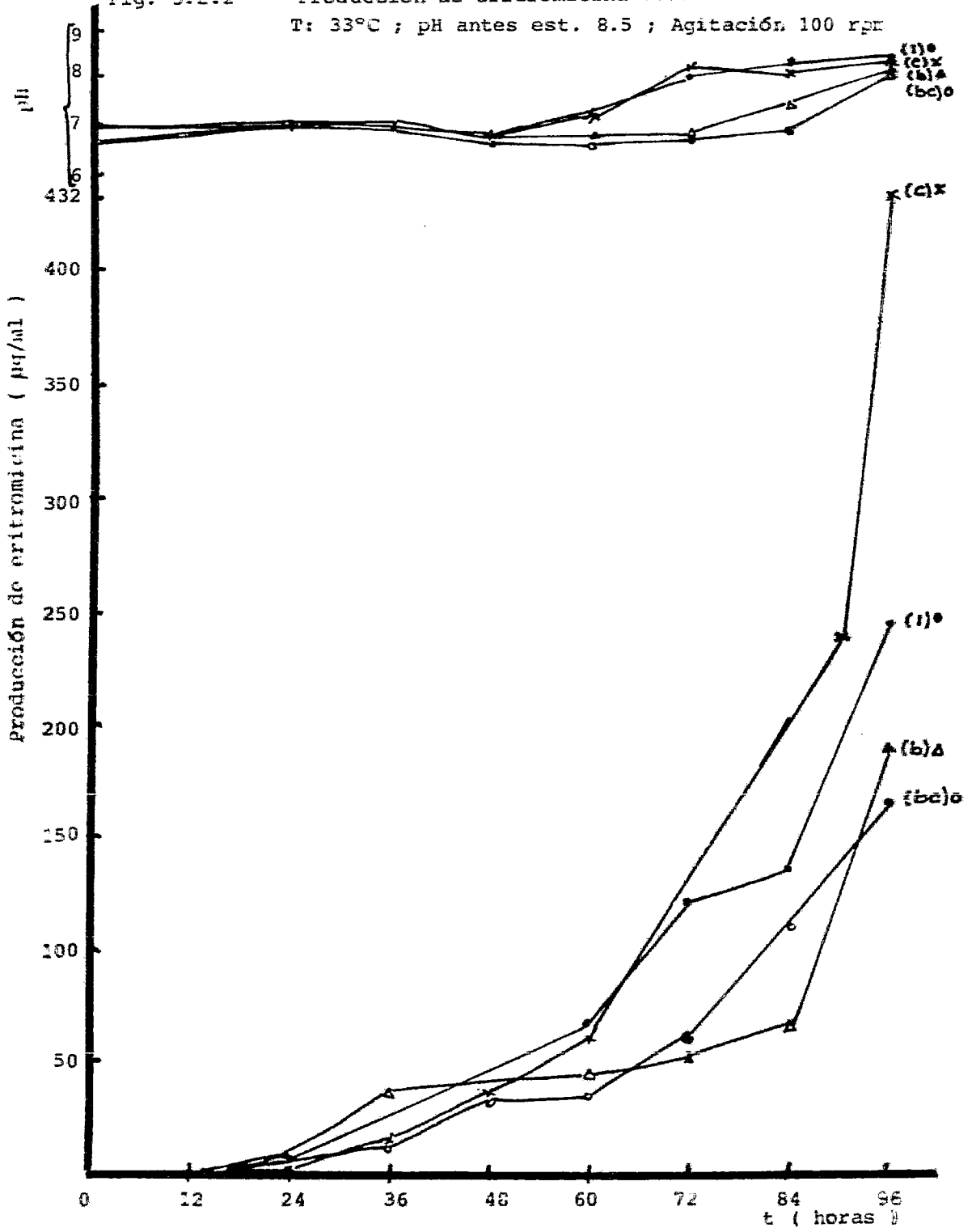


Fig. 3.2.2 Producción de eritromicina v.s. t

T: 33°C ; pH antes est. 8.5 ; Agitación: 100 rpm



e) Agitación.- La agitación óptima fué de 100 rpm. (-1). - Tanto el crecimiento celular como la producción de antibiótico, sufrieron un incremento notable al utilizar bajas revoluciones. Puede deberse a que con una agitación más rápida, - se induce una fragmentación parcial del micelio.

En el caso de la formación de esférulas de gran tamaño, - resulta imposible romperlas, aún cuando se aumente la agitación.

f) Concentración de inductor (n-propanol).- Nivel óptimo 0.35% (+1). Se demostró la necesidad de un inductor que favorezca la síntesis del metabolito.

