

20
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MEJORAMIENTO DE UN MEDIO
DE CULTIVO DE
Streptomyces kanamyceticus
PARA LA PRODUCCION DE
KANAMICINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA ANTONIETA HEREDIA OMAÑA



MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI) bajo la asesoría de la M. en C. Marcela Zamudio Maya encargada del proyecto denominado "KANAMICINA" y por el Dr. Armando Cahue López, Subdirector del departamento de biotecnología.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco muy especialmente a la M. en C. Marcela Zamudio Maya por su inapreciable apoyo, asesoría, y sugerencias para la realización de este trabajo y poder aprender de ella sus amplios conocimientos y profesionalismo como parte de mi desarrollo profesional.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Armando Cahue López, subdirector del departamento de biotecnología por brindarme las facilidades para realizar este trabajo, aspecto fundamental en la elaboración de esta tesis.

Agradezco ampliamente a la profesora Q.B.P. Dora Alicia Pérez González investigadora de la FES Zaragoza, por brindarme su apoyo incondicional, asesoría y facilidades para la culminación de este trabajo.

Agradezco a todo el jurado asignado para el tema, por sus sugerencias siempre valiosas, que contribuyeron a la culminación de este trabajo.

D E D I C A T O R I A S

A mi padre **Angel** que me enseñó a luchar en la vida, con honestidad, dedicación, constancia y buena voluntad y que llevaré en mi corazón para toda la vida.

A mi madre **Olga** por todo su amor, fe y confianza que ha depositado siempre a lo largo de mi vida.

A **Mario** por el amor que le tengo y por ser como es.

A mis Hermanos **Olga** y **Fernando** por su cariño y apoyo que me han brindado.

A todos mis sobrinos (**Dario**, **Olga**, **Marcos**, **Pamela** y **Karla**), por el cariño tan especial que les tengo.

A mis compañeros de los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial.

Y a todas las personas que de alguna manera me apoyaron en la culminación de mis estudios de licenciatura.

G R A C I A S.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Q.B.P. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ.
VOCAL: Q.B.P. MA. LUISA DELGADO BRISEÑO.
SECRETARIO: ING. ABEL BLANCAS CARRERA.
SUPLENTE: Q.F.B. MARCO VINICIO FUENTES ALVARADO.
SUPLENTE: Q.F.B. ANGEL BARAJAS CHAVARRIA.

ASESORES DEL TEMA

M. en C. MARCELA ZAMUDIO MAYA
Q.B.P. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

INDICE

1.	RESUMEN DE TESIS	3
2.	INTRODUCCIÓN	
2.1	Factores importantes en una Fermentación	5
2.1.1	Fermentación	5
2.1.2	Proceso Fermentativo	5
2.1.3	Metabolito Secundario y Metabolito primario	6
3.	FUNDAMENTACIÓN	
3.1	Política de Fomento	7
3.2	Aspectos de Mercado.	8
4.	GENERALIDADES SOBRE KANAMICINA	
4.1	Kanamicina	9
4.2	Importancia Clínica.	9
4.3	Aspectos Clínicos	10
4.4	¿Quién la Produce?	10
4.5	Mecanismo de Acción	10
4.6	Estructura Química.	11
4.7	Estudios Realizados sobre kanamicina	12
4.8	Fuentes Nutricionales importantes para <u>Streptomyces kanamyceticus</u> .	13
5	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5.1	Objetivos.	16
5.1.1	Objetivos generales	16
5.1.2	Objetivos específicos	16
5.2	Hipótesis	16
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1	Microorganismos	17
6.2	Medios de cultivo	18
6.2.1	Medio de conservación - Yeme	18
6.2.2	Medio Inóculo PYG	18
6.2.3	Medio de producción - Basal	18
6.2.4	Medio No 11 para Antibióticos	18
6.2.5	Preparación del precultivo (inóculo)	19
6.3	Fermentación a Nivel Matraz (producción)	19
6.4	Pretratamiento de muestras de fermentación	19
6.5	Determinación de la potencia de Kanamicina	19
6.5.2.1	Conservación de <u>Staphylococcus aureus</u>	20
6.5.2.2	Preparación de la suspensión del microorganismo de prueba	20

6.5.2.3	Preparación de las soluciones de referencia	20
6.5.2.4	Preparación de placas	20
6.5.2.5	Curva de calibración	20
6.5.2.6	Determinación de la concentración gráfica de kanamicina	22
6.6	Determinación del crecimiento celular	
6.6.1	Peso Seco	22
6.6.2	Ensayo microscópico	22
6.6.3	Determinación de pH	22
6.6.4	Determinación de Azúcares Reductores	22
7.	RESULTADOS	
7.1	Adaptación de la técnica de valoración microbiológica de kanamicina	24
7.1.1	Tipo de reservorio	24
7.1.2	Factores que afectan el halo de inhibición	25
7.2	Estudio del efecto de los componentes del medio de cultivo para la producción de kanamicina	26
7.3	Efecto del fosfato	29
7.4	Efecto de la glucosa	30
7.5	Estudio de fuentes de carbono y nitrógeno	31
7.6	Efecto del ácido glutámico	33
8.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
9.	CONCLUSIONES	39
10.	RECOMENDACIONES	42
11.	APÉNDICE	
11.1	Arreglos ortogonales	43
11.2	Ejemplificación de la determinación gráfica de kanamicina	48
12.	BIBLIOGRAFÍA	48

1.- RESUMEN DE TESIS.

Este trabajo está enfocado hacia el mejoramiento del medio de cultivo, con una cepa mutante de Streptomyces kanamyceticus para la producción de kanamicina "A".

Como primer paso se seleccionó un medio de producción para kanamicina entre los diferentes medios que fueron identificados en la literatura. Este se tomó como base para estudiar el efecto de los componentes en el rendimiento de la producción del antibiótico.

Se realizaron estudios utilizando diseños experimentales multifactoriales, variando las concentraciones de los componentes del medio basal que se ha reportado que tienen un efecto marcado en la producción de kanamicina, entre las que se incluyen:

- A. Fuentes de carbono (almidón y glucosa).
- B. Fuentes de nitrógeno (harina de soya y de maíz).
- C. Sales inorgánicas (fosfato de potasio, carbonato de calcio y sulfato de magnesio).

Para efectos de la determinación de la concentración de kanamicina "A" se empleó la técnica de valoración microbiológica para la cuantificación de antibióticos.

Adicionalmente se estudiaron los efectos en la producción de kanamicina "A" de otras nuevas fuentes de:

- A. Carbono (dextrina y sacarosa).
- B. Nitrógeno (harina de camarón y nitrato de sodio).
- C. Aceites vegetales (girasol y maíz).
- D. Ácido glutámico

Los resultados obtenidos, a partir de las diferentes combinaciones de componentes y concentraciones, permitieron conformar un medio de cultivo mejorado para la producción del metabolito con rendimientos superiores a los alcanzados en el medio basal.

2.- INTRODUCCIÓN.

La explotación de microorganismos para la producción de alimentos es una característica común de las civilizaciones antiguas. En el siglo XVI, por ejemplo, los exploradores españoles descubrieron el cultivo del alga verde-azul (*Spirulina*) entre las comunidades aztecas. (30)

La palabra Biotecnología está formada por dos vocablos: Bio, que viene del verbo "bios" que significa vida y que llevó a la palabra biología al principio del siglo XIX, y Tecnología que proviene del griego "tecnología", que apareció en 1956 en los textos franceses y significa "el estudio de las técnicas de las herramientas, de las máquinas y de los materiales". Si la biología es una ciencia de la naturaleza, una ciencia del laboratorio, la Biotecnología es en sí una ciencia que utiliza la materia viviente para degradar, sintetizar y producir los materiales en forma fácil y con buen rendimiento económico. Aprovecha las enzimas, libres o fijas, los microorganismos y las estructuras subcelulares activas (biocatalizadores) (26).

Así la Biotecnología se caracteriza por su aspecto interdisciplinario y sistemático. Brevemente estamos en la encrucijada de ciencias como la química, la bioquímica, la ingeniería enzimática, la ingeniería química o industrial, la microbiología, la ingeniería genética, la ingeniería microbiológica, las matemáticas, la informática, etc. (26).

El desarrollo de la biotecnología se basa en la viabilidad que proporciona disponer de métodos viables para el mantenimiento de monocultivos en grandes fermentadores. La obtención de productos farmacéuticos a partir de microorganismos fue considerada inconcebible en otras condiciones que no fueran las de cultivos puros. (30)

Gracias a esta ciencia, se han logrado progresos importantes en la agricultura, alimentos y en la medicina. Un ejemplo de esto, es que a mediados de 1991 en Estados Unidos estaban sometidos a revisión reglamentaria más de 130 productos farmacéuticos derivados de la biotecnología destinados a combatir dolencias, que van desde la hemofilia hasta el SIDA y desde la anemia hasta la leucemia.

En resumen la biotecnología tiene numerosas aplicaciones tradicionales y nuevas:

- a. Las industrias agroalimentarias
- b. Las industrias químicas y farmacéuticas
- c. La producción de alimentos con concentrados de proteínas
- d. La producción de alcoholes
- e. La industria cosmética.

Por lo tanto si se quiere conseguir que una aplicación amplia y juiciosa permita satisfacer los fines humanos y ambientales, los beneficios de la biotecnología deben compartirse entre países desarrollados y en desarrollo, gracias en parte a una sólida cooperación entre científicos e investigadores.

2.1 FACTORES IMPORTANTES EN UNA FERMENTACIÓN

2.1.1 Fermentación.

Incluye numerosas reacciones de óxido-reducción, en la cuál compuestos orgánicos usados como fuentes de carbono y energía actúan como aceptores o donadores de iones hidrógeno.

2.1.2 Proceso fermentativo.

Los procesos biotecnológicos generalmente tienen lugar en cultivos sumergidos. Esto implica el crecimiento de organismos en una suspensión acuosa en tanques de cultivo que se conocen como fermentadores. Las palabras "fermentador" y "fermentación" usadas en este contexto son, estrictamente hablando, términos erróneos. La fermentación es un tipo de catabolismo específico, que se refiere a menudo a la degradación anaeróbica de la glucosa para dar etanol y ácido láctico. Ha adquirido, sin embargo, la consideración de una palabra aceptada de manera que la fermentación de etanol, por ejemplo se refiere a la producción de etanol. De manera análoga, la palabra "fermentador", se aplica para describir un tanque en el que se cultivan los microorganismos, mientras que los "productos de fermentación" se refieren a los materiales acumulados en los cultivos, tales como alcoholes ácidos, antibióticos y enzimas (10).

En resumen involucra el someter un microorganismo productor a una fermentación en un medio óptimo de cultivo sumergido agitado, sumergido no agitado o semisólido, según sea el caso, con ciertos nutrientes para su crecimiento y reacciones metabólicas y bajo ciertas condiciones ambientales (pH, temperatura, etc.) con el fin de obtener productos de interés industrial. De una manera esquemáticamente se puede representar así:



Por lo tanto para que un proceso fermentativo sea satisfactorio, hay algunas condiciones importantes que hay que tomar en cuenta:

1. Optimización del medio de cultivo.
2. Condiciones ambientales adecuadas: pH, oxígeno, aireación y temperatura.
3. Mejoramiento de cepas mejoradas de microorganismos.
4. La adición de sustancias químicas al medio que sirven de precursor para la síntesis del metabolito deseado.
5. Optimización de los métodos de recuperación del producto que estén en el medio de fermentación.

Además debe considerarse las características físicas y de operación del recipiente en donde se lleva a cabo - el fermentador - y las operaciones que se efectúan antes y después de la fermentación.(22)

2.1.3 Metabolito primario y metabolito secundario

Cuando un microorganismo crece en un ambiente en el cual todos sus nutrientes esenciales están en exceso, estos nutrientes se transforman en los productos finales del metabolismo energético, en calor, o bien en los compuestos requeridos para la producción y da lugar a nuevas células. Estas dos categorías de compuestos requeridos para el crecimiento se conocen como METABOLITO PRIMARIO. Los metabolitos primarios son direccionales y un error en la biosíntesis es letal para la célula, cosa que no pasa con los metabolitos secundarios. (16)

Algunos metabolitos de este tipo son los aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, grasas, vitaminas, polisacáridos y enzimas. Todos los metabolitos anteriores constituyen la biomasa celular.

Un metabolito secundario se produce cuando la concentración de un sustrato limitante del crecimiento va disminuyendo hasta aproximarse al valor K_s (constante que representa la afinidad del organismo por el sustrato limitante del crecimiento) del cultivo y, cuando esto ocurre, algunos cultivos microbianos sintetizan y excretan compuestos conocidos como METABOLITOS SECUNDARIOS. Las sustancias que más han contribuido a la importancia comercial de los procesos microbianos industriales en Biotecnología. (16)

Algo muy importante es que los metabolitos secundarios son compuestos no esenciales para el crecimiento exponencial. Entre este tipo de metabolitos se encuentran los antibióticos que desde el punto de vista comercial son los más utilizados; entre los que se incluyen: la penicilina, los aminoglucósidos, las cefalosporinas, polímeros y tetraciclinas. Las toxinas y los alcaloides dan cuenta del resto de metabolitos secundarios.

3.- FUNDAMENTACIÓN

3.1 POLÍTICA DE FOMENTO

La industria farmacéutica establecida en el país es dependiente del exterior por lo que respecta a tecnología. Las empresas del capital mayoritario obtiene la tecnología directamente de sus casas matrices y las del capital mayoritario nacional tienen problemas para la obtención de la misma.

La mayor parte de los principios activos de los medicamentos que se utilizan en nuestro país son importados, razón que se incrementa el costo de producción.

En promedio durante el periodo 82-83, la balanza comercial de los principios activos fue deficitaria por cerca de doscientos cincuenta millones de dólares. En contraste las predicciones de la demanda de medicamentos preveía que la capacidad instalada de la industria farmacéutica era suficiente para satisfacer los requerimientos hasta 1990 en la mayoría de las ramas farmacéuticas.

Con el fin de abatir las importaciones, depender en menor medida del exterior y reducir costos de producción es importante establecer una estrategia tecnológica propia para el desarrollo de principios activos a través de la conjugación de los recursos del país en este campo, y la vinculación entre centros de investigación y desarrollo con el sector productivo.

En principio el Gobierno Federal a través de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, formuló el programa integral de desarrollo de la industria farmacéutica 1984-1988. En dicho documento se establecía como uno de sus objetivos el contribuir al fortalecimiento de la independencia económica del país, incrementando la producción nacional de materias primas y principios activos.

Así mismo consideraba establecer una sólida estructura tecnológica que sirviera de base para el desarrollo de la industria farmacéutica.

La estrategia contemplaba tres vertientes fundamentales: la orientación de producción de acuerdo con las necesidades nacionales, fortalecimiento de la participación de las empresas mexicanas en este sector y las adecuaciones al sistema de comercialización existente.

Como instrumento de política se establecía que el esquema de desarrollo tecnológico sería orientado hacia la investigación básica, la asimilación y adaptación tecnológicas para la producción de farmoquímicos prioritarios y el acopio y difusión de información sobre nuevos desarrollos tecnológicos a nivel mundial.

Se presta especial atención al desarrollo de tecnología aplicada, apoyando programas específicos para la producción de farmoquímicos prioritarios, así como respaldando las

labores de desarrollo tecnológico, de centros de investigación públicos y privados mediante la apertura de programas de financiamiento preferencial, riesgo compartido y subvenciones.

Por último, se establecían algunas medidas de protección para los principios activos al mantenerse el requisito de permiso previo a la importación, otorgándose solo cuando no existiese fabricación nacional o se demostrará que ésta era insuficiente, los aranceles se mantendrían bajos para no presionar los costos de producción.

En especial, estas medidas de fomento son más agresivas para aquellos productos farmacéuticos que se consideran prioritarios dentro de la estrategia de desarrollo de la industria farmacéutica. Entre ellos, de los derivados de la fermentación como productos Intermedios se cataloga la kanamicina.(21)

3.2 ASPECTOS DE MERCADO

La demanda en el mercado mundial de kanamicina, se estimó alrededor de quinientos millones de dólares para el año de 1978. Existen cuando menos diez empresas que producen este principio activo por fermentación sumergida y se encuentran en Europa y Asia.

La tecnología empleada es un proceso convencional de fermentación sumergida patentada desde hace más de diez años en Japón, que se considera ahora del dominio público.

Para el mercado mexicano se estima el consumo de kanamicina en poco menos de diez toneladas, que representan ventas por alrededor de dos millones de dólares anuales. Este hecho hace incosteable la instalación de plantas de fermentación de origen extranjero, por los altos costos de sobrefacturación de materias primas y de inversión en activos fijos de importación.

La producción de kanamicina es básicamente obtenida por una sola empresa que adquiere del exterior extractos crudos contaminados de isómeros que somete a un proceso de purificación.

Ante las condiciones de apertura comercial, se hace indispensable para garantizar la competitividad del producto nacional, que la empresa se integre en forma vertical con el fin de abatir costos y eliminar su dependencia con el exterior.(21)

4.- GENERALIDADES SOBRE LA KANAMICINA

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que tienen el poder de inhibir o de destruir a otros microorganismos. Su interés económico deriva de la utilización médica para luchar contra enfermedades infecciosas. Se trata de sustancias específicas, que pueden interferir directamente en la proliferación del huésped y su característica esencial es la toxicidad relativa. Se distinguen varios tipos de antibióticos según su estructura química y sus diferentes mecanismos de acción. Por ejemplo:

- A. Penicilinas. Actúan en la pared celular.
- B. Antibióticos polipeptídicos, actúan a nivel de la membrana.
- C. Antibióticos aminoglucósidos, macrolídicos, tetraciclinas, y otros antibióticos como el clorafenicol; interfieren en la síntesis de proteínas. (26)

El género Streptomyces agrupa a una gran parte de los microorganismos productores de antibióticos.

4.1 KANAMICINA Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA

La kanamicina es un antibiótico descubierto en Japón, por Hamao Umazawa en 1956, desde entonces el antibiótico ha sido empleado como agente terapéutico de amplio espectro para enfermedades de origen bacteriano como lo es la tuberculosis y, en especial, en infecciones causadas por microorganismos resistentes del aparato genitourinario, respiratorio, digestivo y de la piel. Comúnmente, la kanamicina se emplea en forma de sulfato de kanamicina contra infecciones causadas por bacilos gram (-), infecciones pulmonares por especies del grupo Klebsiella spp., en infecciones por Staphylococcus aureus, en endocarditis bacteriana y en el tratamiento de gonorrea. (1,6)

La Kanamicina es un antibiótico del grupo denominado "AMINOGLUCOSIDO" al cual pertenecen también la ESTREPTOMICINA, NEOMICINA Y GENTAMICINA. Su efecto es muy similar a la estreptomycin. Se trata de un complejo en donde el componente mayor es la kanamicina "A", además contiene las kanamicinas "B" y "C".

4.3 ASPECTOS CLÍNICOS

CONCENTRACIÓN MÁXIMA EN SANGRE : 20-30 mg/ml. (vía intramuscular)
CONCENTRACIÓN MÁXIMA EN ORINA : más de 250 mg/ml.
TOXICIDAD : Evitar administrar sobredosis (más de 15 g).
Puede provocar daño renal y puede causar sordera (6).

4.4 ¿QUIEN LA PRODUCE?

La kanamicina es producida por un microorganismo procariontico habitante del suelo denominado Streptomyces kanamyceticus, perteneciente al grupo de los ACTYNO MYCETOS. Estos microorganismos son gram positivos que tienden a crecer lentamente formando filamentos ramificados. En algunos géneros, los filamentos se fragmentan rápidamente durante el crecimiento y originan células pleomórficas de aspecto semejante a las micobacterias. El crecimiento filamentosos da lugar a la formación de colonias con micelios. Por otra parte, ciertos actinomicetos suelen ser patógenos.(1)

Las características que permiten clasificar a los actinomicetos entre las bacterias son:

- A. Carecen de membrana nuclear (son procariontes).
- B. Dimensiones semejantes a las de las bacterias.
- C. Paredes celulares parecidas a las bacterias (ácido murámico y ácido diaminopirimídico).
- D. La inhibición de su crecimiento se lleva a cabo por agentes antimicrobianos.
- E. No son sensibles a los antibióticos poliénicos de intensa acción fungicida.
- F. Las formas móviles poseen flagelos similares a los de las bacterias.
- G. Existen formas aerobias, anaerobias y quimioautótrofas.

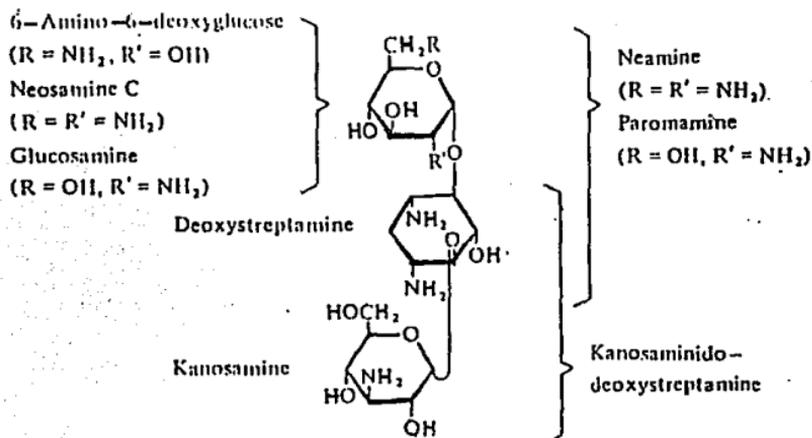
4.5 MECANISMO DE ACCIÓN

Los antibióticos aminoglucósidos actúan sobre la síntesis de proteínas en los ribosomas de las bacterias. Se liga a los ribosomas de los microorganismos sensibles, causando muerte celular al producir cambios genéticos, aberrantes en las células. La resistencia a la kanamicina sucede cuando las células no captan dicho antibiótico o se modifica genéticamente el sitio al cual se une la kanamicina en los ribosomas de las células, permitiendo así, que continúe la síntesis normal de las proteínas.(8)

4.6 ESTRUCTURA DE LA KANAMICINA

La estructura de la kanamicina fue titulada en el Chemical Abstract bajo el título de D-DEOXIESTREPTAMINA, 0-3-amino-3-deox-6-D-glucopyranosyl-(1-6)-0-[6-amino-6-deoxy-6-D-glucopyranosyl-(1-4)]-2-deoxy. (8)

FIG. 1 ESTRUCTURA DE KANAMICINA.



	R	R'
Kanamycin A	NH ₂	OH
Kanamycin B	NH ₂	NH ₂
Kanamycin C	OH	NH ₂

4.7 ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE KANAMICINA

Las especies de Streptomyces spp requieren de algunos minerales específicos para su crecimiento y actividades metabólicas, actuando como cofactores bioquímicos que ayudan a las enzimas involucradas en la síntesis de los antibióticos aminoglucósidos.

El requerimiento de varias sales como magnesio, calcio, fosfato, sodio, dependen del tipo de microorganismo, así como de la naturaleza del medio.

Un considerable número de estudios e investigaciones se han realizado acerca del crecimiento de microorganismos en la biosíntesis de antibióticos, pero hay pocos sobre los requerimientos de sales inorgánicas y nutrientes orgánicos sobre ACTYNOOMICETOS, en medios complejos para producción industrial.

Basak y Majumdar (1975) describen los efectos de las sales inorgánicas y el papel que juegan las enzimas: fosfatasa alcalina, kanamicina acetil transferasa y kanamicina acetil aminohidrolasa, por estar directamente involucradas en la síntesis de kanamicina. Estos autores explican que el fosfato inorgánico, dependiendo de su concentración, inhibe la enzima fosfatasa mientras que el calcio y el magnesio estimulan a la enzima aumentando la producción de kanamicina. El efecto del nitrógeno inorgánico, que también ha sido estudiado, reporta una drástica disminución de la producción de kanamicina al incorporar al medio de cultivo cloruro de amonio y nitrato de amonio al 0.1%. (3). Holta y Okami (1976) reportan que el magnesio a una concentración de 5 a 20 M estimula, significativamente, la producción de kanamicina debido al incremento en la actividad de formación de las enzimas promoviendo la síntesis de kanamicina (11). Basak (1978) menciona en un estudio que la glucosamina incrementa notablemente la síntesis de la enzima fosfatasa alcalina, estimulando así el aumento de kanamicina. (3,9)

También las fuentes de carbono y nitrógeno juegan un papel muy importante para el crecimiento del microorganismo. Basak y Majumdar (1973) analizaron diferentes fuentes de carbono observándose un efecto mayor sobre la producción de kanamicina con dextrina, almidón soluble y D-galactosa. También describen en su trabajo que el uso de alcoholes como sorbitol, butanol e inositol provocan una producción de kanamicina muy baja. Como fuentes de nitrógeno, especialmente como precursores, analizan el efecto de los aminoácidos como L-ácido glutámico, DL- alanina, L-histidina, provocando una síntesis de 570 mcg /ml. Además encontraron que no hay una relación directa entre el crecimiento del microorganismo y la síntesis del antibiótico. Los filamentos del crecimiento, tienden a crear altas viscosidades en el caldo de producción, implicando la transferencia de oxígeno. El valor de pH juega un papel importante para la síntesis de kanamicina, porque si el pH del medio de producción se acidifica, entonces la síntesis de kanamicina disminuye; recomendando un pH óptimo de 8.0 ya que todos los aminoglucósidos son más activos en medio alcalino.(5)

Umezawa et al.(1957) estudiaron las fuentes de carbono para la producción de kanamicina en un medio complejo y reportaron que la glucosa, maltosa, dextrina, almidón, lactosa y sacarosa son las mejores fuentes de carbono para Streptomyces kanamyceticus; aunque con la

desventaja de una represión catabólica por parte de la glucosa, que ocasiona una disminución drástica sobre el rendimiento. Analizando lo anterior se puede entender con mayor claridad la importancia que tiene la concentración de los componentes de un medio de producción por fermentación, siendo un factor primordial; porque, en algunos casos, aunque se tengan los nutrientes más importantes para un microorganismo productor sino se cuenta con las concentraciones óptimas se pueden inhibir ó estimular la producción del metabolito secundario.

El estudio de la síntesis de antibióticos usualmente involucra la búsqueda de un medio óptimo para la producción. La manera más usual es haciendo un estudio sistemático de compatibilidad de un número largo de fuentes de carbono, nitrógeno y iones metálicos (sales inorgánicas), para la formación del compuesto de interés.

4.8 FUENTES NUTRICIONALES IMPORTANTES PARA Streptomyces kanamyceticus

La designación de un medio de cultivo para el crecimiento de Streptomyces kanamyceticus y la producción de kanamicina "A", es un paso clave que asegura el éxito del proceso de fermentación, ya que los nutrientes del medio deben de cumplir con los requerimientos elementales que suministran la energía apropiada para el crecimiento celular y síntesis del antibiótico. Por tal motivo es necesario estudiar el efecto de los componentes del medio de cultivo para la producción de kanamicina.(28)

En términos generales la kanamicina se produce preferentemente en medio con fuentes de:

4.8.1 Nitrógeno orgánico.- Suministra al microorganismo, péptidos aminoácidos necesarios para su crecimiento. Entre las materias primas que sirven como fuente de nitrógeno están.

1. Extracto de carne
2. Harina de soya
3. Peptona de caseína
4. Extracto de levadura
5. Licor de cocimiento de maíz (CSL)
6. Ácido glutámico

4.8.2 Carbono.- Este constituye la fuente energética del microorganismo. Las fuentes de carbono que pueden ser utilizadas preferentemente son:

1. Almidón
2. Dextrina
3. Glucosa
4. Sacarosa
5. Maltosa
6. Lactosa
7. Glicerol

4.8.3 Sales minerales Estimulan el crecimiento, interviniendo en los procesos enzimáticos como cofactores, entre los más conocidos para la producción de kanamicina están:

1. Sulfato de magnesio
2. Fosfato de potasio
3. Carbonato de calcio
4. Cloruro de sodio
5. Cloruro de potasio (8,14,15)

5.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas al que nos enfrentamos en la producción de antibióticos es el no contar con un medio óptimo de cultivo que asegure el éxito del proceso de fermentación, ya que los nutrientes del medio deben cumplir con los requerimientos elementales que suministren la energía apropiada para el crecimiento de Streptomyces kanamyceticus y la síntesis de kanamicina.

Es necesario, optimizar el medio de cultivo de Streptomyces kanamyceticus para la producción de kanamicina. En donde se estudien los componentes del medio de producción de KANAMICINA que pudiera afectar a la misma.

Por tal motivo, se plantea una serie de experimentos en los cuales se toma como base el medio de producción basal, al cuál se le harán modificaciones en las concentraciones de algunos componentes.

Así mismo, se estudiarán otras materias primas de bajo costo que incrementen la producción de kanamicina.

Para este estudio, se diseñan experimentos multifactoriales que permiten encontrar rápidamente las concentraciones óptimas de los componentes y de otras materias primas para obtener el máximo rendimiento en la producción del metabolito.

El diseño multifactorial se basa en arreglos ortogonales para experimentos multifactoriales fraccionados. Se realizan experimentos a 3 ó 2 niveles para conocer el efecto cuadrático y lineal de las diferentes variaciones en la producción de kanamicina sobre la influencia en la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, principalmente

5.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener un medio de cultivo mejorado para la producción de kanamicina partiendo de un medio basal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno sobre el rendimiento de producción de kanamicina.

Obtener un medio de cultivo con nutrientes de bajo costo y fácil de adquirir.

5.2 HIPÓTESIS

La kanamicina es un antibiótico aminoglucósido, producido por Streptomyces kanamyceticus. La producción del mismo, como cualquier otro metabolito secundario, se encuentra afectado por la presencia y concentración de algunos componentes del medio de cultivo.

A partir de las diferentes combinaciones de los componentes y concentraciones de un medio basal y con una cepa mutante de Streptomyces kanamyceticus permitir el mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de kanamicina, con rendimientos superiores a los alcanzados en el medio basal.