Con el método Box-Wilson, se demostró que ejerce una gran influencia cuando se encuentra en concentración superior -- (0.35%) y el resto de los factores en nivel bajo, aunque no hay interacción con ellos.

Se observó que a concentraciones muy bajas (menor a 0.2%) su efecto es prácticamente indetectable y a concentraciones elevadas (mayores a 0.5%) ejerce un efecto de inhibición - sobre la producción del antibiótico.

También se notó que el efecto menos favorable a la producción fué cuando se tuvieron todos los factores en su nivel alto.

La producción con el medio optimizado resultó enormemente menor, con respecto a la obtenida en el Plackett-Burman, ésto se atribuye a la edad de la cepa, ya que a pesar de que la suspensión de esporas se almacenó a 4°C, el micelio puede crecer favoreciéndose la formación de esférulas de dimensiones tales, que no permiten la entrada de sustrato a la célula, además de que el producto sintetizado en el centro de la esférula no logra salir totalmente al exterior.

Esto se basa en que el experimento testigo dió una producción de 64 µg/ml que es aproximadamente 5 veces menor a la ob-

tenida con el medio optimizado.

Es recomendable partir de un nuevo cultivo, inclinado cada mes, para obtener resultados reproducibles y así evitar que pasen desapercibidos factores determinantes, tales como la variabilidad de la cepa.

4. CONCLUSIONES.

- 1) El Streptomyces erythreus es un microorganismo que presenta una curva de crecimiento diáuxica para el medio probado, - con fases estacionarias detectadas a las 36-60 y 84-92 horas.
- 2) El crecimiento presenta un $\mu=0.036 \text{ hr}^{-1}$ y $t_d=10.896 \text{ nr.}$
- 3) La producción de eritromicina es proporcional al crecimiento, teniéndose un máximo de producción a las 120 y 168 horas de fermentación.
- 4) Es necesaria la presencia de inductor (n-propanol) para favorecer la producción del antibiótico y deberá añadirse en bajas concentraciones.
- 5) Las variables que más influyen en la producción del metabolito son: concentración de inductor, concentración de carbono por glucosa y la temperatura (cuando se trabaje en las -- mismas condiciones que se probaron).
- 6) La ecuación de regresión real, a la cual se llegó es válida y muy cercana al modelo real.
- 7) Es aconsejable la utilización de métodos estadísticos para la optimización de las condiciones de cultivo en fermentaciones, ya que simplifican el trabajo y representan un notable -- ahorro de tiempo y costos en la investigación.
- 8) A pesar de la variabilidad biológica presentada por el microorganismo, pudieron observarse resultados congruentes.
- 9) El medio optimizado no es económicamente aceptable, debido a su elevado costo, sin embargo es un buen índice para conocer el comportamiento del microorganismo y demostrar las ventajas que ofrecen los métodos estadísticos.

10) La secuencia que se propone para formular, desarrollar y - optimizar un medio de cultivo es:

- a) Revisión bibliográfica sobre las características del producto, rutas metabólicas más aceptadas para su producción, - características del microorganismo.
- b) Selección de las técnicas de medición.
- c) Establecer que parámetros fisicoquímicos influyen en la - producción del metabolito deseado: pH , temperatura, agita- ción, evaporación, edad del cultivo, volumen del inóculo, vo lumen del medio, concentración de inductores, tiempo para la adición del inductor.
- d) Variar diversas fuentes de los principales nutrientes (C N, S, P), puede tomarse como base un medio sintético o la - composición del microorganismo.

Selección y estandarización del medio de cultivo.

Observar la cinética de crecimiento y de producción en el medio elegido.

- e) Aplicación de los métodos estadísticos Plackett-Burman y Box-Wilson, para la optimización definitiva del medio de cul- tivo.

5. APENDICE.

5.1 Equipo.

Una agitadora e incubadora con ambiente controlado ; de --
piso (New Brunswick, Scientific Co., Inc. U.S.A.).

Un potenciómetro Corning, modelo 125.

Un fotolorímetro Bausch & Lomb, Spectronic 20.

Una centrifuga clínica, con regulación de velocidad y --
tiempo de centrifugación (Solvat).

Un autoclave para esterilización de medios de cultivo y -
material.

Campana con extractor.

Campana de flujo laminar (VECO).

Estufa.

Balanza analítica BOSCH S.2000

5.2 Reactivos y materias primas.

Los reactivos utilizados en las diferentes determinacio--
nes, fueron de grado analítico (J. T. BAKER., S.A. de C.V. -
México).

Eritromicina para bioensayo ; Antrona (SIGMA Chemical --
Company U.S.A.).

Las materias primas para la elaboración de medios de cul--
tivo, se obtuvieron de las compañías: BIOXON de México, S.A.
y DIFCO Laboratories U.S.A.