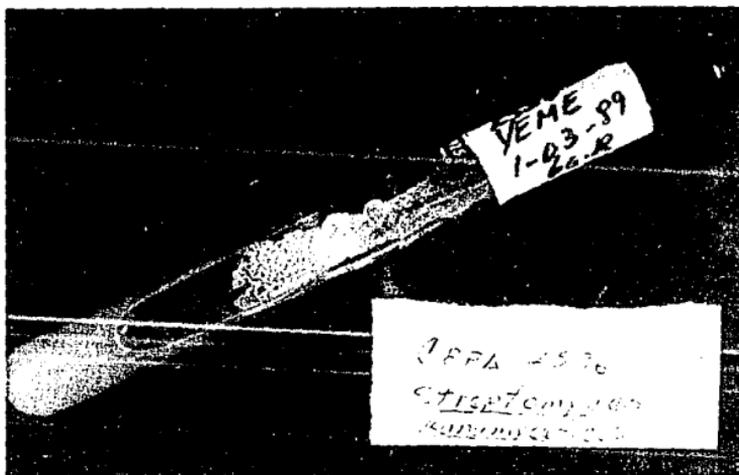
6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MICROORGANISMOS

Cepa mutante de Streptomyces kanamyceticus aislada en los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial LANFI. (Fig. 2)

Cepa de Staphylococcus aureus ATCC-6538-P, utilizada como microorganismo de prueba para la cuantificación de kanamicina.

FIG. 2
DESARROLLO DE LA CEPA
MEJORADA UTILIZADA EN MEDIO YEME



6.2 MEDIOS DE CULTIVO

6.2.1 Medio de conservación - Yeme.

COMPONENTES	g/l
Almidón	4.00
Extracto de levadura	4.00
Extracto de malta	10.00
Agar	20.00

El medio se ajusta a un pH de 7.2-7.4 y se somete a esterilización a 121°C por 20 min. Con este medio se preparan tubos de agar inclinados para mantener la cepa mutante de Streptomyces kanamyceticus.

6.2.2 Medio de Inóculo PYG.

COMPONENTES	g/l
Peptona	5.00
Extracto de levadura	5.00
Glucosa	10.00
N-Z amina	1.00
Cloruro de sodio	5.00

El medio se ajusta a un pH de 7.0 y se somete a esterilización a 121° C por 20 min.

6.2.3 Medio de producción basal.

COMPONENTES	g/l
Almidón	20.00
Glucosa	5.00
Harina de soya	12.00
Licor de cocimiento malz (CSL)	3.00
Sulfato de magnesio	0.50
Cloruro de sodio	3.00
Cloruro de potasio	0.50
Carbonato de calcio	3.00
Fosfato mono básico de potasio	1.00

Se ajustan a un pH entre 7.2 y 7.4, se someten a esterilización a 121°C por 20 min.

6.2.4 Medio No. para antibióticos marca Merck o Blóxon.

COMPONENTES	g/
Peptona	6.00
Extracto de levadura	3.00
Extracto de carne	1.50
Glucosa	1.0
Agar	15.00
Digerido pancreático de caseína	4.00

6.2.3 Preparación del precultivo (Inóculo)

Una vez esterilizado el medio PYG es inoculado con la cepa mutante de Streptomyces kanamyceticus. Se introduce a una incubadora marca New Brunswick a 29°C y 300 r.p.m. durante 48 hrs. (Fig. 3).

6.3 FERMENTACIÓN A NIVEL MATRAZ (PRODUCCIÓN)

Se inocula el precultivo con el 5% de volumen del medio de producción y se incuban a 29°C, con una agitación de 400 r.p.m. por siete días (168 hrs). (Fig. 4).

6.4 PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LOS MEDIOS DE PRODUCCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE KANAMICINA

De cada muestra se toma 1 ml. del caldo de fermentación en un tubo para centrifuga, se agrega 1 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N, y se agita en un vortex a alta velocidad por 1 minuto. Se centrifuga a 4500 r.p.m., por 20 min. Con ayuda de una pipeta pasteur se separa el sobrenadante de los sólidos sedimentados. Se determina la concentración de kanamicina en el sobrenadante del caldo de fermentación por el método de valoración microbiológica. (Fig. 5).

6.5 DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE KANAMICINA.

6.5.1 Material.

- Papel analítico en círculos de 0.6 mm. de diámetro Watman AA.
- Cajas petri de vidrio 20 x 100 mm.
- Solución salina 0.85% de cloruro de sodio.
- Solución patrón de kanamicina 1 mg/ml.
- Soluciones diluidas tipo de kanamicina:

T1= 6.4 mcg/ml.
T2= 8.0 mcg/ml.
T3= 10.0 mcg/ml.
T4= 12.5 mcg/ml.
T5= 15.6 mcg/ml.

FIG. 3. PREPARACION DEL PRECULTIVO

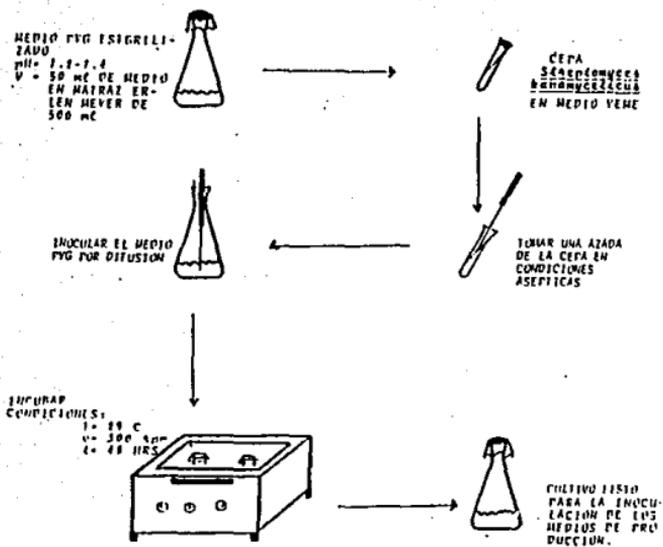


FIG. 4. FERMENTACION A NIVEL INDUSTRIAL

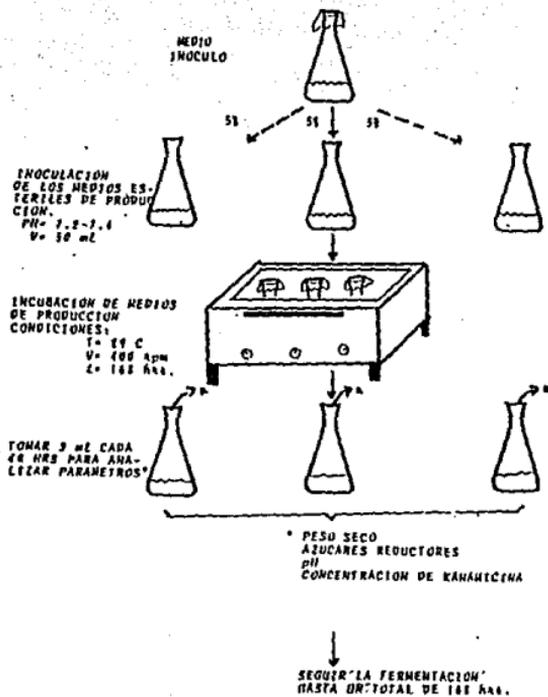
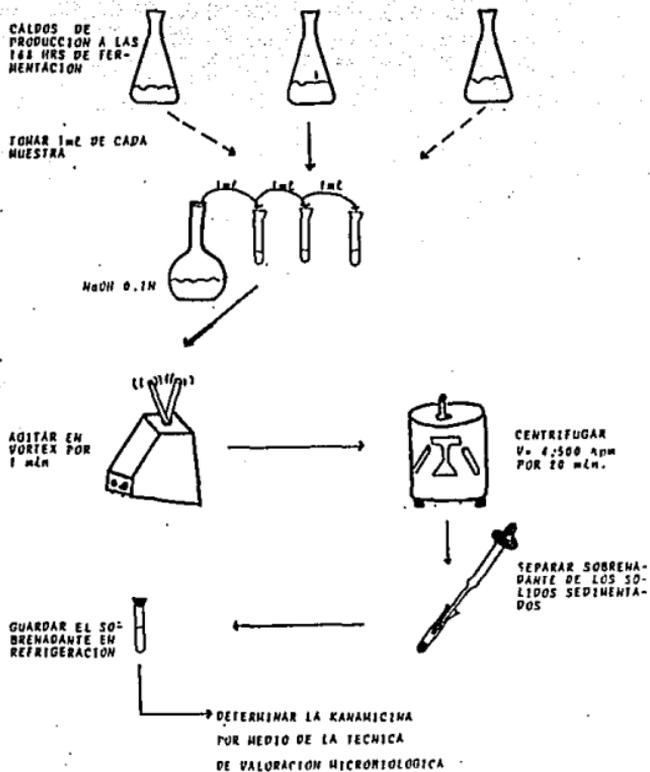


FIG 5. PREANÁLISIS DE MUESTRAS



6.5.2 Método.

6.5.2.1 Conservación de Staphylococcus aureus.

El microorganismo de prueba se conserva en tubos de agar inclinado con 10 ml. de medio No 11 para antibióticos; que se conserva a una temperatura de 4°C hasta utilizarlos.

6.5.2.2 Preparación de la suspensión del microorganismo de prueba.

Los cultivos se resiembran cada 28 días y se incuban a 32°C por 24 hrs. Una vez crecido el organismo, se prepara una suspensión; se lava con 3 ml. de solución salina estéril, que posteriormente se diluye hasta 60 ml. Con esta suspensión se prepara la capa siembra de las placas de prueba. Esta suspensión se conserva en refrigeración durante una semana.

6.5.2.3 Preparación de la solución patrón y soluciones de referencia.

Se prepara una solución patrón de kanamicina a una concentración de 1 mg/ml.; esta solución se mantiene sin alteración a 4°C por un mes, después de este tiempo no se deber usar. La preparación de las soluciones T1, T2, T3, T4 y T5 se realiza como sigue:

A. Se toman 10 ml. de la solución patrón de kanamicina y se aforan 100 ml. con agua destilada y recién esterilizada.

B. De esta solución se toman:

- 6.40 ml. para T1
- 8.00 ml. para T2
- 10.00 ml. para T3
- 12.50 ml. para T4
- 15.61 ml. para T5

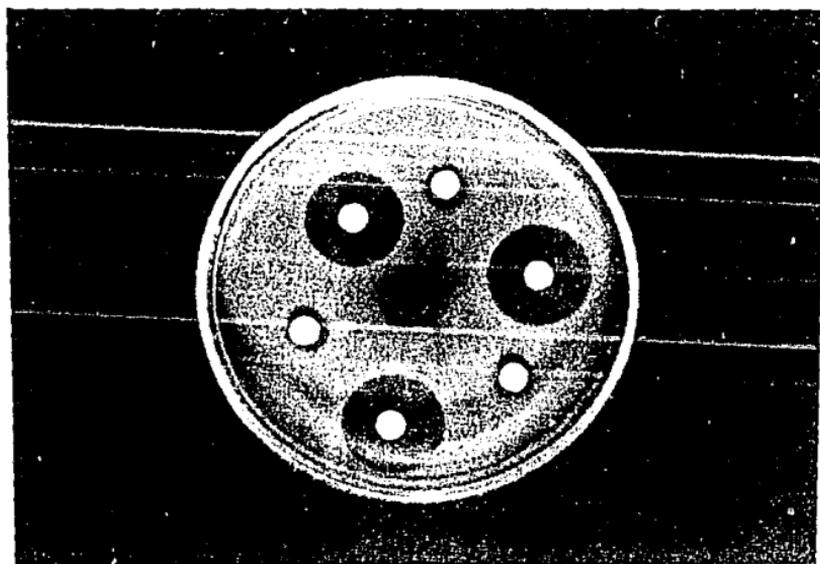
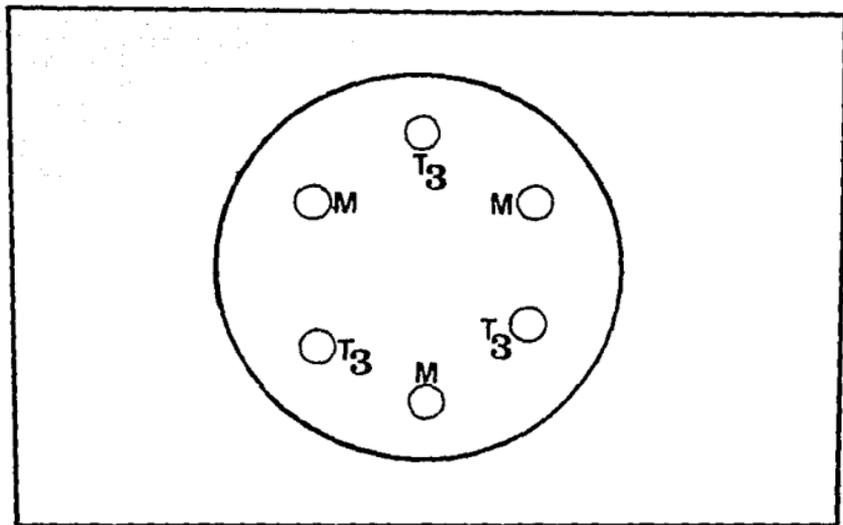
Cada una se afora a 100 ml. con agua destilada y recién esterilizada.

6.5.2.4 Preparación de las placas

Las placas se preparan con una capa base de 11 ml. de medio No 11 para antibióticos, que se agregan a cajas petri estériles, una vez solidificada se aplica sobre ella una capa semilla de 4 ml. de medio No 11, previamente inoculado con 15% v/v de la suspensión de Staphylococcus aureus ATCC-6538-P que se distribuye uniformemente sobre la superficie.

Una vez solidificadas, se colocan 6 papeles filtro circulares en forma radial sobre las placas (Fig. 6). Alternadamente se les aplica 25 microlitros de muestra problema ó solución diluida T3.

FIG 6. PREPARACION DE PLACAS



En la elaboración de la curva estándar se utilizan 8 cajas, 2 para cada solución diluida tipo, excepto para la solución media T3, con la cual se llenan tres círculos de cada caja, otros tres con T1, T2, T4, ó T5. De esta manera hay 24 zonas de inhibición, 6 para cada una de las soluciones de referencia.(punto 11.2)

Estas placas se incuban entre 32 y 35°C por 16-24 hrs, se miden los diámetros de las zonas de inhibición desarrollada sobre el medio. (Fig. 6)

6.5.2.5 Curva de calibración

La curva de calibración se construye con los promedios de cada una de las 4 series formadas por placa, los 3 diámetros de las zonas de inhibición de cada una de las soluciones de referencia (T1, T2, T4, T5), también se promedian los 12 diámetros de las zonas de inhibición de la solución T3, correspondiente a las 4 series y el promedio obtenido es la base para la corrección.

Con los diámetros corregidos de las zonas de inhibición y las concentraciones del antibiótico respectivo, en mcg/ml., se traza la curva tipo en papel milimétrico, anotándose en el eje de las abscisas los diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida T3 y las concentraciones conocidas del antibiótico, en las ordenadas.

La curva tipo se traza a través de estos puntos o bien se unen los puntos correspondientes a las zonas de inhibición de diámetro más alto y más bajo obtenidas por medio de las siguientes ecuaciones:

$$A = \frac{3e + 2d + c - a}{5} \quad B = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

donde:

A = Es el diámetro calculado en milímetros, para la zona de inhibición de la solución diluida de mayor concentración (T5).

B = Es el diámetro calculado en milímetros, para la zona de inhibición de la solución diluida de menor concentración (T1).

c = Es el diámetro promedio en milímetros de las zonas de inhibición de la solución diluida de concentración media (T3).

a,b,d,e = Son los diámetros promedio corregidos en milímetros de las zonas de inhibición de las soluciones diluidas T1, T2, T4 y T5.

6.5.2.6 Determinación de la concentración de kanamicina en las muestras problema (determinación gráfica).

Para determinar la potencia de las muestras, se promedian los diámetros de las 3 zonas de inhibición de la placa y se interpolan en la curva standard, se leen las concentraciones correspondientes a los diámetros de las zonas de inhibición.

Los resultados se expresan como mg de kanamicina por litro de caldo de fermentación.(27).

En el apéndice se muestra un ejemplo de la determinación de kanamicina así como la elaboración de la curva standar.

6.6 DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR

6.6.1 Peso Seco.

Las muestras del caldo de fermentación se filtran al vacío utilizando papel Whatman No 42 previamente llevado a peso constante por 5 hrs a $90 \pm 5^\circ\text{C}$. Después, el papel con el micelio ya filtrado, es secado por 24 hrs. a $90 \pm 5^\circ\text{C}$ Transcurrido ese tiempo, son llevados a un desecador por una hora y pesados en una balanza analítica.

6.6.2 Ensayo microscópico.

Con ayuda de una micropipeta con boquilla estéril se toman 50 microlitros de muestra, se colocan sobre un portaobjetos y se observa en un microscopio óptico estudiando cualitativamente el desarrollo y crecimiento del microorganismo.

6.6.3 Determinación de pH.

En un potenciómetro, marca Coming el pH se mide directamente a las muestras del medio de producción.

6.6.4 Determinación de azúcares reductores

Soluciones:	%
A Sulfato de cobre pentahidratado	6.93
B $\text{C}_4\text{H}_4 \text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$	3.46
+ Hidróxido de sodio	1.00

C	Yoduro de potasio	30.00
	+	
	0.3 ml. Hidróxido de sodio 1N	
D	2.38 ml. de Ácido sulfúrico CONC.	2.38
E	Solución de almidón	1.00

*** Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado**

1. A 1 ml. de muestra completa de caldo de fermentación se agregan 0.5 ml. de ácido clorhídrico 6N y se completa el volumen a 5.5 ml. con agua destilada. Se hidroliza a 120° por 15 minutos. Se deja enfriar y se agregan 0.5 ml. de hidróxido de potasio 6N (para neutralizar la reacción).
2. Se realiza la curva patrón del mismo modo con 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 ml. de una solución stock de 30 g/l de dextrina.
3. En un matraz de 250 ml. se adicionan 20 ml. de agua destilada con 10 ml. de la solución A, más 10 ml. de la solución B y piedras de ebullición. Se agregan las muestras previamente hidrolizadas y se calientan a ebullición por 3 min, se deja enfriar y se agregan entonces 10 ml. de la solución C y 10 ml. de la solución D.
4. Las muestras se titulan con tiosulfato de sodio 0.1 N, agregando 2 ml. de la solución de almidón después de un ligero viraje. Seguir titulando cuidadosamente hasta el vire de un tono azul intenso.
5. La determinación de azúcares, se realiza por medio de un regresión lineal cuya ecuación la determina las concentraciones conocidas de la dextrina y la cantidad de tiosulfato que se utilizó en la titulación.
6. Los resultados se expresan en gramos por litro.

7.- RESULTADOS.

7.1 ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA DE VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE KANAMICINA.

Para la cuantificación de kanamicina de los experimentos realizados en este trabajo se eligió el método convencional de cilindro placa reportado en la USP XX.

Este método se modificó y se adaptó debido a que por la complejidad del medio de cultivo se dificultaba la difusión del antibiótico y la toma de muestras por la alta viscosidad.

En esta primera parte de el trabajo se analizaron cualitativamente los puntos que se mencionan brevemente a continuación:

7.1.1 Tipo de reservorio (para la cuantificación del antibiótico).

Para este análisis se utilizaron muestras de caldos de fermentación de Streptomyces kanamyceticus y soluciones de kanamicina de referencia de la S.S.A.

Penicilindros. (Ver Determinación de la Potencia de Kanamicina).

Se sigue el mismo método, pero en vez de círculos de papel filtro se usan penicilindros, los cuales se esterilizan y se colocan con ayuda de un colocador de penicilindros sanitizado, sobre la placa con base siembra, se agregan a cada uno, con ayuda de una pipeta estéril las soluciones problema y la solución de referencia T3. Incubar a 37°C por 24 hrs. y analizar los resultados.

Pocitos.

Hacer una suspensión de medio N° 11 para antibióticos con el 1% de la suspensión del germen de prueba. Vaciar 21 ml. a cada caja petri y dejar solidificar. Hacer pocitos con un tubo estéril especial y agregar en cada pocito las muestras problema y la muestra de referencia (T3). Incubar a 32°C por 24 hrs. y analizar los resultados obtenidos.

Los resultados se presentan en la tabla 1.

TABLA 1
EFECTIVIDAD DE TRES TIPOS DIFERENTES DE RESERVORIO PARA LA DETERMINACIÓN DE KANAMICINA "A".

TIPO DE RESERVORIO	RESULTADOS
PENICILINDROS	1. Los halos de inhibición son amorfos y poco nítidos, dificultando la determinación de Kanamicina "A". 2. Difícil manipulación.
CÍRCULOS DE PAPEL FILTRO	1. Halos de inhibición claros 2. Fácil su manipulación
ORIFICIO SOBRE AGAR	1. Método cualitativo 2. Poco preciso para cuantificar

7.1.2 Factores que afectan el halo de inhibición.

Microorganismo de prueba.

Se probaron cepas nuevas del microorganismo de prueba (Staphylococcus aureus) ATCC-6538P.

Densidad de siembra.

El microorganismo de prueba se mantiene en agar inclinado que ha sido inoculado con 24 hrs de anticipación (Ver Determinación de la Potencia de Kanamicina). Se hacen suspensiones del germen de prueba ajustándolas hasta obtener un 20, 25, 30, 35, y 40% de transmitancia, a una longitud de onda de 580 nm. Se hacen valoraciones microbiológicas con la solución patrón T3.

Espesor de medio base.

Se refiere a la capa de agar que está en la base de la caja petri y que sirve como apoyo para la capa de agar siembra inoculado con la suspensión del microorganismo de prueba. Según el método convencional deben de ser 21, pero por la cantidad de muestras analizadas se gastaba mucho medio No 11 para antibióticos. Así que en vez de 21 ml. se agregaron 11 ml., observándose que no hay ningún efecto en el tamaño del halo de inhibición.

Volumen requerido en los medios de papel filtro.

Agregar a 6 círculos de papel filtro esterilizados 15 micro litros de T3 con ayuda de una micro pipeta con punta estéril. Hacer los mismos pasos, pero con volúmenes de 20, 25, y 30 microlitros, dando un total de 24 círculos de papel filtro. Las muestras problema se analizan de igual manera. La cantidad requerida óptima se observa directamente en los círculos de papel filtro, es decir que no quede tan húmedo que se derrame sobre la superficie, donde se colocan los círculos (base de vidrio sanitizado), ni tan seco que no permita la difusión del antibiótico (por la baja concentración). Así el volumen requerido será aquél que deje el papel húmedo completamente. (tabla 2)

Tiempo de prodifusión.

Se someten 2 cajas petri que contienen los círculos de papel filtro listas para incubarse, a una Temperatura de 4°C por 1hr, otras por 2 hrs, y por último a 3hrs, después de ese tiempo se colocan las cajas en la estufa de incubación. Observar el efecto en el diámetro del halo de inhibición.

Preanálisis de las muestras de los caldos de fermentación.

Se prueban concentraciones de 1.0 N, 0.5 N y 0.1 N de hidróxido de sodio con el mismo método que en el tratamiento de las muestras. El efecto se observa en el diámetro del halo de inhibición, (tabla 2).

Efecto de la solución reguladora.

Preparar las soluciones de la curva estandar o patrón como en la Técnica de Determinación de Kanamicina (con agua destilada y esterilizada).

Preparar las mismas soluciones pero en lugar de agua usar solución amortiguadora de fosfatos 0.1N (16.73G de K_2HP_4 y 0.523g de KH_2PO_4) en 1 lt. agua destilada y ajustar con hidróxido de potasio a pH = 8.0.

La solución reguladora de fosfatos tiene un efecto negativo sobre la difusión del antibiótico afectando directamente el tamaño del halo de inhibición, por lo que se recomienda usar agua destilada y esterilizada para evitar interferencias.

En la tabla 2, se muestra un resumen de las condiciones más adecuadas para la cuantificación de kanamicina por valoración microbiológica que se obtuvieron en este estudio

TABLA 2.
CONDICIONES MAS ADECUADAS PARA LA TÉCNICA

MÉTODO ELEGIDO SEGÚN TÉCNICA	RESERVORIO SOBRE PAPEL FILTRO
VOLUMEN NECESARIO DE MUESTRA Y DE REFERENCIA PARA UNA COMPLETA DIFUSIÓN SOBRE EL AGAR.	25 MICRO LITROS
TEMPERATURA DE INCUBACIÓN RECOMENDADO	37 ° C
PRETRATAMIENTO RECOMENDADO EN LOS CALDOS DE FERMENTACIÓN.	TRATAMIENTO CON HIDRÓXIDO DE SODIO 0.1 N
SOLVENTE UTILIZADO TANTO EN MUESTRAS DE FERMENTACIÓN Y MUESTRAS DE REFERENCIA Y CURVA TIPO	AGUA DESIONIZADA Y ESTÉRIL

De acuerdo con las observaciones realizadas en cuanto al tamaño, forma y nitidez del halo de inhibición los efectos que se consideran más importantes y que se deben tomar en cuenta para la valoración microbiológica en placa son los siguientes:

1. Microorganismo de prueba
2. Densidad de siembra
3. Espesor del medio base
4. Volumen específico de estandar y muestra problema
5. Tiempo de predifusión
6. Efecto de la solución reguladora

7.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE KANAMICINA

Una vez que ya se contaba con un método para la cuantificación de kanamicina, se procedió al estudio de mejoramiento del medio de cultivo.

Primeramente se probaron seis medios de producción (tabla 3) que según la literatura (14) son productores de kanamicina. Estos medios se sometieron a fermentación a una temperatura T=

29°C, un pH = 7.0-7.2 una velocidad de agitación de 300 r.p.m., en un tiempo de 168 hrs. de los cuales solo los medios II, IV y V permitieron identificar kanamicina por la presencia de halos de inhibición de crecimiento de Staphylococcus aureus, como se muestra en la tabla 4.

TABLA 3.
MEDIOS DE PRODUCCIÓN RECOMENDADOS SEGÚN LA LITERATURA.

MEDIO I	% (p/v)	MEDIO II	% (p/v)	MEDIO III	% (p/v)
ALMIDÓN	1.00	ALMIDÓN	2.00	GLUCOSA	1.00
HARINA DE SOYA	2.00	MALTOSA	2.00	EXTRACTO DE CARNE	0.50
CLORURO DE SODIO	0.30	HARINA DE SOYA	3.00	PEPTONA	1.00
CLORURO DE POTASIO	0.05	NITRATO DE SODIO	0.20	CLORURO DE SODIO	0.30
NITRATO DE SODIO	0.30	CARBONATO DE CALCIO	0.20	AGUA DESTILADA	cbp
SULFATO DE MAGNESIO	0.02	AGUA DESTILADA	cbp		
AGUA DESTILADA	cbp				
MEDIO IV	% (p/v)	MEDIO V	% (p/v)	MEDIO VI	% (p/v)
ALMIDÓN	2.00	ALMIDÓN	2.00	SACAROSA	1.00
HARINA DE SOYA	1.20	PEPTONA	0.30	HARINA DE SOYA	1.20
CLORURO DE SODIO	0.30	HARINA DE SOYA	1.00	CLORURO DE POTASIO	0.50
CLORURO DE POTASIO	0.05	NITRATO DE SODIO	0.30	SULFATO DE MAGNESIO	0.05
GLUCOSA	0.50	CLORURO DE POTASIO	0.05	CLORURO DE SODIO	0.30
SULFATO DE MAGNESIO	0.05	SULFATO DE MAGNESIO	0.05	FOSFATO DE POTASIO	0.10
LICOR COC. MAÍZ (CSL)	0.30	CLORURO DE SODIO	0.30	CARBONATO DE CALCIO	0.20
CARBONATO DE CALCIO	0.30	AGUA DESTILADA	cbp	AGUA DESTILADA	cbp
FOSFATO DE POTASIO	0.10				
AGUA DESTILADA	cbp				

TABLA 4
MEDIOS PRODUCTORES DE KANAMICINA

MEDIOS DE PRODUCCIÓN	PRODUCCIÓN DE KANAMICINA
I	S/D
II	+
III	S/D
IV	+++
V	+
VI	S/D

S/D no hubo producción; + poca producción; +++ producción significativa

En la tabla se puede observar que el medio IV fue el que produjo más kanamicina cualitativamente bajo estas condiciones de temperatura y agitación mencionadas en el primer párrafo, tomándose éste como "medio basal".

TABLA 5. COMPOSICION DE MEDIOS ANALIZADOS

COMPONENTES	M E D I O S (g/l)															
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
A. ALMIDON	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
B. GLUCOSA	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0	5.0	5.0	5.0
C. HARINA SOYA	6.0	6.0	12.0	12.0	6.0	6.0	12.0	12.0	6.0	6.0	12.0	12.0	6.0	6.0	12.0	12.0
D. CSL	1.5	3.0	1.5	3.0	1.5	3.0	1.5	3.0	1.5	3.0	1.5	3.0	1.5	3.0	1.5	3.0
E. MgSO4	1.3	1.3	5.0	5.0	5.0	5.0	1.3	1.3	1.3	1.3	5.0	5.0	5.0	5.0	1.3	1.3
F. K2HPO4	1.0	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0	1.0	1.0	5.0	5.0	1.0	1.0	1.0	1.0	5.0	5.0
G. CaCO3	0.5	2.5	0.5	2.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	0.5	2.5	2.5	0.5	2.5
H. NaCl	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
KCl	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

Los medios se aforan a 100 ml con agua desmineralizada y se esterilizan

* CSL = Licor de cocimiento de maíz

TABLA 6. DISEÑO Y RESULTADOS DEL EFECTO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO BASAL PARA LA PRODUCCION DE KANAMICINA

DISEÑO L16

FACTORES	NIVELES DE LOS FACTORES							RESULTADOS	
	ALMIDON	GLUCOSA	HARINA DE SOYA	CSL	MgSO4	K2HPO4	CaCO3	CONC. MAX KANAMICINA (ng/l)	HRS. DE FERMENTACION
MEDIOS									
I	1	1	1	1	1	1	1	-	-
II	1	1	1	2	1	1	2	14	120
III	1	1	2	1	2	2	1	23.8	72
IV	1	1	2	2	2	2	2	-	-
V	1	2	1	1	2	2	2	-	-
VI	1	2	1	2	2	2	1	6.3	168
VII	1	2	2	1	1	1	2	26.36	120
VIII	1	2	2	2	1	1	1	-	-
IX	2	1	1	1	1	2	1	-	-
X	2	1	1	2	1	2	2	-	-
XI	2	1	2	1	2	1	1	-	-
XII	2	1	2	2	2	1	2	20	120
XIII	2	2	1	1	2	1	2	-	-
XIV	2	2	1	2	2	1	1	-	-
XV	2	2	2	1	1	2	2	23.8	168
XVI	2	2	2	2	1	2	1	-	-

* Resultados obtenidos de 16 matraces por duplicado

Con el fin de observar el efecto de cada uno de los componentes del medio basal en un tiempo más corto se diseñó un experimento multifactorial utilizando Arreglos Ortogonales (ver anexo). Con base en un número de componentes del medio de cultivo se decidió por un arreglo ortogonal L_{16}^2 (tabla 6). Este diseño es para factores con dos niveles, es decir, dos concentraciones diferentes de un mismo componente del medio (efecto lineal). Así, con base en el diseño se prepararon 16 medios de producción cuyas concentraciones se pueden observar en la tabla 5. De acuerdo a la tabla 6, se puede observar que de los 16 medios solamente se detectó kanamicina en II, III, VI, VIII, XII y XV.