5.3 Técnicas de medición.

I. Método de Bioensayo (W.B. Hugo y A.D. Russell, 1977).

Utilizado para medir la concentración de eritromicina pre

sente. Solo se detecta la eritromicina activa (A).

- a) Crecer Sarcina Lutea en placas, con medio Infusión Cerebro Corazón (agar al 1%). Cada caja deberá contener 20 ml de medio (diámetro 9 cm). Resembrar cada 15 días.
- b) Preparar placas con 15 ml de medio para bioensayo (diámetro 9 cm).

| | | | |
|----------|-----|----------------------|---------|
| Peptona | 5 g | Extracto de carne | 3 g |
| Dextrosa | 5 g | Agar | 15 g |
| NaCl | 8 g | H ₂ O cbp | 1000 ml |
| | | pH antes esterilizar | 7 |

- c) Solución salina estéril, al 0.85%
- d) Amortiguador de fosfatos pH 7. Pesar 2.72 g de KH₂PO₄ + 6 g de K₂HPO₄ · 3H₂O + H₂O cbp 500 ml.

Procedimiento:

Elaborar una curva patrón de eritromicina.

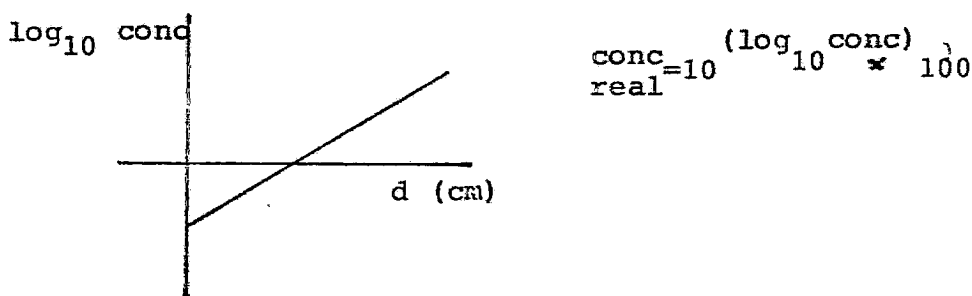
Preparar una solución patrón de eritromicina, con una concentración de 5 mg/ml en amortiguador de fosfatos pH 7.

De la solución patrón de eritromicina tomar alícuotas de 0.1 ml, 0.2 ml, 0.4 ml, 0.5 ml y 1 ml llevando cada una a 1 ml con amortiguador de fosfatos pH 7. De esta manera se obtendrán concentraciones de 5 µg/ml ; 10 µg/ml ; 20 µg/ml ; 25 µg/ml 50 µg/ml respectivamente.

- Se procede a tomar 10 µl de cada solución, colocando cada una en un sensidisco y éstos a su vez en las cajas con medio para bioensayo.
- Se sigue el mismo procedimiento con las muestras del caldo de fermentación sin células.
- La curva patrón deberá elaborarse cada vez que se haga el bioensayo.

Hacer todo por duplicado.

- Las cajas se someten a refrigeración (4°C) durante 2 ho ras, para que se difunda el antibiótico.
- Se prepara una suspensión concentrada de Sarcina lutea en solución salina al 0.85% y se coloca en el aspersor.
- Al término de las 2 horas de refrigeración, se sacan las cajas y con el aspersor se aplica la Sarcina lutea, de manera uniforme.
- Incubar las cajas 24-48 horas a 37°C.
- Leer el diámetro de antibiosis producido e interpolar en la curva patrón.



II. Método de Antrona (Keleti y Leaderer , 1974).

Determinación de carbohidratos totales en el caldo de fermentación.

Este método se basa en la condensación del antranol, cada reactivo con H_2SO_4 produce un derivado del furfural de los azúcares presentes. Amino azúcares y N-acetil-aminoazúcares, no reaccionan con el reactivo de antrona y los ácidos hexourónicos reaccionan ligeramente.

Preparación de reactivos:

1. Antrona:

- a) En un baño de hielo se coloca un matraz Erlen Meyer de -- 2000 ml, conteniendo 330 ml de H_2O destilada.
- b) En una probeta se miden exactamente 760 ml de H_2SO_4 R.A. y se agregan lentamente y con agitación al agua.

La solución deberá estar aproximadamente a 4°C para poder añadir el reactivo de antrona.

c) En balanza analítica se pesa sobre papel glasine 1 gr de reactivo de antrona y se agrega a la solución de H_2SO_4 -- (el color de la solución quedará amarillo paja, repetirlo si se pone verdoso). El reactivo es estable durante 20 - días si se guarda en un frasco ámbar.