Se calcularon los efectos de cada uno de los factores y componentes (ver anexo), siendo los resultados los que se muestran a continuación:

TABLA 7.
EFECTO DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO BASAL

COMPONENTES	EFECTO	% EFECTO
HARINA DE SOYA	9.21	32.69
CARBONATO DE CALCIO	6.76	24.14
LICOR COC. MAÍZ (CSL)	5.96	21.29
ALMIDÓN	3.32	11.66
SULFATO DE MAGNESIO	1.76	6.29
FOSFATO DE POTASIO	0.81	2.89
GLUCOSA	0.18	0.64

* Efecto = ver apéndice
** % Efecto = ver apéndice

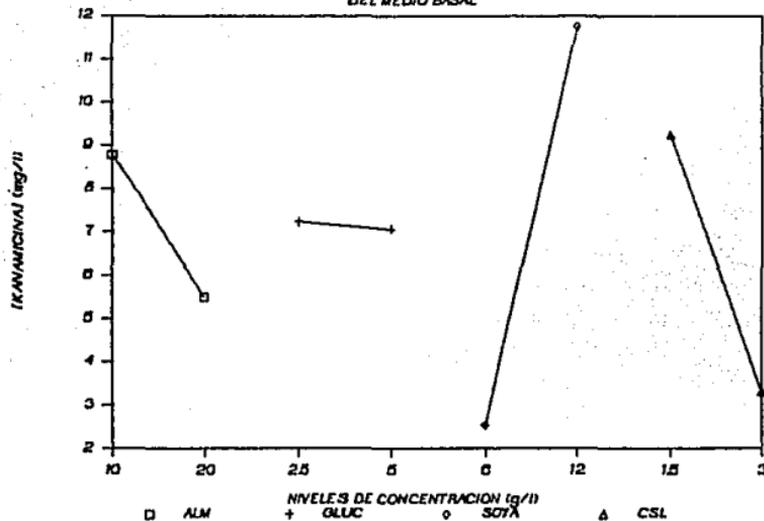
Los resultados se observan en la figura 7A y 7B y tanto el almidón como la glucosa, el licor de cocimiento de maíz, el sulfato de magnesio y el fosfato de potasio presentan un efecto negativo al aumentar la concentración de las mismas. Mientras que tanto la harina de soya como el carbonato de calcio presentan un efecto positivo al aumentar su concentración en el medio de cultivo.

TABLA 8.

COMPONENTES	MEDIO MEJORADO 1	
	MEDIO BASAL (MB) (g/l)	MEDIO MEJORADO (MM1) (g/l)
HARINA DE SOYA	12.00	12.00
CARBONATO DE CALCIO	3.00	2.50
CSL	3.00	0.50
ALMIDÓN	20.00	10.00
SULFATO DE MAGNESIO	0.50	1.25
FOSFATO DE POTASIO	1.00	1.00
GLUCOSA	6.00	2.50
CLORURO DE SODIO	3.00	3.00
CLORURO DE POTASIO	0.50	0.50

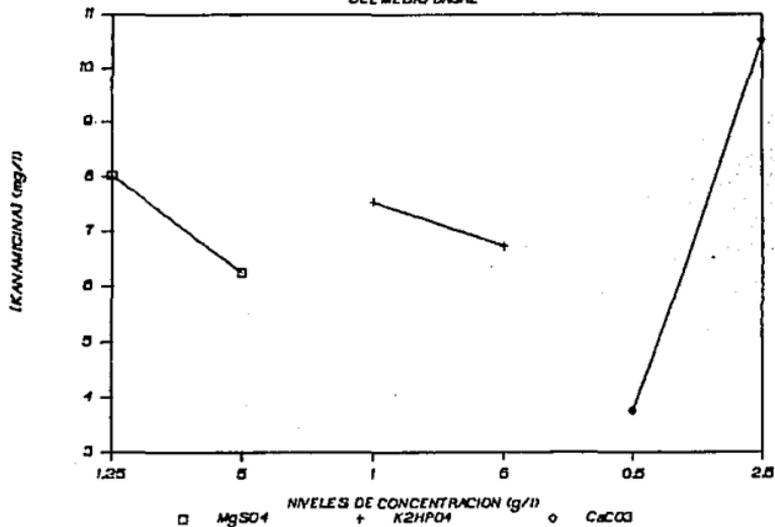
7A. EFECTO DE LOS COMPONENTES

DEL MEDIO BASAL



7B. EFECTO DE LOS COMPONENTES

DEL MEDIO BASAL



7.3 EFECTO DEL FOSFATO

El siguiente experimento se planteó con base en el anterior, es decir, se realizó otro diseño multifactorial con los cuatro primeros componentes que tuvieron un efecto más marcado como son la harina de soya, licor de cocimiento de maíz, carbonato de calcio y fosfato de potasio sobre la producción de kanamicina del experimento II. Este estudio consiste en un diseño experimental con tres niveles de concentración para cada componente con el objeto de determinar si el efecto es cuadrático ó lineal.

Las concentraciones de los demás componentes se mantienen constantes. Para este estudio se utilizó un DISEÑO A.O. $L_{19}(3^4)$.

TABLA 9.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN UTILIZADAS EN LOS CUATRO COMPONENTES
CON EFECTOS MAS MARCADOS SOBRE LA DE KANAMICINA.

FACTOR	NIVEL 1	NIVEL 2	NIVEL 3
A. HARINA DE SOYA	12.0	18.0	24.0
B. CSL	0.5	1.0	1.5
C. CARBONATO DE CALCIO	2.5	5.0	7.5
D. FOSFATO DE POTASIO	0.0	0.5	1.0

Ya preparados los medios se sometieron a fermentación encontrándose los siguientes efectos (tabla 10).

TABLA 10

EFECTO DE LOS PRINCIPALES PRODUCTORES DE KANAMICINA.

COMPONENTES	EFECTO *	% EFECTO **
HARINA DE SOYA	2.13	36.98
CSL	2.10	36.47
CARBONATO DE CALCIO	0.87	14.70
FOSFATO DE POTASIO	0.82	13.86

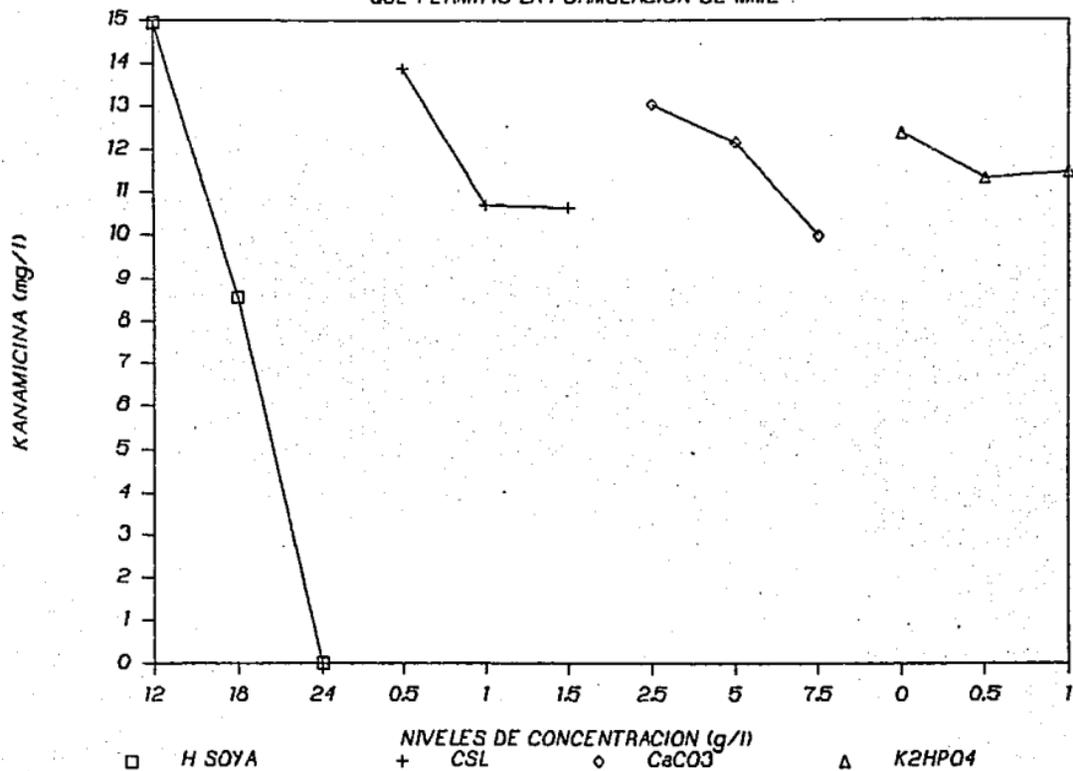
* Efecto = var apéndice

** % Efecto = var apéndice

En la figura 8 se observa que hay un efecto cuadrático, es decir hay un efecto potencial en la curvatura bajo 3 niveles. Se pudo confirmar que las concentraciones que se obtuvieron en el experimento II (MM1) tanto de harina de soya (12.0 g/l), carbonato de calcio (2.5 g/l) y licor de cocimiento de maíz (0.5 g/l), sus efectos son positivos. En el experimento II la harina de soya tuvo un efecto positivo al aumentar la concentración de 6 a 12 g/l, pero en este experimento al aumentar la concentración a 18 y 24 g/l, tuvo un efecto negativo, por lo que la concentración recomendada es de 12 g/l (fig. 8).

FIG 8. EFECTO DE CUATRO COMPONENTES

QUE PERMITIO LA FORMULACION DE MM2



En lo que al licor de cocimiento de maíz se refiere (CSL), en el experimento II tuvo un efecto positivo sobre la producción de kanamicina, al disminuir la concentración de 3 g/l a 1.5 g/l, en este experimento se bajó a 1.0 y 0.5 g/l, observando un efecto positivo a 0.5 g/l (fig. 8).

El carbonato de calcio tuvo un efecto positivo sobre la producción de kanamicina al aumentar su concentración de 0.5 g/l a 2.5 g/l. Al observar este efecto se aumenta la concentración a 5 y 7.5 g/l, pero el efecto resultó negativo, así que la concentración recomendada en este estudio es de 2.5 g/l.

Las concentraciones obtenidas hasta este momento coinciden con el experimento II, más no sucede lo mismo con el fosfato de potasio, ya que al ir disminuyendo su concentración de 1 a 5 g/l inicialmente en el experimento II hasta quitarlo por completo del medio se observa un efecto positivo sobre la producción de kanamicina, como se puede observar en la figura 8.

De este experimento se obtiene un nuevo medio mejorado 2 con la siguiente composición:

TABLA 11
MEDIO MEJORADO 2

COMPONENTES	MEDIO MEJORADO (NM2) (g/l)
ALMIDÓN	10.00
GLUCOSA	2.50
SULFATO DE MAGNESIO	1.25
CLORURO DE SODIO	3.00
CLORURO DE POTASIO	0.50
HARINA DE SOYA	12.00
CBL	0.50
CARBONATO DE CALCIO	2.50
POSFATO DE POTASIO	0.00

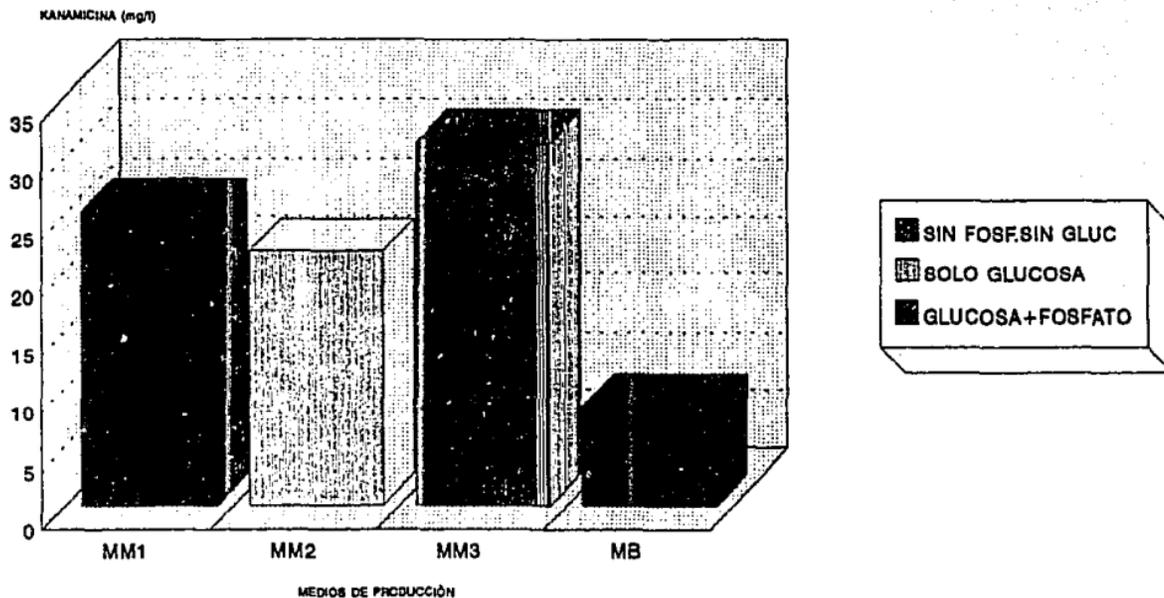
7.4 EFECTO DE LA GLUCOSA

De este experimento, nace una nueva hipótesis, pues según la literatura (12,19), puede haber una competencia de asimilación de nutrientes del mismo grupo, específicamente almidón y glucosa, pues la producción no empieza hasta que el microorganismo ha asimilado la glucosa, retrasando así la producción.

Por otra parte se sabe que la glucosa favorece el crecimiento de Streptomyces, pero tiene el inconveniente que baja el pH del caldo de producción durante la síntesis del antibiótico disminuyendo por lo tanto el rendimiento.

Por dichos motivos se retiró la glucosa del medio, y se realizó un nuevo experimento obteniéndose un incremento en la producción de 21.8 mg/l a 31.2 mg/l (figura 9), la glucosa

FIG. 9
EFECTO DEL FOSFATO Y GLUCOSA
SOBRE EL MEDIO MEJORADO 1 (MM1)



tiene un efecto negativo porque al quitarla del medio, favorece la producción de kanamicina. El nuevo medio mejorado 3 tiene la siguiente composición:

TABLA 12.
MEDIO MEJORADO 3.

COMPONENTES	MEDIO MEJORADO 3 (MMS) (g/l)
ALMIDÓN	10.00
SULFATO DE MAGNESIO	1.25
CLORURO DE SODIO	3.00
CLORURO DE POTASIO	0.50
HARINA DE SOYA	12.00
CSL	1.50
CARBONATO DE CALCIO	2.50

7.5 ESTUDIO DE OTRAS FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO

Los experimentos anteriores permitieron el mejoramiento del medio de cultivo que se tomó como base para iniciar los estudios de producción de kanamicina.

Sin embargo, los rendimientos de producción aún eran muy bajos por lo que se decidió probar otras fuentes de carbono y nitrógeno, componentes que presentaron un mayor efecto sobre la producción.

Con el fin de observar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se diseñó un estudio con base en un arreglo ortogonal $L_9(3^4)$.

En los experimentos anteriores se había obtenido una producción baja (31.2 mg/l); fue entonces cuando se empezaron a probar otras fuentes nutrientes que fueran de bajo costo pero importantes para la producción de kanamicina A. Estas fuentes son las que a continuación se describen:

I. FUENTES DE CARBONO

Almidón
Dextrina
Sacarosa

II. FUENTES DE NITRÓGENO

Licor de cocimiento de maíz
Harina de camarón
Nitrato de sodio

III. ÁCIDOS GRASOS

Girasol
Malz

Los demás componentes no sufren cambio alguno pues permanecen sus concentraciones constantes como en el MM3: Sulfato de Magnesio, Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio, Harina de Soya, y Carbonato de Calcio.

Empleando el diseño mencionado, se sometieron nueve medios de producción a fermentación cuya composición y concentraciones se describen en la tabla 13

TABLA 13.
COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN PARA EL ESTUDIO DE OTRAS FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO

FACTOR	FUENTE	COMPONENTE	M E D I O S									
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
A	CARBONO	ALMIDÓN	10.00			10.00				10.00		
		DEXTRINA		10.00			10.00				10.00	
		SACARINA			10.00				10.00			10.00
B	NITRÓGENO	CSL	1.50	1.50	1.50							
		H. CAZARÓN				1.50	1.50	1.50				
		NaNO ₂							1.50	1.50	1.50	
C	CARBONO	SIN ACEITE	0.00						0.00		0.00	
		AC. GIRASOL		8.00		8.00						8.00
		AC. MAIZ			8.00		8.00			8.00		
D	SALES Y DEMÁS	H. SOYA	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
		NaCl	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
	COMPONENTES	K ₂ S	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
		MgSO ₄	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
		CaCO ₃	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50

Se siguió la misma metodología (material y método) y, a lo largo del proceso de fermentación se fueron obteniendo las concentraciones de kanamicina, para obtener las concentraciones máximas de producción por medio. De los nueve medios sometidos a fermentaciones sólo tres obtuvieron valores significativos:

TABLA 14.
CONCENTRACIÓN DE KANAMICINA EN EL ESTUDIO DE OTRAS FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO.

MEDIOS	CONCENTRACIÓN MÁXIMA KANAMICINA * (mg/l)
I	0.00
II	220.00
III	0.00
IV	270.00
V	350.00
VI	0.00
VII	N/D **
VIII	0.00
IX	0.00

** N/D = concentración no calculable.

* Resultados por duplicado.

TABLA 15.

EFFECTO DE LOS COMPONENTES DEL ESTUDIO DE
OTRAS FUENTES DE CARBONO Y NITRÓGENO

COMPONENTES	EFFECTO *	% EFFECTO **
ALMIDÓN	73.33	8.73
DEXTRINA	208.66	24.60
SACAROSA	0.00	0.00
CSL	90.00	10.72
HARINA DE CAMARÓN	190.00	22.62
NITRATO DE SODIO	0.00	0.00
ACEITE DE GIRASOL	163.30	19.44
ACEITE DE MAÍZ	116.60	13.88

* Efecto = var apéndice

** Efecto = var apéndice

En la figura 10 se observan los resultados de este experimento. Tanto el almidón como la dextrina, el licor de cocimiento de maíz, la harina de camarón, aceite de girasol y aceite de maíz presentaron un efecto positivo sobre la producción de kanamicina, destacando el efecto de la harina de camarón, dextrina y aceite de girasol.

7.6 EFECTO DEL ÁCIDO GLUTÁMICO

En este experimento se intenta estudiar el efecto de un precursor con un amino ácido llamado ácido glutámico sobre la producción de kanamicina "A", con dos concentraciones diferentes MMA Y MMB.

TABLA 16.

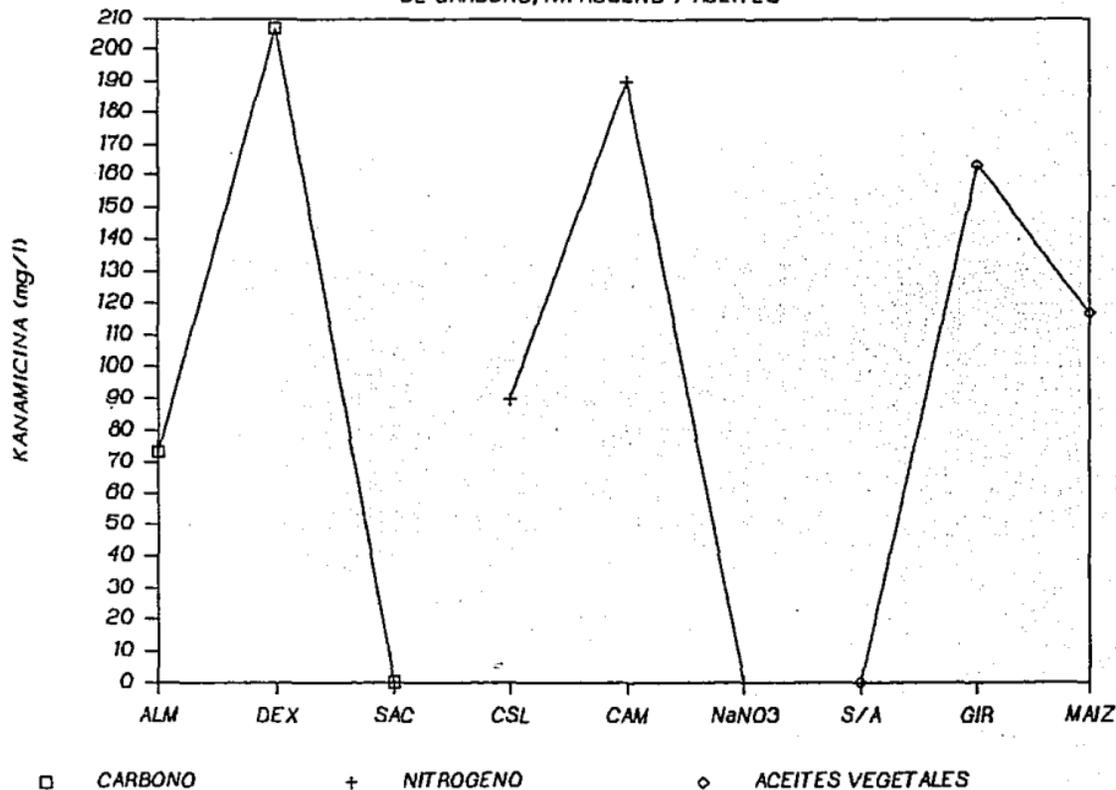
COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE PRODUCCIÓN.

COMPONENTES	MMA (g/l)	MMA (g/l)	MMB (g/l)
ALMIDÓN	10.00	10.00	10.00
GLUCOSA	2.50	2.50	2.50
SULFATO DE MAGNESIO	1.25	1.25	1.25
CLORURO DE SODIO	3.00	3.00	3.00
CLORURO DE POTASIO	0.50	0.50	0.50
HARINA DE SOYA	12.00	12.00	12.00
CSL	0.50	0.50	0.50
CARBONATO DE CALCIO	2.50	2.50	2.50
ÁCIDO GLUTÁMICO	0.00	2.00	4.00

Se sometieron a fermentación con el mismo método descrito en material y métodos.

FIG 10. ESTUDIO DE NUEVAS FUENTES

DE CARBONO, NITROGENO Y ACEITES

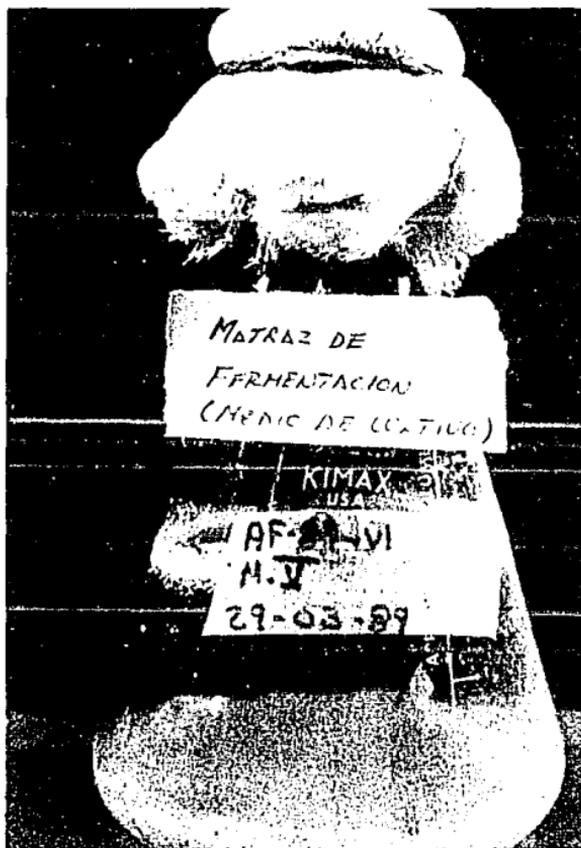


Los resultados se muestran en la tabla 17. El MM3 tuvo la concentración más alta. Este medio no tiene ácido glutámico; en cambio el MMA tiene 2 g/l de ácido glutámico y el MMB tiene 4 g/l, observándose un efecto negativo sobre la producción de kanamicina.

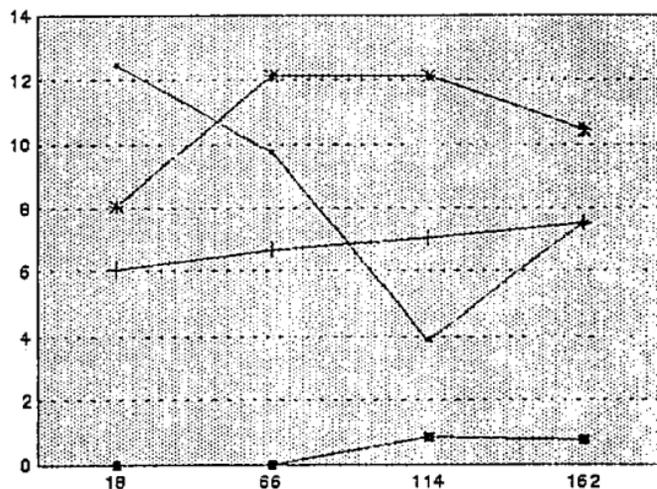
TABLA 17.
CONCENTRACIÓN MÁXIMA OBTENIDA

MEDIO	CONCENTRACIÓN MÁXIMA DE KANAMICINA* (mg/l)
MM3	28.50
MMA	15.26
MMB	13.60

* Resultados por duplicado



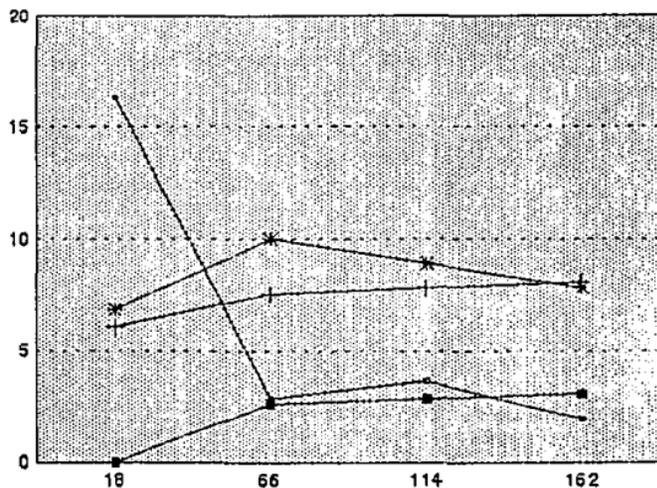
CINETICA DE PRODUCCION MB



AZUC. REDUC. (g/l)	—○—	12.5	9.75	3.9	7.5
pH	—+—	6.05	6.66	7.03	7.51
PESO SECO (g/l)	—*—	8.07	12.14	12.13	10.45
KANAMICINA (mg/l)*10	—■—	0	0	0.84	0.75

TIEMPO (HORAS)

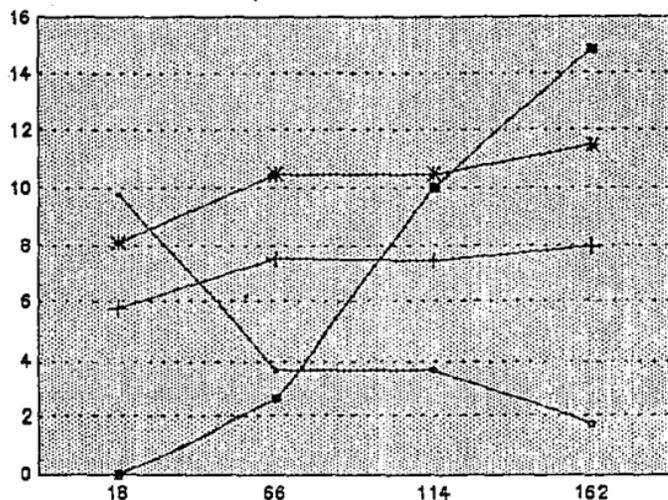
CINETICA DE PRODUCCION MM3



AZUC. REDUC. (g/l)	○	16.35	2.9	3.7	2
pH	+	6.05	7.46	7.78	8.05
PESO SECO (g/l)	*	6.79	10	8.9	7.79
KANAMICINA (mg/l)*10	■	0	2.7	2.9	3.12

TIEMPO (HORAS)

CINETICA DE PRODUCCION MM4



AZUC. REDUC. (g/l)	→	9.78	3.7	3.7	1.71
pH	+	5.76	7.51	7.47	7.97
PESO SECO (g/l)	*	8.1	10.5	10.5	11.46
KANAMICINA (mg/l)*10	■	0	2.6	10	14.84

TIEMPO (HORAS)

8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La determinación de **Medio Mejorado** para la producción de kanamicina partió de la elección del medio basal con mayor producción de kanamicina entre siete diferentes medios productores encontrados en la literatura (14), bajo ciertas condiciones de temperatura y agitación

Los medios se sometieron a fermentación. El halo con mayor diámetro, el cual es directamente proporcional a la concentración de kanamicina, se encontró en el **Medio IV** (ver tabla 3 y 4), razón por la cual se seleccionó como medio basal para iniciar su mejoramiento.

La valoración microbiológica se tomó como la más adecuada para la cuantificación de kanamicina porque es un método más exacto y adecuado a trabajos sistemáticos. Una reducción en la actividad microbiana pueden revelar cambios que no son detectados por métodos químicos y así la potencia o actividad de los antibióticos puede ser demostrada bajo condiciones apropiadas por medio del efecto inhibitorio en los microorganismos. La cuantificación de la kanamicina, a partir de la fermentación de los medios de producción, requiere una adaptación que diera valores reales de la concentración del antibiótico a lo largo del estudio.