2. Acido clorhídrico (HCl) concentrado R.A.

3. Preparación de muestras.

a) Se toma una muestra de 10 ml del caldo de fermentación y se centrifuga a 500 rpm., del sobrenadante se extrae una a lícua de 5 ml exactamente medidos y se colocan en un matraz aforado de 100 ml, lavando la pipeta con H_2O destilada y aforando el matraz con la misma, agitar bastante.

b) Tomar una alícuota de 5 ml de solución y llevarla a un tubo de ensaye.

c) Se agrega al tubo 1 ml de HCl conc. (Conectar el extractor para sacar los vapores de ácido).

d) Se coloca el tubo en un baño de agua a ebullición, por un tiempo de 22 minutos (con el fin de hidrolizar), poner ca nicas de vidrio en la boca del tubo para evitar la evaporación.

e) Al transcurrir el tiempo de hidrólisis se saca el tubo -- del baño.

f) Aforar a 100 ml.

g) De esta solución se toman 2 ml y se llevan a un tubo de ensaye.

h) Se añaden 10 ml de reactivo de antrona y se agita durante 30 seg. en mezclador Vortex.

i) Al mismo tiempo se prepara un blanco poniendo 2 ml de H_2O

destilada y 10 mL de reactivo de antrona.

j) Se llevan a baño de agua a ebullición por 12 min. exactamente medidos.

4. Programa de lectura.

a) Después de transcurrido este tiempo, se sacan los tubos del baño y se enfrían en baño de agua fría, por aproximadamente 5 minutos.

b) Leer en el colorímetro a λ 622 nm.

Curva patrón:

1. Preparación de reactivos.

a) Dextrosa R.A. anhidra.

b) Reactivo de antrona preparado.

2. Preparación de soluciones.

a) En balanza analítica se pesan 250 mg de dextrosa R.A.

b) Se llevan a un matraz volumétrico de 250 ml y se disuelven con H₂O destilada.

c) Después de disuelto, se afora con H₂O destilada y se agita. Esta es la solución stock.

3. Determinación.

a) De la solución patrón se toman alícuotas de 2ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml.

b) Estas alícuotas se transfieren a matraces de 100 ml aforados respectivamente, dejando escurrir cuantitativamente.

c) Aforar con H₂O destilada y agitar durante 2 minutos.

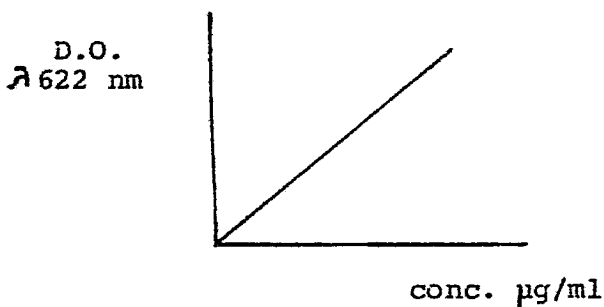
d) Las concentraciones de estas soluciones son: 20, 50, 100, 150, 200 µg de dextrosa/ml.

e) De estas soluciones se toman partes alícuotas de 2 ml ca-

da una y se transfieren a tubos de ensaye.

- f) Se agregan 10 ml de reactivo de antrona a cada tubo y se agitan durante 30 segundos en mezclador Vortex.
- g) Se prepara un blanco con 2 ml de agua destilada y 10 ml de reactivo de antrona.
- h) Los tubos se llevan a baño de agua a ebullición por 12 - minutos exactamente medidos.
- i) Al término de este tiempo se sacan los tubos del baño y se enfrían aproximadamente 5 minutos, en baño de agua fría
- j) Leer en colorímetro λ 622 nm.

Nota: Se deberá elaborar una curva patrón para cada reactivo de antrona que se prepare.



III. Determinación de la concentración celular.

- a) Método indirecto: Densidad óptica (D.O.).
 - b) Métodos directos: Peso seco (p.s.), paquete micelial (P.M.V.).
- a) Densidad óptica (D.O.).

Se basa en la dispersión de la luz, por una suspensión microbiana diluida.

Se toman 10 ml del caldo de fermentación, se centrifugan a 3000 rpm. durante 10 min., el sedimento se redisuelve en agua destilada y se lee la absorbancia en el colorímetro

a 540 nm. Muchas veces es necesario hacer diluciones, ya -- que la absorbancia no debe ser superior a 0.4 Blanco: H₂O destilada.

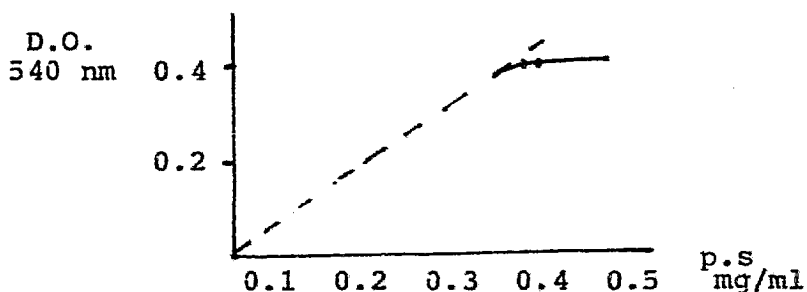
b) Peso seco (p.s.) (Wang, D.C.et al., 1979)

La concentración celular queda expresada como: g de cé lulas/ ml de medio.

Se toma una muestra determinada del caldo de fermenta -- ción y se filtra por Membrana Millipore (puesta previamente a peso constante) las células se secan en la estufa a 100-110°C durante 6-16 horas o hasta peso constante.

En este trabajo se tomaron muestras de 3 ml y se utilizaron Membranas Millipore de poro 0.45 µm.

Nota: En la zona en la cual la relación entre D.O. y p.s. - es lineal, puede determinarse este último con una precisión y reproducibilidad confiables, con referencia a una curva patrón previamente elaborada mediante pesadas con el organismo estudiado.



c) Paquete Micelial (PMV).

Muy utilizado en la industria.

Se toma un volumen determinado de caldo de fermentación y por centrifugación bajo condiciones std. de tiempo y rotación, en tubos graduados, se determina el volumen ocupado por sólidos, lo cual indica la concentración celular (%).

Para obtener resultados óptimos, debe utilizarse un medio soluble.

En este trabajo se tomaron muestras de 10 ml, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm.

5.4 Conservación de cepas.

La capacidad de los hongos, para producir esporas, es un atributo hereditario, característico de su fenotipo y depende - de las condiciones del medio en que se encuentre (Hawker, 1966)

Para una transformación óptima se deberá proporcionar al - medio de cultivo una concentración de esporas de 1×10^8 a 1×10^9 esporas/ml.

Para la conservación del Streptomyces erythreus, se partió de un cultivo de esporas en agar inclinado. Fig. 5.4.1

Como primer paso se procedió a activar las esporas, en medio complejo de siembra (líquido), en matraces Erlen Meyer de 250 ml, con 50 ml de medio, T 37°C, agitación 200 rpm, durante 24 horas.

Medio complejo de siembra:

| | | | |
|----------------------|-------|------------------|------------|
| Extracto de levadura | 0.4 g | Bacto dextrosa | 0.4 g |
| Extracto de malta | 1.0 g | H ₂ O | cbp 100 ml |
| pH antes esterilizar | 7.5 | | |

Del preinóculo activado, se partió para los siguientes métodos de conservación:

a) Placas: Se tomó un volumen de 0.1 ml del preinóculo y se esparció de manera uniforme en toda la caja Petri, que contenía 15 ml de medio complejo de siembra con 2% de agar. Se dejó incubar durante 48 horas a 37°C.

- b) Gliceroles: Las esporas obtenidas en una de las placas -- (a) se siembran en 100 ml de medio para gliceroles, posteriormente se pasan alícuotas de 5 ml a tubos de rosca y se almacenan a 4°C. (tiempo máximo de almacenamiento: 8 meses).

Medio para gliceroles:

| | (%) |
|---------------------------|--------|
| Extracto de malta | 0.4 |
| Extracto de levadura | 0.4 |
| Glicerol | 20 |
| H ₂ O cbp | 100 ml |

- c) Frascos Roux: (Vézina et al., 1968): Se adicionan -- 250 ml de agar nutritivo, a un Frasco Roux ; ya gelificado se añaden 5 ml del preinóculo y se dispersa de manera uniforme -- en todo el agar, eliminando el exceso de líquido. Se almacenan en posición no invertida, durante 9-10 días a 37°C. Al -- término de este lapso de tiempo se almacenan a 4°C.

(Tiempo máximo de almacenamiento: 6 meses).

Cosecha de esporas: para separar las esporas del agar, se agregan aproximadamente 10 ml de sol. salina al 0.85% y per-- las de vidrio, con movimientos suaves para no romper el agar, se separarán el micelio y las cadenas de esporas.

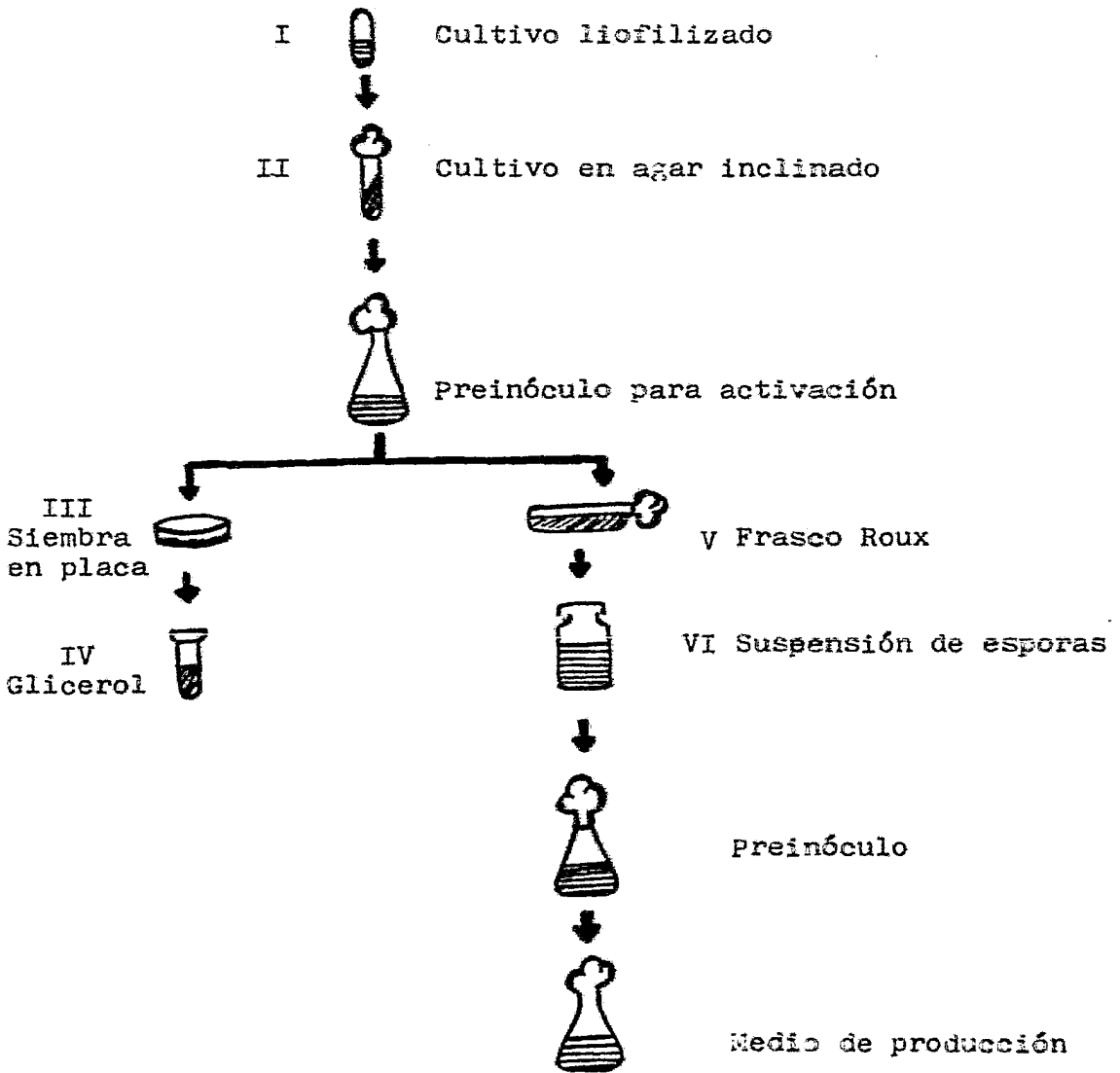
- d) Suspensión de esporas: Las esporas cosechadas se filtran a través de algodón y se almacenan en frascos de rosca, que e contienen aproximadamente 100 ml de sol. salina al 0.85%. -- Temperatura de almacenamiento: 4°C.

(Tiempo máximo de almacenamiento: 2 meses).

En este trabajo, se partió de la suspensión de esporas, pa-- ra la elaboración de los preinóculos.

Todos estos métodos deberán desarrollarse en todos sus pa-- sos, bajo las más estrictas condiciones de esterilidad.

Fig. 5.4.1 CONSERVACION DE CEPAS.



6. BIBLIOGRAFIA.

- Buchanan, R/E & Gibbons, N.E., 1974 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Williams & Wilkins Comp. U.S.A.
- Boas, A. Che. Eng., Jan 7, 1963. Cybernetic Methods in Chemistry & Chemical Engineering Kafarov. MIR Publishers. U.R.S.S.
- Boltyansky, V. 1966. Matematicheskie metody optimalnogo upravleniya (Mathematical Methods of Optimal Control) Fizmatgiz -- Cybernetic Methods in Chemistry & Chemical Engineering Kafarov MIR Publishers. U.R.S.S.
- Bonsjak, M. Holjevac, M. y Johanides, V., 1976. Erythromycin -- Biosynthesis in Semicontinuous Culture of Streptomyces erythreus J. appl. Chem. Biotechnol. 26, 333-334.
- Box, G., 1957 Applied Statistics, 6, no, 2, 81.
- Box, G. Hunter, W. Stuart Hunter, J., 1978. Statistics for Experimenters. John Willy & Sons. U. S.A.
- Box, G. Wilson, K., 1951. Journal of the Royal Statistical Society, Series B, 13, No. 1,1. Cybernetic Methods in Chemistry & -- Chemical Engineering. Kafarov. MIR Publishers. U.R.S.S.
- Brandon, D. 1959. Cybernetic Methods in Chemistry & Chemical Engineering. Kafarov. MIR Publishers. U.R.S.S.
- Bu'lock, J.D., 1965. The Biosynthesis of Natural Products. An Introduction to Secondary Metabolism, Mc. Graw-Hill Publ. Co. -- Ltd., London, 1965.
- Camici, L. Sermonti, G. & Chain, E.B., 1952. Observations on Penicillium chrysogenum in submerged culture. I. Mycelial growth and autolysis. Bulletin of the World Health Organisation 6, -- 265-276.
- Carpenter, B. et al., 1965. Cybernetic Methods in Chemistry & -- Chemical Engineering Kafarov. MIR Publishers. U.R.S.S.
- Conn, E. Stumpf, P.K., 1980 Bioquímica Fundamental Ed. Limusa México, p. 275-323.
- Corcoran, J.W., 1974. Lipid and Macrolide Biosynthesis in Streptomyces erythreus. Developments in Ind. Microbiology 15 p. 93-100.
- Demain, A.L. and Masurekar, P.S., 1974. Lysine inhibition of

in vivo homocitrate synthesis in Penicillium chrysogenum. J. - Gen. Microbiol, 82: 143-151.

Fabila, C.G., 1980. Planeación y Análisis de Experimentos Industriales. LANFI. México.

Firkin, F.C. and Linnane, A.W., 1969. Phylogenetic differences in the sensitivity of mitochondrial protein synthesizing systems to antibiotics. FEBS Letters 2, 330.

Foster, J.W., 1949. " Genetics of Antibiotic-Producing Microorganism " Sermonti, G. Wiley-Interscience. London, G.B.

Gallo, R. and Katz, E., 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthesis and actinomycin formation by glucose. J. Bacteriol. 109 -- p. 659-667.

Gros, I. Bosnjak, M. Johanides, V. Topolovec, V., 1978. Autolysis of Streptomyces erythreus. Abstracts: First Eur. Congress on Biotechnology. Interlaken, Suiza. p. 66-69.

Hawker, 1966. " Les Applications Industrielles de la Microbiologie " Rivière, J. Masson et Cie, Paris, France.

Herrel, W.E., 1958. Hazards of antibiotic therapy. Am. Med. - Assoc. 168, 1875.

Hugo, W.B. and Russell, A.D., 1977. Pharmaceutical Microbiology. Blackwell Scientific Publications. London, G.B. p. 118, - 119.

Hütter, R. Leisinger, T. Nüesch, J. Wehrli, W., 1978. Antibiotics and Other Secondary Metabolites. FEMS Symposium No.5 Academic Press Inc. London, G.B.

Kafarov, V. 1976 "Cybernetic Methods in Chemistry & Chemical Engineering " MIR Publishers. U.R.S.S. p. 135-225.

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

Kermode, R., 1967. Chemical Engineering, 74, no. 26, 97.

Lehninger, A., 1979. " Bioquímica ". Ed. Omega, S.A. España p. 992-1000.

Lowe, G., 1964. " Cybernetic Methods in Chemistry & Chemical Engineering " Kafarov. MIR Publishers. U.R.S.S.

Mao, J.C.H. and Putterman, M., 1968. Accumulation in gram-positive and gram-negative bacteria as a mechanism of resistance to erythromycin. J. Bacteriol. 93, 1111. " Antibiotics. " -- Vol. III Springer-Verlag. U.S.A.

Martin, J.F., 1978. Manipulation of Gene Expression in Development of Antibiotic Production. Antibiotics and other Secondary Metabolites. Biosynthesis and production. Academic Press Sn. Fco. p. 19-37.

Martin, J.F. and Lloyd E. McDaniel., 1975. Production of Polyene Macrolide Antibiotics. Academic Press, Ind.

Martin, W.J. and Wellman, W.W., 1967. Clinically useful antimicrobial agents: Untoward reactions. Post-grad. Med. 42, - 397.

Nalimov, V., Chernova, N., 1965. Statisticheskie Metody Planirovaniya Ekstremalnykh Eksperimentov (Statistical Methods of Extremal Experiments Designs). " Nauka " Publishers, 1965.

Oleinick, N.L., 1975. The Erythromycins. " Antibiotics " Vol III. Springer-Verlag. New York, U.S.A. p. 396-419.

Páca, J. Ettler, P. y Gregr, V., 1978. Oxygen Transfer Rate - in Media Used for Erythromycin Biosynthesis. J. Ferment. Technol. 56, 144-151.

Pirt, S.J., 1975. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications. U.S.A. 4-33 ; 74-75.

Pirt, S.J. & Callow, D.S., 1959. Continuous flow culture of - filamentous mould Penicillium chrysogenum and the control of its morphology. Nature, London. 184, 307-310.

Pirt, S.J. & Callow, D.S., 1960. Journal of Applied Bacteriology 23, 87-98.

Pontryagin, L. Boltyansky, V. Gamkrelidza, R. Mishchenko. Y., 1961. Matematicheskaya teoriya oprimalnykh protsessov (A Mathematical Theory of Optimal Processes)., Fizmatgiz.

Quintero R.R., 1981. "Ingenieria Bioquímica " Teoría y Aplicaciones. Ed. Alhambra. México.

Righelato, R.C., 1975. " The Filamentous Fungi " Vol. I. Edward Arnold. Ed. Londres, G.B.

Rivière, J., 1975. " Les Applications Industrielles de la Microbiologie ". Masson et Cie, ed. Paris, France.

Romero, G.J., 1981. Tesis. Mecanismos de Regulación en la -- Producción de eritromicina, por Streptomyces erythreus. U.N.A.M.

Rose, L.H., 1981. Chemical Reactor Design in Practice. Elsevier Scientific Publishing Comp. Netherlands.

Segel, I.H., 1976. Biochemical Calculations. John Wiley & Sons Inc. U.S.A.

Senez, J.C., 1976. Microbiología General. Ed. Alhambra. España.

Sermonti, G., 1969. Genetics of Antibiotic-Producing Microorganism. Wiley-Interscience. London, G.B. p. 1-8 ; 23-25.

Simon, P. Meunier, R., 1970. Microbiologie Industrielle et - Genie Biochimique ". Masson. France. p. 452.

Smith, J.E. & Berry, D.R., 1975. " The Filamentous Fungi " -- Vol. I. Edward Arnold Publ. London, G.B.

Solomons, G.L., 1969. " Materials and Methods in Fermentation " Academic Press. Great Britain. p. 1-8 ; 115-131.

Sprinkmeyer, R. and Pape, H., 1976. Effects of Glucose and - Fatty Acids on the Formation of the Macrolide Antibiotic Tylosin by Streptomyces . Genetics of the Actinomycetales , Proceedings of the International Colloquium at the Forschungs Institut Borstel. p. 51-57.

Statier, R.Y. Doudoroff, M. Adelberg, A.E., 1970. The Microbial World. Prentice-Hall, Inc. U.S.A. 1970.

Stark, W.M. & Smith, R.L., 1961. The Erythromycin Fermentation. Prog. Ind. Microbiol. 3, 211-229.

Tanaka, S. Otaka, T. y Kaji, A., 1973. Further Studies on the Mechanism of Erythromycin Action. Biochem. Biophys. Acta. - 331, 128-140.

Taubman, S.B. Young, F.E. Corcoran, J.W., 1963. Antibiotic - Glycosides. IV. Studies on the mechanism of erythromycin resistance in Bacillus subtilis. Proc. Natl, Acad. Sci. U.S. 50 935

Vygantas, A.M. y Corcoran, J.W., 1974. Fed. Proc. 33, 1233.

Weinstein, M.J. & Wagman, G.H., 1978. Journal of Chromatography library. Vol. 15. Antibiotics. Elsevier Scientific Pub. Netherlands, Holland. 275-276.

Wiley, P. Gale, R. Pettinga, C.W. & Gerzon, K., 1957. Erythromycin XII. The isolation, properties and partial structure of erythromycin C. J. Am. Chem. Soc. 79, 6074.

Wilhelm, J.M. Oleinick, N.L. and Corcoran, J.W., 1968. Interaction of Antibiotics with ribosomes. Structure-function relationships and a possible common mechanism for the antibacterial action of the macrolides and lincomycin. Antimicrobial agents -- Chemotherapy. p. 236.

Wang, D.C. Cooney, Ch. L. Demain, A.L. Dunnill, P. Humphrey, A.E. & Lilly, M.D. Fermentation & Enzyme Technology. John Wiley & Sons, Inc. 1979. U.S.A.