Durante el proceso de adaptación de la técnica de valoración microbiológica de kanamicina se detectaron algunos factores que influyen en la de la cuantificación:

a. Tipo de reservorio. Los círculos de papel filtro resultaron ser los más convenientes por los siguientes motivos:

- Fácil manipulación.
- Facilidad para leer los halos de inhibición.
- Se observan círculos de inhibición claros y nítidos
- Se obtienen mejores resultados confiables.
- Rápida adsorción y fácil difusión.
- Fácil esterilización.

b. Factores que afectan el halo de inhibición.

- Volumen específico de muestra problema y standard necesarios para empapar y no chorrear el papel filtro.
- La temperatura de incubación de las cajas petri es importante porque incide en el tamaño del halo de inhibición sobre el que, posteriormente, se calcula la concentración de kanamicina.
- Realizar un pretratamiento a las muestras problemas de los matraces de producción, con el fin de eliminar toda la biomasa y compuestos con pesos moleculares grandes del caldo de fermentación, disminuyendo así la interferencia para la valoración microbiológica.

Con este pretratamiento de las muestras se pretende extraer toda la kanamicina presente en el medio, tanto la que se encuentra intra como extracelular.

- Se encontró que la solución amortiguadora referida en la USP XX, usada como disolvente para las soluciones requeridas con concentraciones conocidas (soluciones de referencia; T1, T2, T3, T4 y T5) afecta directamente el tamaño del halo de inhibición, caso que no ocurre cuando se utiliza únicamente agua destilada y esterilizada. Este fenómeno pudo ocurrir por alguna interferencia en la difusión del antibiótico en la capa siembra. (tabla 2.)

Los nutrientes de un medio de cultivo para la producción de cualquier metabolito deben cumplir con los requerimientos elementales que suministren la energía apropiada para el crecimiento de Streptomyces kanamyceticus y así la síntesis de kanamicina.

En este estudio se observa, con base en los resultados, que todos los componentes analizados presentan un efecto sobre la producción de kanamicina. Este efecto depende de la concentración a la que se adiciona al medio.

Así la **harina de soya**, el **carbonato de calcio**, el **licor de cocimiento de maíz (CSL)** y el **almidón** tienen un efecto más marcado sobre la producción de kanamicina; la harina de soya presenta mayor producción cuando se encuentra a una concentración de 12 g/l, el carbonato de calcio cuando es de 2.5 g/l, el almidón a 10 g/l y el licor de cocimiento de maíz a 1.5 g/l, como se puede observar en la gráfica 5

El efecto de una mayor producción de kanamicina, marcado por el **Carbonato de calcio** se debe a que el ión Ca^{++} estimula la enzima fosfatasa alcalina, compuesto importante para la síntesis de kanamicina; más aún, cuando está combinación con el sulfato de magnesio la actividad de la enzima aumenta (3).

En el caso de la **glucosa** se observa que la producción de kanamicina disminuye cuando es utilizada a 5 g/l y 2.5 g/l, provocando una represión catabólica.

La **glucosa**, al ser una excelente fuente de carbono y de energía para el crecimiento de Streptomyces kanamyceticus, ejerce un **Impacto negativo** sobre la producción de kanamicina (9). Este es llamado **represión catabólica** de la glucosa (30), debido al efecto represor que ejerce sobre el metabolito secundario, suprimiendo la formación del antibiótico, y provocan al parecer, la inhibición de la síntesis de las enzimas implicadas en la formación de antibióticos. (gráfica 3 y 5).

Otro efecto de la **glucosa** reportado por Basak (5) es que provoca una **acidés** del medio de producción, afectando directamente la síntesis de kanamicina.

El **fosfato de potasio** provoca una **disminución** en la producción de kanamicina y al quitarse del medio de producción, la concentración de kanamicina aumenta. Este efecto puede explicarse, según Basak y Majumdar (3), que el fosfato de potasio actúa como un **Inhibidor enzimático** tal y como se observó en el experimento III.

El **sulfato de magnesio** inicialmente se utilizó a una concentración de 0.5% en el medio basal (tabla 14) observándose que al aumentar su concentración a 1.25% la producción de kanamicina también registró un **incremento**.

Sin embargo, al aumentar la concentración al 5%, el efecto en la producción de kanamicina es negativo. Este efecto es debido a que el magnesio, aparte de ser un factor esencial para la energía metabólica, puede actuar como estimulante o inhibidor de las enzimas involucradas en la síntesis de kanamicina, dependiendo de su concentración. (11)

Hasta este momento, utilizando los componentes antes mencionados, se obtuvo una producción de 31.2 mg/l en comparación con la de 8.4 mg/l del medio basal (tabla 18).

Adicionalmente, con el fin de continuar incrementando la producción del antibiótico se buscaron otras fuentes de carbono y nitrógeno.

Al utilizarse la harina de camarón, se encontró que a una concentración de 1.5 g/l, tuvo un efecto muy significativo en la producción de kanamicina (gráfica 4). Este componente contiene glucosamina que actúa como un precursor, incrementando la síntesis de las enzimas involucradas en la síntesis de kanamicina (3,9).

La Dextrina resultó ser una excelente fuente de carbono para la formación de kanamicina, al agregarla al medio a una concentración de 10 g/l se obtiene un incremento en la producción (gráfica 4).

Al comparar el efecto de la dextrina con el almidón, se observa un efecto muy marcado por parte de la dextrina. La sacarosa utilizada en los medios de producción no reporta síntesis de kanamicina.

Como se observa en la tabla 13 se probaron también aceites de girasol y maíz como fuentes de carbono sobre la producción de kanamicina. El aceite de girasol a una concentración 8 g/l resulta tener un efecto más positivo para la síntesis del antibiótico. (fig. 10)

El nitrógeno inorgánico Nitrato de Sodio provocó un efecto negativo en la producción de kanamicina, el cual según Basak y Majumdar (3) es debido al gran efecto inhibitorio de la enzima fosfatasa alcalina, importante para la producción de kanamicina, afectando de esta manera la biosíntesis del antibiótico.

También se observó el efecto del aminoácido glutámico, que no es muy claro, según Basak y Majumdar (3), actúa como un precursor, pero en este estudio provocó una producción baja (15.25 mg/l) en comparación con el MM4 (148.4 mg/l) y aún con el MM1 (25.2 mg/l) (ver tabla 18). La acidificación del medio que provoca el precursor puede ser responsable, también, de la baja producción.

En síntesis, la producción de kanamicina, al igual que cualquier otro metabolito secundario, se ve afectada por la composición del medio y las concentraciones de cada uno de sus componentes. La composición del medio y las condiciones de cultivo afectan fuertemente la producción de kanamicina.

Consecuentemente este estudio permitió detectar cuales son los componentes más importantes en la producción de kanamicina bajo las condiciones ambientales establecidas que servirá como base para mejoramientos posteriores del medio de cultivo hasta alcanzar rendimientos que sean económicamente interesantes.

El análisis de factores ambientales como pH, velocidad de agitación, temperatura, y la respuesta de los microorganismos sobre peso seco y azúcares reductores permite el control total del proceso así como su escalamiento para su producción a nivel piloto. Es importante tomar en cuenta estos parámetros porque nos da una visión más detallada de las reacciones metabólicas que están directamente relacionadas con el rendimiento de kanamicina.

9.- CONCLUSIONES

1. Se realizaron estudios multifactoriales para observar el efecto en la producción de kanamicina de los diferentes medios reportados. Su análisis por arreglos ortogonales permitió su formulación.
2. Todos los componentes del medio basal tienen un efecto sobre la producción de kanamicina. Este efecto depende de la concentración en que se encuentren.
3. En el medio mejorado 1 (MM1), la harina de soya y el carbonato de calcio aumentaron la producción de kanamicina cuando se encuentran a una concentración de 12 g/l y 2.5 g/l respectivamente (tabla 18).
4. También los sólidos de cocimiento de maíz presentan mayor efecto positivo sobre la producción de kanamicina cuando se encuentran a una concentración de 1.5 g/l (tabla 18).
5. El fosfato de potasio junto con la glucosa ejerce un efecto negativo sobre la producción de kanamicina, por lo que al obtener el medio mejorado 3 se suprimieron estos componentes (tabla 19).
6. La harina de camarón como fuente de nitrógeno tuvo un efecto positivo muy importante con respecto al licor de cocimiento de maíz. El nivel de kanamicina más alta (148.4 g/l) se alcanzó al utilizar la harina de camarón a una concentración de 1.5 g/l. La harina de camarón parece actuar como un precursor porque contiene glucosamina, compuesto esencial en la síntesis de kanamicina (tabla 18 y 19).
7. Como fuente de carbono la dextrina presentó mayor efecto positivo con respecto al almidón a una concentración de 10 g/l.
8. El ácido glutámico no parece tener efecto significativo sobre la producción de kanamicina.
9. De los seis diferentes medios mejorados obtenidos para la producción de kanamicina de la cepa mutante de Streptomyces kanamyceticus el medio mejorado 4 (MM4) fue el que tuvo mayor producción de kanamicina (148.4 mg/l), en relación a la concentración inicial del medio basal (8.4 mg/ml).
10. Las condiciones ambientales recomendadas para la producción de kanamicina producida por Streptomyces kanamyceticus son: pH entre 7.0 -8.0, temperatura de 29°C, y velocidad de agitación de 400 r.p.m.
11. El objetivo general se cumplió ya que se obtuvo un medio mejorado para la producción de kanamicina partiendo de un medio basal.
12. De acuerdo a los resultados de los trabajos experimentales elaborados las mejores fuentes de nitrógeno para la síntesis de kanamicina por Streptomyces kanamyceticus son: La

harina de soya, harina de camarón, y licor de cocimiento de maíz. De **carbón** son: dextrina y en menor grado el almidón. Y como **sales minerales**: el carbonato de calcio.

COMPONENTES	MB (g/l)	MM1 (g/l)	MM2 (g/l)	MM3 (g/l)	MM4 (g/l)	MM5 (g/l)
ALMIDÓN	20.00	10.00	10.00	10.00		10.00
GLUCOSA	5.00	2.50	2.50			2.50
SULFATO DE MAGNESIO	2.60	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
CLORURO DE SODIO	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
CLORURO DE POTASIO	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
HARINA DE SOYA	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
CSL	3.00	0.50	0.50	1.50	0.00	1.50
CARBONATO DE CALCIO	3.00	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
FOSFATO DE POTASIO	1.00	1.00				1.00
HARINA DE CAMARÓN					1.50	
ACEITE DE GIRASOL					8.00	
DEXTRINA					10.00	
ÁCIDO GLUTÁMICO						2.00
CONC. KANAMICINA (mg/ml)	8.40	25.20	21.00	31.20	148.40	15.25

TABLA 19
 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE LOS SEIS MEDIOS OBTENIDOS

MEDIO	PARÁMETROS DETERMINADOS	TIEMPO DE FERMENTACIÓN			
		(hrs)	(hrs)	(hrs)	(hrs)
MB	pH	18	66	114	162
	AZÚCARES REDUCTORES (g/l)	6.06	6.68	7.03	7.51
	PESO SECO (g/l)	12.50	9.75	3.90	7.50
	CONCENTRACIÓN KANAMICINA (mg/l)	8.07	12.14	12.13	10.45
		0.00	0.00	8.40	7.48
MM1	pH	5.76	7.20	7.74	7.99
	AZÚCARES REDUCTORES (g/l)	15.00	3.50	5.35	1.80
	PESO SECO (g/l)	11.03	10.07	8.90	7.80
	CONCENTRACIÓN KANAMICINA (mg/l)	0.00	13.50	24.60	26.20
MM2	pH	5.81	7.63	7.92	8.19
	AZÚCARES REDUCTORES (g/l)	13.50	1.70	3.60	1.10
	PESO SECO (g/l)	8.49	10.48	8.84	7.50
	CONCENTRACIÓN KANAMICINA (mg/l)	0.00	21.80	21.50	18.20
MM3	pH	6.05	7.46	7.78	8.05
	AZÚCARES REDUCTORES (g/l)	16.35	2.90	3.70	2.00
	PESO SECO (g/l)	6.79	10.00	8.90	7.79
	CONCENTRACIÓN KANAMICINA (mg/l)	0.00	26.90	29.10	31.20
MM4	pH	5.76	7.61	7.47	7.97
	AZÚCARES REDUCTORES (g/l)	9.78	N/D	3.70	1.71
	PESO SECO (g/l)	8.10	10.50	N/D	11.46
	CONCENTRACIÓN KANAMICINA (mg/l)	0.00	26.00	100.00	148.40
MM5	pH	6.49	7.65	8.00	8.09
	AZÚCARES REDUCTORES (g/l)	11.70	10.10	7.26	4.60
	PESO SECO (g/l)	14.70	10.00	N/D	17.10
	CONCENTRACIÓN KANAMICINA	0.00	10.40	15.25	11.60

FIG. 11
EFECTO DE LOS COMPONENTES PARA
LA PRODUCCIÓN DE KANAMICINA

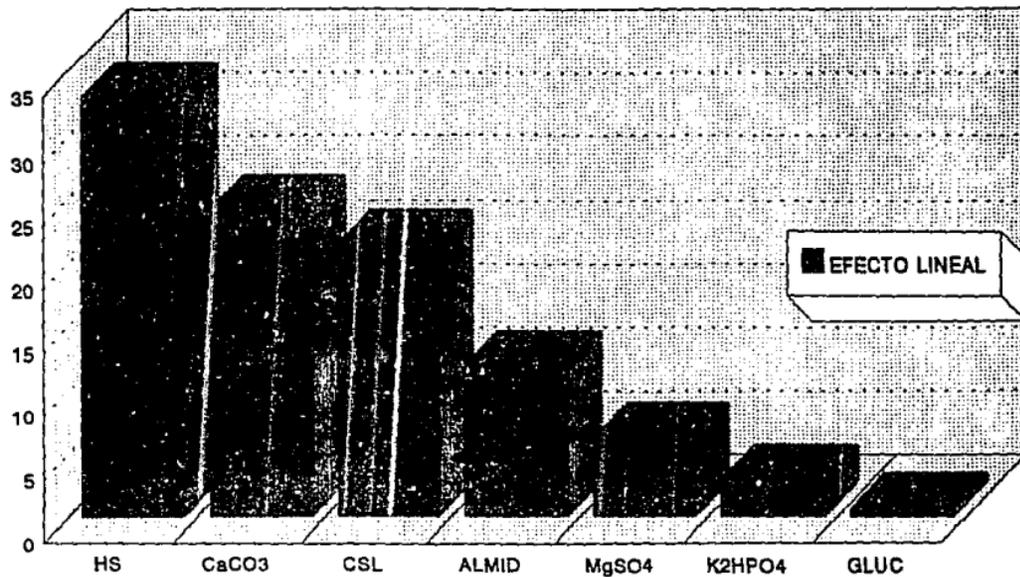


FIG. 12
CONCENTRACIÓN MÁXIMA DE LOS MEDIOS DE
PRODUCCIÓN OBTENIDOS

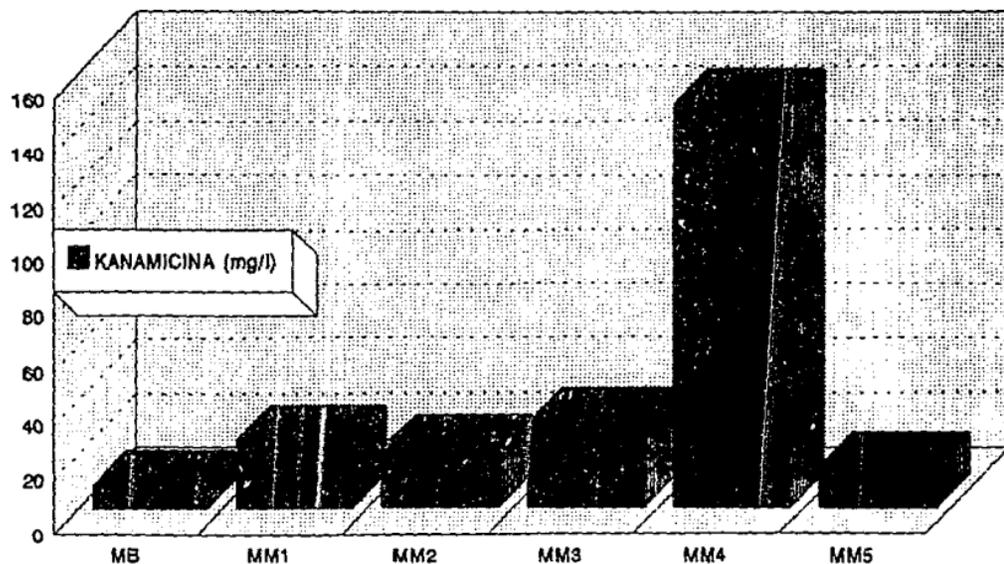
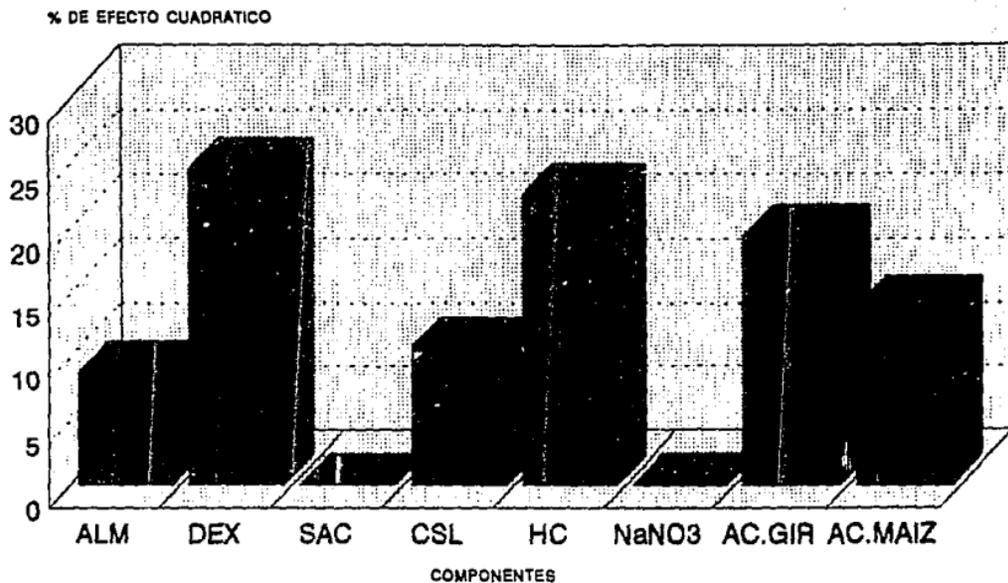


FIG.13
EFECTO DE HARINA DE CAMARÓN
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE KANAMICINA



10.- RECOMENDACIONES

- Estudiar el uso de más precursores de kanamicina.
- Establecer un método de determinación de biomasa rápido y preciso para poder determinar el tiempo y condiciones de mayor productividad.
- Analizar el efecto de la velocidad de agitación sobre la producción de kanamicina.
- Realizar más estudios genéticos para la cepa de Streptomyces kanamyceticus.
- Debido a que se utilizan materia prima no sintética (harina de camarón, licor de cocimiento de maíz, harina de soya) es necesario un análisis de proveedor para así obtener especificaciones físicas, químicas y bromatológicas de cada una.

11.- APÉNDICE

11.1 ARREGLOS ORTOGONALES

Un ARREGLO ORTOGONAL (A0) es una fracción de un experimento factorial completo, se basa en una tabla de enteros cuyos elementos de columna (1,2,3) representan los niveles bajo, intermedio y alto de cada factor de columna. Cada renglón del arreglo ortogonal representa una corrida, esto es un conjunto específico de niveles factoriales por probar. Los hay de distintos tamaños, dependiendo del número de factores que se deseen estudiar en el experimento.

Este método se utiliza con el fin de maximizar u optimizar un producto o proceso y que sea insensible a factores difíciles de controlar o a variaciones externas.

Su principal característica de interés práctico es que consisten del mínimo número de corridas experimentales capaz de no alliar factores principales del experimento. De hecho si se escogen cualesquiera dos columnas del arreglo, siempre se tendrá un arreglo completo. Sin embargo, los efectos principales están aliados con interacciones de dos factores. Según el Dr. Taguchi, su experiencia en experimentación industrial le ha mostrado que las interacciones de dos factores son raras, argumenta que no es necesario considerar explícitamente interacciones bifactoriales. Postula que es posible eliminar estas interacciones especificando correctamente la respuesta y los factores de diseño o empleando un método de asignación de factores deslizantes para elegir los niveles de los factores.(28)

Un A. O. consiste de una matriz cuyas columnas corresponderán a los factores del experimento y los renglones a las combinaciones de los niveles de los factores llamadas Tratamientos. Los renglones darán lugar a las corridas experimentales.

Análisis de la información proveniente de un A. O.

Paso 1

Para cada factor obtener el promedio de las observaciones correspondientes al mismo nivel.

Paso 2

En el caso de un factor a dos niveles calcular el efecto del factor usando la fórmula:

$$\text{Efecto factor} = \text{Promedio nivel 2} - \text{Promedio nivel 1}$$

Si es un factor a 3 niveles calcular los efectos lineal y cuadrático de la siguiente manera:

$$\text{Efecto lineal} = \text{Promedio nivel 3} - \text{Promedio nivel 1}$$

$$\begin{array}{l} \text{Efecto} \\ \text{Cuadrático} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Promedio} \\ \text{Nivel 3} \end{array} - (2) \begin{array}{l} \text{Promedio} \\ \text{Nivel 2} \end{array} + \begin{array}{l} \text{Promedio} \\ \text{Nivel 1} \end{array}$$

Paso 3

Realizar gráfica de los efectos calculados en el experimento.

Paso 4

Calcular el % de cada factor

EJEMPLO**Efectos calculados del experimento 7.2**

Utilizando el procedimiento explicado en los párrafos siguientes.

DISEÑO: $L_{16}(2)^7$

Este diseño se refiere a 16 muestras problema, con 7 factores (componentes del medio), a dos niveles (dos concentraciones diferentes)

1. Para sacar el promedio de cada factor se tomara como base el diseño arriba mencionado.

CORRIDAS	F	A	C	T	O	R	E	S
	A	B	C	D	E	F	G	
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	1	1	1	2
3	1	1	2	1	2	2	1	1
4	1	1	2	2	2	2	2	2
5	1	2	1	1	2	2	2	2
6	1	2	1	2	2	2	2	1
7	1	2	2	1	1	1	1	2
8	1	2	2	2	1	1	1	1
9	2	1	1	1	1	2	2	1
10	2	1	1	2	1	2	2	2
11	2	1	2	1	2	1	1	1
12	2	1	2	2	2	1	1	2
13	2	2	1	1	2	1	1	2
14	2	2	1	2	2	1	1	1
15	2	2	2	1	1	2	2	2
16	2	2	2	2	1	2	2	1

Como ejemplo se analizará el factor "C" que corresponde a la harina de soya (tabla 5) del experimento 7.2

Paso 1 (tabla 6)

1. Promedio factor "C" (nivel 1) = 2.54

2. Promedio factor "C" (nivel 2) = 11.7

Paso 2

Efecto factor "C" = promedio nivel 2 - promedio nivel 1

$$\text{Efecto factor "C"} = 11.75 - 2.54$$

$$\text{Efecto factor "C"} = 9.21$$

Paso 3

Graficar el efecto del nivel 1 y el nivel 2.

Paso 4

Seguir el mismo procedimiento para todos los factores (A, B, D, E, F y G).

Paso 5

Calcular el % de cada factor:

$$\text{Efecto A} + \text{Efecto B} + \text{Efecto C. Efecto G} = 28$$

$$\% \text{ Efecto "C"} = (\text{efecto C}) (100) / 28$$

$$\% \text{ Efecto "C"} = (9.21) (100) / 28$$

$$\% \text{ Efecto "C"} = 32.89$$

11.2 MÉTODO CILINDRO PLACA EJEMPLO

1. Curva standar de sulfato de kanamicina.

	T3	T1	T3	T2	T3	T4	T3	T5
	10.00	9.00		9.00	9.00	10.00	10.00	10.50
	9.50	9.00	9.00	9.00	9.00	10.00	9.00	10.00
	10.00	9.00	9.00	9.00	9.00	10.00	9.00	11.00
	9.00	8.50	10.00	9.00	10.00	9.50	9.00	10.50
	10.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	10.00	11.50
	10.00	8.50	8.50	9.00	9.00	10.00	9.00	10.00
Promedio	9.75	8.83	9.41	9.00	9.16	9.75	9.33	10.68
Corrección		-0.34		0.00		0.25		0.08
Promedio Corregido		8.49		9.00		10.00		10.66

Promedios

- a) T1 = 8.49
- b) T2 = 9.00
- c) T3 = 9.41
- d) T4 = 10.00
- e) T5 = 10.66

$$A = 3(e) + 2(d) + (c) - (a)/5$$

$$A = 3(10.66) + 2(10) + (9.41) - (8.49)/5$$

$$A = 10.50$$

$$B = 3(a) + 2(b) + (c) - (e)/5$$

$$B = 3(8.49) + 2(9) + (9.41) - 10.66/5$$

$$B = 8.44$$

MÉTODO CILINDRO PLACA

2. Valoración microbiológica de kanamicina

DATOS DE CURVA STD A= 10.58 B= 8.44 X T _c = 9.41								
	T3	M1	T3	M2	T3	M3	T3	M4
	9.50	8.00	9.00	8.50	9.00	8.00	9.00	8.00
	9.50	8.00	9.00	8.00	9.00	8.50	8.50	8.00
	9.00	8.00	9.00	8.00	9.50	9.00	9.00	8.00
	9.00	8.00	9.00	8.00	9.50	9.00	9.00	8.00
	9.00	8.00	9.00	8.00	9.50	9.00	9.00	8.00
	9.50	8.00	9.00	8.00	9.00	8.00	8.00	8.00
Promedio	9.25	8.00	9.00	8.08	9.25	8.00	8.75	8.00
Corrección		0.16		0.41		0.16		0.66
Promedio corregido		8.16		8.49		8.16		8.66

La concentración de kanamicina se obtiene extrapolando los datos de cada muestra M1, M2, M3 y M4 (promedio corregido) en la gráfica de curva standar.

12.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abou-Zeld Ali (1972). The Fermentation Production of Kanamycin by Streptomyces Species. *Sci. Ind.*, 9 (1, 2):47-56.
2. Auden B. J. et al(1980). Some statistical Methods in Nutrient Medium Optimization. From the Research Laboratories of the CIBA Ltd. Pharmaceutical department, 858-866.
3. Basak,K, Majumdar,S.K.(1978).Enzymatic Studies on Kanamycin Biosynthesis. *Indian Journal of Experimental Biology*,16:57-61
4. Basak,K, Majumdar,S.K. (1975). Mineral Nutrition of Streptomyces kanamyceticus for kanamycin formation. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 8 (4) : 391-395.
5. Basak,K, Majumdar,S.K. (1973). Utilization of Carbon and Nitrogen Sources by Streptomyces kanamyceticus for kanamycin Production. *Antim. Agents Chemother.* 4(1):6-10.
6. Bowman,W.C., Rand,M,J., (1984). Farmacología. Interamericana, México,D.F., p.p. 34.9-14,15,35, 32.18, 28.17.
7. Bryant, M.C.(1976). Antibióticos y su control mediante el laboratorio. Manual Moderno, México D.F.
8. Claes,P, Dubost,M.(1977). Kanamycin Sulfate. Analytical profiles of drugs substances. Ed. Florey K, USA 6 :259-296.
9. Corcoran,J.W.(1981). Biosynthesis Antibiotics.Vol.4. Springer Verlag, New York, p.p. 75-88.
10. Davis,N.D., Blevins,W.T. (1979).Methods for laboratory Fermentations. Microbial Technology. Vol 2, Peppler and Perman, USA, p.p. 305-329.
11. Hotta,K., Okami,Y. (1976). Effect of Magnesium on Binding of Aminoglycoside Antibiotics to their Producers. *Journal Ferment Technology.* 54(8):563-578.
12. Honchen,H. (1971). Progress in Industrial Microbiology.Vol.5, Heywool & Company LTP, London,
13. Jeannin,C., Mangeot,A. (1986). Ingeniería Farmacéutica. El manual Moderno, México D.F., p.p.120-126.
14. Johnson,D.A.,Hardeastle,G.A. (1961). Process of Antibiotic Purification. U.S. Patent, 2, 967, 177.

15. Kojima, M., Satoh, A. (1973). Microbial Semi-synthesis of Aminoglycoside Antibiotics by Mutants of *S. ribosificos* and *S. kanamyceticus*. *Journal of Antibiotics*, 26 (12):784-786.
16. Martin, J.F., Demain, A.L. (1980). Control of Antibiotic Biosynthesis. *Microbial Reviews*, 40:230-251.
17. Montgomery, D.C. (1991). Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F., p.p. 369-391.
18. Pape, H., Rehm H.J. (1986). *Biotechnology*. Ed. VCH, Germany, p.p.315-330.
19. Periman, D., Tsao, T. (1977). *Annual Reports on Fermentation*. V.1., Academic Press, New York, p.p.256-326.
20. Peppier, H.J., Periman D. (1977). *Methods for Laboratory Microbial Technology*. Chapter 13, Vol 2, 2a. Ed, Academic Press, USA, p.p. 304-329.
21. Política Industrial Farmacéutica. (1986). Secretaría de Fomento Industrial & Nacional Financiera, México D.F., p.p.25-34.
22. Quintero, R.R. (1987). Ingeniería Bioquímica. Alhambra Mexicana S.A. C.V., México, D.F., p.p. 5-35.
23. Russell, A. (1980). *Assay Methods Antibiotics*. Pharmaceutical Microbiology, 2ª ed., Blackwell Scientific Publication, London.
24. Sakaguchi, K., Okanishi, M. (1976). *Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganism*. Kodansho LTD, Japan.
25. Satoh, A., Ogawa, H. (1976). Regulation of N-Acetylkanamycin Amido-Hidrolase in the Idiophase in Kanamycin Fermentation *Agr. Biol. Chem.* 40(1):191-196.
26. Scriban, R. (1985). *Biología*. 2da. ed, El Manual Moderno, México, D.F., p.p. 3,112-122.
27. United states pharmacopeia. (1980). 23ª ed., by Authority of the United States Pharmacopelial Convention Inc, USA.
28. Wang, D.I. et al. (1986). *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley & Sons Inc, USA, p.p. 1-35.
29. Windholz, M. (1983). *Merck Index*. 9a ed, Merck & Co. Inc, USA.
30. Wiseman, A. (1986). *Principios de Biotecnología*. Acribia, S.A., Zaragoza España, p.p.6-13 y 46-57.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA