

11261  
les  
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**PRODUCCION DE ERITROMICINA POR  
CELULAS DE Streptomyces erythreus  
INMOVILIZADAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A:

DOLLY MONTOYA CASTAÑO

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1983



## **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.

## I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	
I. Metabolitos Secundarios	8
- Regulación del metabolismo secundario	10
- Síntesis de metabolitos secundarios de actinomicetos	11
II. Eritromicina	
a. Generalidades	18
b. Estructura química de las eritromicinas	20
c. Propiedades fisicoquímicas	22
d. Biosíntesis	22
e. Regulación de la biosíntesis	25
f. Producción de Eritromicina por fermentación tradicional en Batch.	27
III. Características del microorganismo	30
- Generalidades	30
- Esporas	31

	<u>Pág.</u>
IV. Condiciones de crecimiento y producción	33
V. Inmovilización.	37
- Métodos	38
- Soportes	42
VI. Reactores	44
OBJETIVOS	48
METODOLOGIA GENERAL	49
MATERIALES Y METODOS	52
- Microorganismos	52
- Medios	53
- Equipo	54
- Reactivos y materias primas	54
- Métodos de valoración	55
- Métodos de inmovilización	56
DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS DE :	57
- Caracterización del microorganismo	57
- Curvas de crecimiento, producción y consumo de azúcares	59

	<u>Pág.</u>
- Edad a la que se debe inmovilizar el micelio	63
<b>INMOVILIZACION. METODOS Y SOPORTES UTILIZADOS. RESULTADOS EXPERIMENTALES</b>	<b>66</b>
- Método de inmovilización y soportes	66
- Inmovilización en gel de Kappa Carragenina	67
- Inmovilización en cerámica	81
- Inmovilización por encapsulación en sacos de nitroce- lulosa	85
- Inmovilización en tezontle	89
<b>REACTORES UTILIZADOS</b>	<b>94</b>
<b>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>	<b>103</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>114</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO</b>	<b>133</b>
- Método colorimétrico para determinación de Eritromicina	134
- Valoración de Eritromicina por método de difusión en gel	157
- Valoración de azúcares por método de antrona	138

	<u>Pág.</u>
- Determinación de biomasa por densidad óptica	152
- Determinación de biomasa por paquete micelilar	154
- Técnica para determinar edad de cosecha del micelio para inmovilizar.	158
- Técnica de inmovilización en Kappa Carragenina	159
- Condiciones para inmovilizar en sacos de nitrocelu- losa o colodión.	159
- Cálculos	160

## INTRODUCCION

Los antibióticos se definen como sustancias químicas producidas por microorganismos, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos en cantidades muy pequeñas (114).

La importancia de los antibióticos no se puede valorar unicamente desde el punto de vista terapéutico. Estos compuestos tienen también potencial en otros campos: para crecimiento animal como complemento alimenticio, (la bacitracina) y en la agricultura, donde es posible utilizarlos para inactivar hongos, levaduras, etc.

En un período de un poco más de 35 años, 4000 antibióticos han sido descubiertos y solamente alrededor de unos 91, se producen industrialmente por procesos microbiológicos (58). Sin embargo, la industria farmacéutica continúa en la búsqueda de nuevos antibióticos. Se ha estimado que se descubren en número de 50 a 100 por cada año, pero muy pocos son llevados a escala industrial.

En América Latina es muy elevado el consumo de estos compuestos; representa el 17.8% del consumo total de medicamentos (70). En la Ta--

bla número 1, podemos apreciar cuáles de ellos son los de mayor consumo.

TABLA 1. ANTIBIOTICOS DE MAYOR CONSUMO EN AMERICA LATINA

ANTIBIOTICO	total de consumo en América Latina.
Ampicilina	30
Tetraciclina	20
Eritromicina	15
Penicilina	10
Cloranfenicol	5
Cefalosporinas	5
Otros	15

Fuente : ( 70 ) , informe Conacyt - 6 - APA 1980.

Como puede observarse en la tabla anterior, la eritromicina ocupa un papel primordial en esta industria. Su utilización se debe fundamentalmente a la importancia terapéutica, como antibiótico de amplio espectro, con algunas ventajas adicionales. En dosis terapéuticas no es tóxico, ni presenta alteraciones en la flora normal del tracto gastrointestinal. Es también usado con frecuencia en casos de hipersensibilidad a la penicilina ( 45 ). Los elementos arriba enumerados,

dan cuenta de nuestro interés en el trabajo con este antibiótico.

La eritromicina se produce a partir del Streptomyces erythreus, en un medio complejo industrial, por el sistema de fermentación en Batch, durante 200 horas, con variables normalmente medidas y controladas.

El estudio del control de la fermentación ha atraído la atención de Microbiólogos e Ingenieros Bioquímicos, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de producto en la menor cantidad de tiempo, es decir aumentar la productividad.

A nivel experimental se ha desarrollado un método para la producción en cultivo semicontinuo, utilizando un medio complejo. lograron aumentar la productividad en 79% con relación al proceso batch. Por medio de estos resultados se pudo discernir que teniendo los requisitos nutricionales para el microorganismo, se retarda la degeneración del organismo en el cultivo, factor importante en el proceso de biosíntesis de Eritromicina ( 15). El cultivo semicontinuo es muy complicado para ser llevado a escala industrial.

La producción de antibióticos no se ha logrado desarrollar en cultivo continuo, puesto que la biosíntesis de estos metabolitos secundarios presenta peculiaridades con respecto a la producción de metabolitos primarios. Kuenzi ( 50 ) ha resumido en los siguientes puntos tales diferencias :

1. Cambio de las propiedades físicas del medio, el incremento de

la viscosidad ha sido considerada la más importante.

2. La producción es muy lenta y las células se van degenerando.
3. La multiplicación de células y la producción ocurren en fases diferentes. Es necesario optimizar condiciones en las dos fases.

Importancia de la utilización de células inmovilizadas en producción de antibióticos.

Este trabajo se propone desarrollar un nuevo sistema de producción de antibióticos, que permita superar las limitaciones de la fermentación tradicional en Batch, inmovilizando células completas metabólicamente activas, en un soporte que permita el cumplimiento de sus funciones biosintéticas.

En los últimos 15 años, la investigación en materia de inmovilización de células, ha llegado hasta la aplicación industrial. Estudios sobre inmovilización de microorganismos (61), (47), dan cuenta de las características de estos sistemas, razones para inmovilizar y ventajas que ofrecen. (113)

La inmovilización de células completas de microorganismos, se ha constituido en un nuevo tipo de fermentación. A nivel experimental se ha avanzado en procesos de síntesis de metabolitos primarios y sobre todo en la inmovilización de células con determinada actividad enzimática, para evitar la purificación de enzimas. En la Tabla número 2 pueden apreciarse algunas reacciones llevadas a cabo por células inmovilizadas. Aunque industrialmente sólo se han desarrollado procesos monoenzimáticos.

Para el caso de fermentación más complejas, caracterizadas por poseer mecanismos multienzimáticos, podríamos decir que aún están en su infancia ( 102 ).

Este proyecto propone ir más allá de la inmovilización de microorganismos, para la producción de metabolitos primarios; se trata de sintetizar eritromicina (metabolito secundario), por células inmovilizadas vivas, en un proceso biosintético que contempla una amplia y variada gama de reacciones multienzimáticas, de gran complejidad.

Las ventajas del nuevo sistema las resumimos así:

1. Evitar cambios físicos en el medio como la viscosidad.
2. Inducir operaciones continuas en oposición al sistema tradicional en batch.
3. Capacidad para recargar el sistema, induciendo crecimiento y producción de células.

TABLA 2. PROCESOS DE INMOVILIZACIÓN Y PRODUCTOS

Microorganismo	Soporte	Reacción	Bibliografía
<u>Enterobacter aerogenes</u>	K. Carragenina	Producción 2,3 butanodiol	( 43 )
<u>Streptomyces phaeochromogenes</u>	Colágena	Glucosa + fructosa	( 99 )
<u>Streptomyces sp.</u>	Sacos de poliéster	Hidrólisis de celulosa	( 34 )
<u>E. coli</u>	K Carragenina	Producción de ácido L. aspártico	( 93 )
<u>S. marcescens</u>	K Carragenina	Producción L. isoleucina	( 93 )
<u>A. suboxydans</u>	K Carragenina	Producción L. sorbosa	( 93 )
<u>S. cerevisiae</u>	K Carragenina	Producción Etanol	( 108 )
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	Colágeno	Fijación de nitrógeno	( 92 )
<u>Pseudomona dacuhae</u>	K Carragenina	Producción L. alanina	( 107 )
<u>S. cerevisiae</u> Tiene enzimas con actividad invertasa	K Carragenina	Hidrólisis de sacarosa	( 29 )
<u>Rhizopus nigricans</u>	Policramida algínatos	Hidroxilación 11 <sup>a</sup> de progesterona	( 53 )
<u>S. cerevisiae</u>	Viruta de madera ceafámica	Producción Etanol	( 108 )
<u>E. coli</u> Actividad triptofano sintetasa	Quitosan	Producción de L. triptofano	( 53 )
<u>Clostridium butylicum</u>	Alginatode calcio	Producción de n-butanol	( 49 )
<u>Streptomyces griseus</u>	Colágena	Producción condicidina	

4. Incremento de la producción por aumento de la densidad celular.
5. Operar a altas tasas de dilución sin que se produzca Wash-out.
6. Recuperación del producto a la salida del reactor, ahorrando el largo proceso de separación de sólidos y células, del sistema tradicional.

Es importante destacar que las ventajas anteriormente enumeradas deben disminuir costos de producción. En el caso de antibióticos los costos de separación muchas veces representa el 60% del costo total del proceso (117).

Del desarrollo de biosíntesis de antibióticos por este nuevos sistema, podríamos decir que está dando sus primeros pasos aún a nivel experimental, como se puede apreciar por la escasa cantidad de investigaciones reportadas (29), (106), (87).

En este proyecto se ensayaron diferentes sistemas de inmovilización y soportes, al igual que se diseñaron los reactores que en cada caso fueron necesarios.

Todo el trabajo se desarrolló en la perspectiva de sentar algunas bases en el desarrollo experimental de este nuevo sistema de fermentación, con inmovilización de células, que permita en el futuro desarrollar un nuevo

sistema de fermentación, con las ventajas anteriormente numeradas

## ANTECEDENTES

### I. Metabolitos secundarios.

Se definen como pequeñas moléculas sintetizadas por ciertos microorganismos, generalmente en la fase tardía del crecimiento. Estas moléculas no se requieren para que el microorganismo se desarrolle, pero se cree que tienen valor de sobrevivencia para el organismo que las produce. Entre los metabolitos secundarios más conocidos podemos citar los siguientes : antibióticos, micotoxinas y pigmentos. Estos generalmente no se producen durante la fase rápida del crecimiento (tropofase), sino que se forman en el paso siguiente (idiofase). La formación tardía de estos metabolitos es uno de los mecanismos que utiliza el microorganismo para evitar el suicidio. En tropofase los microorganismos son sensibles a su propio antibiótico y solamente durante la idiofase son fisiológicamente resistentes (94).

#### Funciones:

Para los metabolitos secundarios se han postulado las siguientes funciones :

- a. Se producen para sustituir un desbalance de metabolitos primarios que puede ocurrir cuando la velocidad de multiplicación se disminuye.

- b. Papel ecológico de los metabolitos activos farmacológica y fisiológicamente. Algunos de estos compuestos actúan en el metabolismo como efectores o reguladores, al igual que las hormonas en plantas o en animales. Sin embargo, considerando el gran número de estos productos formados y que la cantidad de compuestos utilizados es pequeña, parece que su significado biológico es un raro proceso que permite su selección (97).
- c. Además de las funciones postuladas anteriormente, estos metabolitos tienen importancia como elementos de transición en el paso de célula vegetativa a espora. Estudios realizados permiten observar que hay correlación y no interdependencia entre la producción de metabolitos secundarios y la esporulación. La tirotricina estimula la esporulación cuando un cultivo de Bacillus brevis, (organismo que la produce), se incuba en glicerol con limitación de fuente de Nitrógeno. Hay estímulo de la síntesis de RNA en lugar de inhibición (41).

En estudios preliminares se había observado que al final de la fase exponencial, aumentaba la síntesis de tirotricina y disminuía la síntesis de RNA (42). Así, no hay obligatoriedad entre la producción del antibiótico, la inhibición de síntesis de RNA y la esporulación.

Hay posibilidades de que la formación del antibiótico y de espo-

ras sean fenómenos independientes regulados por un mecanismo común de control, así la producción del antibiótico acompaña la esporulación.

Regulación del metabolismo secundario. Aunque no está muy claro hay evidencia de que muchos de los mecanismos que regulan el metabolismo primario, están involucrados en el control del secundario ( 42). Por ejemplo, la actividad de enzimas del metabolismo secundario está ausente en la tropofase, sólo se detecta en niveles en que el crecimiento está limitado, o sea que puede haber represión catabólica; no se sabe si a nivel de transcripción o de traducción ( 31).

En general, la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios está genéticamente determinada. Los genes claramente reprimidos durante el crecimiento, dejan de estarlo al final del mismo. Se conoce que la mutación tiene mayor efecto sobre la producción de metabolitos secundarios (25). La mutación es el factor responsable para que aumente de 100 a 1000 veces la producción del antibiótico. Aunque no se conocen exactamente los mecanismos de regulación involucrados, Demain (24) propone los siguientes puntos a considerar :

1. Un inductor debe acumularse durante el crecimiento o añadirse al medio para que los genes de la idiofase se derrepriman.
2. Un producto primario final ejerce represión de la vfa secundaria;

La desaparición de este compuesto derreprime los genes.

3. El crecimiento en fuentes de carbono utilizables reprimen genes de la idiofase por represión catabólica.
4. Ciertos caminos de la idiofase están reprimidos por una alta poza energética. La derrepresión ocurre cuando la formación de ATP disminuye.
5. La RNA polimerasa de la tropofase es una enzima diferente de la RNA de la idiofase.

La dificultad para hiperproducir un metabolito secundario estriba en la falta de conocimientos sobre las vías de biosíntesis y por ende a las modificaciones a que están sujetas.

Síntesis de metabolitos secundarios de Actinomicetos. La síntesis de dichos metabolitos encierra secuencias multienzimáticas, preservadas por la naturaleza. Son ensamblajes heterogéneos de los metabolitos microbianos, los cuales proveen ventajas de sobrevivencia sobre el cultivo, por diferentes vías.

Las síntesis que actúan en la producción de los metabolitos secundarios, tienen un tiempo de actividad muy corto comparado con el tiempo que un cultivo en batch, tarda en envejecer (26). En estudios rea-

lizados con garamicina se detectaron sintetetasas que se forman rápidamente al final de la fase exponencial, tienen su picó de reacción y son destruídas e inactivadas inmediatamente.

Los metabolitos secundarios se sintetizan siguiendo el desarrollo del carbono, por diferentes rutas metabólicas.

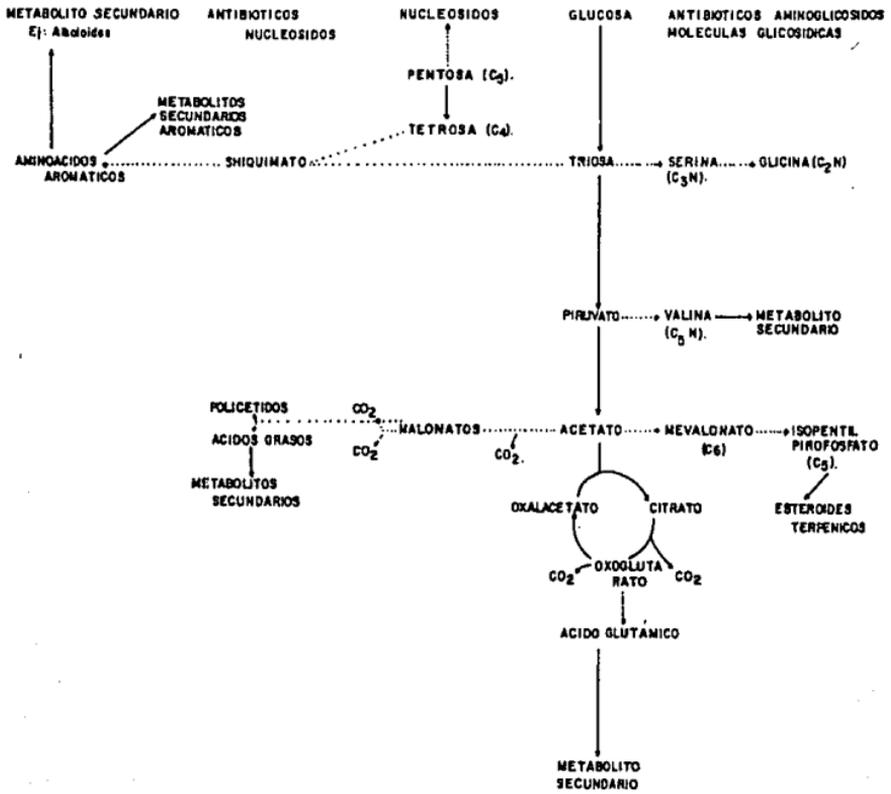
El punto de partida es la glucosa que por glicólisis o por vía de las pentosas forma triosas; de esta manera se forma el piruvato, el cual entra al ciclo del ácido cítrico, para producir :  $\text{CO}_2$ , agua y ATP.

El metabolismo biológico acompañado de reacciones de óxido reducción, metilaciones biológicas y halogenaciones entre otras, hacen posible la formación de gran cantidad de estructuras químicas derivadas del camino biosintético principal. En cada uno de estos pasos los metabolitos primarios dan algunas modificaciones a metabolitos secundarios. Debe mirarse la formación de algunos metabolitos secundarios de los actinomicetos a la luz de estos caminos biosintéticos (88). Ver Figura 1).

Dependiendo de la vía metabólica que utilicen se obtienen metabolitos secundarios con las siguientes estructuras :

Aminoglicósidos: La glucosa se integra intacta al esqueleto de estos compuestos, por ejemplo la Estreptomina. O parte del esqueleto, a menudo como molécula de glicósido, unido al esqueleto derivado del

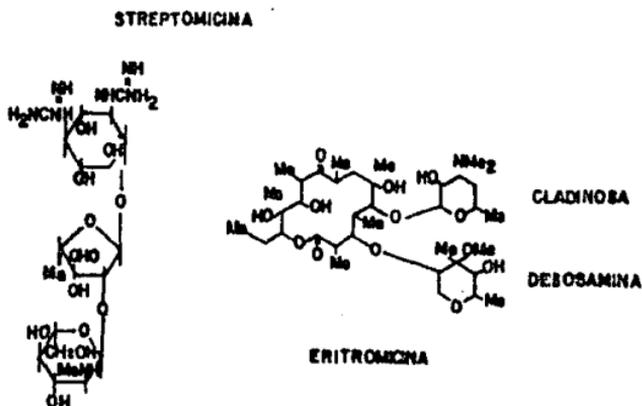
FIG.1 "RELACION ENTRE EL METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO"



— PASOS PRINCIPALES DEL CATABOLISMO DE GLUCOSA.  
 ..... PROCESOS SINTÉTICOS DE METABOLITOS PRIMARIOS.

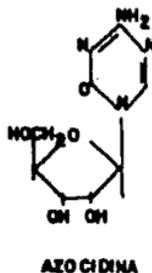
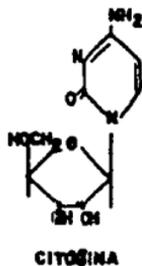
Carbono por otro camino; ejemplo : en antibióticos macrólidos como la Eritromicina. La incorporación de la molécula completa de glucosa es fenómeno característico de los actinomicetales, en contraste con los hongos donde raras veces ocurre.

FIG.2 METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR INCORPORACION DEL ESQUELETO DE GLUCOSA INTACTO



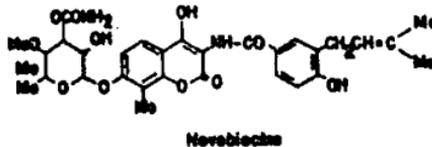
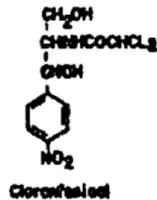
por el ciclo de las pentosas fosfato, el cual provee la ribosa para la biosíntesis de nucleósidos. Los antibióticos nucleósidos difieren de los nucleósidos esenciales en la molécula de azúcar.

FIG.3 METABOLITOS PRODUCIDOS POR LA UTILIZACION DE GLUCOSA VIA PENTOSA FOSFATO.



Vía del Acido Shikímico . El ciclo de las pentosas fosfato también provee a la tetrosa que se condensa con una triosa para dar el ácido shikímico, que es el precursor de aminoácidos esenciales y de metabolitos secundarios aromáticos como el Cloranfenicol. Esta vía es quizás la principal en la producción de compuestos aromáticos de actinomicetos.

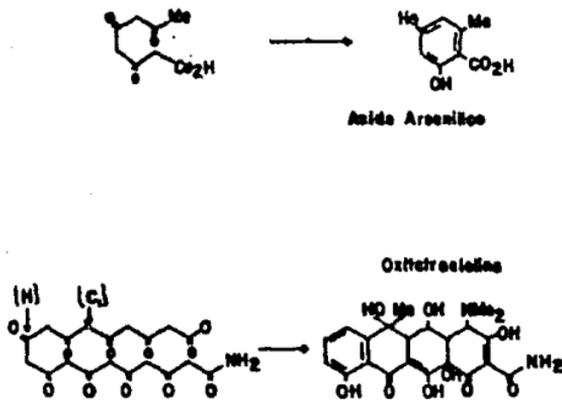
FIG.4 METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR VIA DEL ACIDO SHI-  
QUIMICO.



#### POLICETIDOS Y POLIPROPIONATOS

La glucosa pasa a triosa, luego por vía ácido pirúvico produce el ace-

FIG.5 BIOSINTESIS DE POLIPROPIO



tato que es la llave tanto para el metabolismo primario como secundario, Por carboxilación del acetato se produce malonato, y la condensación lineal de una molécula de acetato, con varias moléculas de malonato, posterior descarboxilación y reducción, da como resultado ácidos grasos. Se relaciona la biosíntesis de ácidos grasos con una síntesis policétida. Esta ruta es más común en hongos que en actinomicetales. A este grupo pertenecen antibióticos de suma importancia como las tetraciclinas. Hay una desviación de este paso que es la vía polipropionato, el cual encierra una condensación lineal de ácido propiónico y metil malónico, en lugar de acético y malónico. Por esta vía se sintetiza la aglicona de la eritromicina, FIG.5.

## II. Eritromicina

### a. Generalidades.

La Eritromicina pertenece al grupo de los antibióticos macrólidos, lipofílicos básicos que poseen un anillo lactónico. Sintetizado por cepas de Streptomyces erythreus, y por algunas especies de género Arthrobacter ( 51). Descubierta por Mc Guire et al en 1952. Altamente efectiva contra muchos organismos Gram positivos y algunos Gram negativos. Se usa principalmente contra infecciones ocasionadas por streptococos del grupo A beta hemolítico, neumococos y estafilococos ( 66). Se prescribe con mucha frecuencia, ya que su dosis terapéutica presenta muy baja toxici-

cidad, no es alergénico ni daña la flora intestinal normal. También se usa en casos de hipersensibilidad a penicilina (45).

Actúa como bacteriostático sin embargo, en concentraciones de 50 a 1000 veces mayor puede ser bactericida (52). Su acción bacteriostática se debe a la propiedad que presenta como inhibidor de la síntesis de proteínas de las bacterias sensibles, no contra las células de los mamíferos. El mecanismo de inhibición se presenta por la capacidad del antibiótico para enlazar las sub-unidades 50 S ribosomales, de las bacterias que son sus blancos (89). Una unidad de eritromicina se enlaza con una sub-unidad 50 S a saturación (66), varias moléculas adicionales pueden ser enlazadas por separado a muy altas concentraciones del antibiótico; éstas indudablemente no están relacionadas con la acción biológica. La Eritromicina inhibe síntesis de proteínas después de la activación de aminoácidos y transferencia de estos al t RNA.

Los mutantes resistentes a Eritromicina (60), se han utilizado para definir el sitio específico de acción. En estas mutantes la resistencia al antibiótico se localiza en la región denominada "de estreptomycinina", muy probablemente en el sitio L4. Las mutantes resistentes a dicho antibiótico, tienen alterada la octava proteína de la sub-unidad 50 S ribosomal. La Eritromicina bloquea la poli A, dirigida a la incorporación de lisina, por la inhibición de la síntesis de péptidos (por alta polimerización)

de este aminoácido y estimulando la acumulación de pequeños oligómeros del mismo. Similares efectos se consiguen incorporando fenil alanina.

Los grupos funcionales de la molécula de Eritromicina relacionados con la interacción en los ribosomas, se han determinado, utilizando varios macrólidos y análogos que interfieren con el enlace de la Eritromicina marcada radiactivamente. Los dos azúcares son indispensables para la actividad biológica del antibiótico. Presenta mejor capacidad de enlace cuando posee los dos azúcares. Otros grupos importantes son : los hidroxil 11, 12 y 19, los dos hidroxil y 3 dimetil amina sobre la desosamina y el grupo 3 metoxi en la cladinosa ( 66).

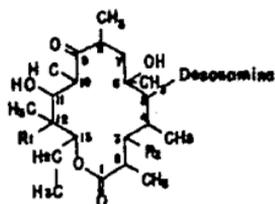
#### b. Estructura química de las Eritromicinas.

Se conocen cinco tipos de eritromicinas: A, B, C, D y E. Estas tienen en común un anillo lactónico polifuncional altamente sustituido. Un amino azúcar y un azúcar neutro. Su diferencia radica en los diferentes sustituyentes del anillo lactónico y los azúcares específicas que posee cada tipo de Eritromicina, como se aprecia en la figura siguiente.

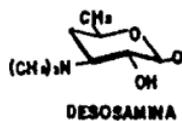
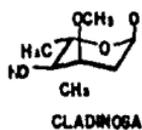
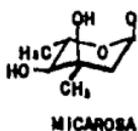
La Eritromicina A es la forma más común y ampliamente usada para la investigación clínica, por presentar mayor actividad antimicrobiana.

crobiana (55). También la Eritromicina E tiene probada acción antimicrobiana. El eritronolido B generalmente se utiliza como

FIG. 6. Estructura Química De Las Eritromicinas



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
ERITROMICINA A	OH	CLADINOSA
ERITROMICINA B	H	CLADINOSA
ERITROMICINA	OH	MICAROSA



agente antipirético ( 58 ).

c. Propiedades fisicoquímicas

La Eritromicina es un compuesto que forma cristales incoloros en cloroformo o acetona. Es una sustancia básica ligeramente soluble en agua y lábil en medio ácido, con un  $pK_a$  8.6, proporcionado por el grupo amino de la desosamina. Cuando se administra por vía oral, se hace utilizando ésteres capaces de resistir la acidez estomacal ( 66 ). La Eritromicina A tiene un peso molecular de 733,9. Punto de fusión entre 135-140 grados centígrados. Rotación específica  $[\alpha]_D^{25}$  73,5 en metanol y  $[\alpha]_D^{25}$  61,99 en etanol.

d. Biosíntesis.

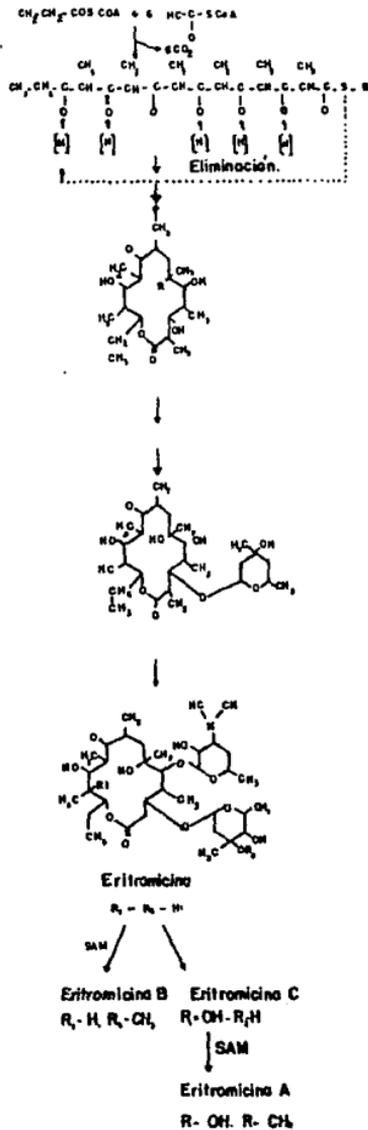
Existe una analogía entre la ruta metabólica que sigue la biosíntesis de la Eritromicina y la síntesis de ácidos grasos. La Eritromicina se forma por la condensación de una molécula de propionil coenzima A y 6 de 2 metil malonil coenzima A. La formación de propionil coenzima A, está precedida por la activación de la propionil cinasa y acil coenzima A fosfotransferasa. La energía libre necesaria para la síntesis del eritronólido se obtiene de las descarboxilaciones sucesivas de 2 metil malonil coenzima A durante las reacciones de condensación. La metil malonil coenzima A, puede derivarse de algunos aminoácidos : alanina,

valina, treonina, isoleucina, metionina ( 86 ).

La síntesis del desoxieritronólido requiere de un complejo multi-enzimático, no disociable y activado por flavin-mononucleótido y cofactores como el fosfato de nicotin adenin dinucleótido (NADPH) en mucho menor cantidad que en la síntesis de ácidos grasos ( 56 ). El 6 desoxieritronólido se hidroliza posteriormente, sufriendo dos glicosidaciones ( 90 ) y metilaciones antes de ser eritromicina biológicamente activa. El eritronólido B es el producto hidroxilado del 6 desoxieritronólido, se condensa secuencialmente con los azúcares micarosa y desosamina, para dar la Eritromicina D. El eritronólido B que es el intermediario, al ser nuevamente hidroxilado se transforma en Eritromicina C, que por metilación produce Eritromicina A ( 39 ). El papel de la metionina en la formación de Eritromicina A, se demostró en mutantes auxótrofos a metionina ( 66 ). La concentración de Eritromicina C en fase temprana de la formación del antibiótico es más o menos igual que la Eritromicina A, en la fase tardía la concentración de C declina. Los mutantes auxótrofos a metionina favorecen la formación de Eritromicina C.

A continuación tenemos un esquema propuesto por H. Grisebach, para explicar la biosíntesis de Eritromicina, según la siguiente secuencia de reacciones (Figura 7).

FIG 7. BIOSINTESIS DE ERITROMICINA.



e. Regulación de biosíntesis de Eritromicina.

Regulación por producto final. La biosíntesis de algunos antibióticos está inhibida por la acumulación del producto final (59). El cloranfenicol parece regular su propia síntesis (54). En estreptomicina y ristomicina los mutantes son mejores productores (103). En vías secundarias donde el metabolismo primario final es el precursor de un metabolito secundario, la eliminación de la retroregulación en la vía de biosíntesis del metabolito primario, tiene como resultado una mayor producción del secundario. Muchos caminos biosintéticos secundarios comparten intermediarios con las vías primarias, en tales casos la retroregulación de una de las enzimas tempranas por el metabolito primario, disminuiría la producción del secundario. La adición de lisina al medio de crecimiento de P. crysogenum, reduce la formación de penicilina (22).

En antibióticos macrólidos, en el caso especial de la Eritromicina, no se han reportado este tipo de resultados, pero se ha probado que estimula su propia producción. Concentraciones de 2 mg/ml de Eritromicina adicionados al cuarto día de la fermentación, aumenta casi en un 50% la velocidad de síntesis del antimio-

crobiano, en medio complejo (84).

En estudios realizados con aminoácidos (glicina, alanina, serina, valina, leucina y treonina) se obtuvieron los siguientes resultados : solamente la glicina se incorpora como fuente de Carbono y de Nitrógeno con aumento notable de la producción. Con los otros aminoácidos no se observó este fenómeno (incorporación como fuente de C y N) se detecta un aumento en la producción de biomasa pero no aumenta sensiblemente la producción del antibiótico.

Recientes estudios realizados en medios de cultivo comerciales para la producción de Eritromicina, mostraron dos aspectos importantes en relación con las fuentes de nitrógeno :

- a. La limitación de una de las fuentes de nitrógeno, como sulfato de amonio favorece la producción de Eritromicina.
- b. Se determinó que la úrea utilizada como fuente de carbono, solamente es adecuada en concentraciones menores a 1.2 g/l ( 77).

Regulación por fosfatos. Es necesario que algunas fermentaciones se lleven a cabo en concentraciones subóptimas de fosfato

(95), (23). Según Martín, 1977, la mínima concentración inhibitoria de fosfato inorgánico se encuentra entre 1 y 50 mM para diferentes antibióticos. Para el caso de Eritromicina 4 mM inhibe la producción (77).

Estimulación por Propanol. El propanol estimula la producción de Eritromicina, cuando es adicionado al medio de fermentación después de dos días de iniciarse la misma. Las concentraciones en que se adiciona debe ser inferior a 5 g/l; cuando se adiciona en concentraciones mayores o antes de iniciar el crecimiento, el efecto que se produce es de inhibición del crecimiento y por ende de la producción. Como precursor induce la actividad de la propionil coenzima A, carboxilasa de S. erythreus. Este efecto estimulador parece tener lugar a nivel de transcripción (71).

#### f. PRODUCCION DE ERITROMICINA POR FERMENTACION TRADICIONAL EN BATCH

La Eritromicina se obtiene a partir del Streptomyces erythreus, en un medio complejo industrial por fermentación en batch, durante 200 horas, con variables normalmente medidas y controladas, las cuales se resumen en la tabla 4.

Estudios desarrollados en el campo están orientados a obtener mayor

TABLA 4. VARIABLES NORMALMENTE MEDIDAS Y CONTROLADAS DURANTE EL CURSO DE UNA FERMENTACION DE ANTIBIOTICOS.

Contfnuamente	Discontfnuamente
Temperatura	Crecimiento, paquete micellar, material seco y constituyentes celulares.
Velocidad de agitación	
Velocidad de flujo de aire	
Presión	Producto formado
Temperatura	Consumo de nutrientes
Espuma	
Oxígeno disuelto	
Consumo de oxígeno	
Adición de nutrientes, ácido ,base y antiespumantes.	

productividad utilizando para ello el trabajo con ciertas variables que determinan la producción del antibiótico. Entre otros tenemos los siguientes :

Estudios sobre cinética de producción del antibiótico ( 64). Optimización de la producción controlando pH y temperatura, logrando aumentar en un 30% la productividad (110). El oxígeno disuelto es un factor importante a determinar, se sabe que para obtener mejor producción

de Eritromicina, es necesario eliminar la limitación de oxígeno durante la producción del inóculo. Esto puede alcanzarse aumentando la velocidad del impulsor preferiblemente (67). La demanda de oxígeno depende del consumo de sustrato, así el nivel de oxígeno disuelto puede ser guardado con límites predeterminados, escogiendo un apropiado flujo de sustrato. La presión en el fermentador es ampliamente utilizada para aumentar el oxígeno disuelto; sin embargo, una presión muy alta aumenta la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto, causando daño a las células (50).

La cantidad de inóculo influye cualitativamente en la producción de Eritromicina. Un aumento en la concentración de biomasa disminuye el  $K_{La}$  (28). Se comprobó también que hay autólisis del microorganismo - productor del antibiótico; ésta se indujo por deficiencia de oxígeno o variaciones de temperatura.

La agitación mecánica tiene gran influencia en la fermentación. Si se tiene una distribución uniforme de los componentes, facilita la transferencia de oxígeno, nutrientes y calor. También la morfología celular está determinada por la agitación; si es muy intensa parte el micelio en pequeños fragmentos, las hifas más largas se mantienen con una agitación más lenta; disminuyen la viscosidad. Las más cortas dan mayor viscosidad y mejor transferencia de masa (50).

### III. CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO

#### ASPECTOS GENERALES.

Para el desarrollo de este trabajo utilizamos una cepa de tipo industrial de un actinomiceto : Streptomyces erythreus, de alta productividad.

Los actinomicetos han sido considerados por los Bacteriólogos como bacterias y por los Micologistas como hongos; ahora se les acepta generalmente como bacterias.

Los actinomicetos tienen gran cantidad de grupos de bacterias, las cuales tienen en común hifas durante el crecimiento; aunque algunas especies las muestran únicamente en cultivo sólido. En el género Streptomyces los filamentos desarrollados son fuertes y muy raramente fragmentados. El micelio aéreo lleva generalmente cadenas de 50 esporas, pero en algunas especies estas son relativamente cortas, de 5 a 10 (19).

Las esporas son artrosporas formadas por septación regular de una hifa encerrada en una cubierta fibrosa. En algunas especies la cubierta persiste y cubre la espora desprendida. En otras las artrosporas ma-

durán con pérdida de la cubierta y se liberan de la cadena sin cubierta. Esta es responsable de la apariencia de las esporas.

Los Streptomyces tienen un olor a tierra característico; por el color del micelio aéreo se denominan por ejemplo niveus si es blanco, S.griseus si es gris, etc.

Todos los Streptomyces tienen la estructura típica de células procarióticas, no tienen membrana nuclear, ni mitocondria o retículo con polirribosomas. Las membranas están definidas como plasma membranas y ramificaciones de ellas, que forman una típica unidad, con 10 nm de diámetro, paralelo a la pared celular. Parecen ser otras bacterias Gram positivas, las superficies externas están cubiertas por pequeñas partículas. El material nuclear tiene finas fibrillas, el cual está situado generalmente en la región central de la célula. Pueden estar relativamente dispersos u organizados en agregados más compactos; las fibrillas generalmente se unen longitudinalmente a lo largo de la hifa. El material se divide en dos, previo a la delimitación de células o esporas. Las partículas ribosomales son numerosas en la mayoría de las células. Poseen además mesosomas (100).

Esporas. Las esporas se forman por reorganización del citoplasma y formación de nuevo material de pared celular. Se pueden clasificar de acuerdo con la cubierta; por la presencia o ausencia de ella en la pared de la hifa de la célula madre. La presencia de cubierta coincide

con la presencia de micelio aéreo. La cubierta tiene muy poco o no tiene efecto sobre la formación de esporas, pero puede influir en la determinación del camino por el cual las esporas se liberan. Ya sea por la fragmentación de la hifa sin cubierta como el caso de *Microspora*; O fragmentación de la hifa con cubierta en el caso de partículas de *Streptomyces*. Resultados de análisis realizados indican que la cubierta está compuesta de elementos finos fibrilares y material amorfo (46).

Las esporas maduras de *Streptomyces spp.* no se diferencian fácilmente de la forma vegetativa de las células en microscopio de contraste de fases, porque su coeficiente de refracción está cerca del que tiene la forma vegetativa. Se pueden diferenciar por tinciones selectivas o suspendiéndolas en agua; las esporas colorean más fácilmente.

La pared de la espora es aproximadamente 1.5 a 2.0 veces más gruesa que la de la célula vegetativa y se pueden distinguir dos o tres capas en algunos casos. Las paredes del micelio vegetativo en la mayoría de los *Streptomyces* son sensibles a la lisosima, pero las esporas parecen ser resistentes. Y las propiedades electroforéticas de las esporas cambian después del tratamiento con lisosima.

Es posible diferenciarlas además por la resistencia a la digestión en KOH en solución al 15%. Ni en esporas, ni en células vegetativas se han hallado ácidos teicoicos.

#### IV. CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Los microorganismos son formas de vida, con una gran capacidad de -- adaptación a diversas condiciones ambientales. Esta adaptación viene acompañada de la reorganización de estructuras macromoleculares, la inducción y/o represión de sistemas enzimáticos y relocalización del material celular. La composición de la célula varía en función de temperatura, pH, fuerza iónica y nutrientes que están en el medio. La limitación de alguno de los nutrientes puede hacer que cambien algu--nas acciones metabólicas de la célula. En la Tabla 5 (descrita por Daniel L.C.Wang et al (1978) (94), puede apreciarse algunos fenómenos que acontecen cuando limitamos una fuente de nutrientes específica.

TABLA 5. LIMITACION DE NUTRIENTES Y SU POSIBLE MODO DE ACCION.

Nutriente limitado	Medio de acción
Fuente de Carbono	Restringe la disponibilidad de C, para biosíntesis de energía.
Nitrógeno o sulfuro	Restringe síntesis de proteína
Fosfato	Restringe síntesis de ácidos nucleicos y/o producción de energía.
Magnesio o Potasio	Restringe síntesis de ácidos nucleicos o pared celular y/o estructura de membrana o permeabilidad.

Basados en esta hipótesis es de esperarse que limitando un nutriente apropiado, puede restringir alguna actividad metabólica, mientras se continúan las otras a la misma velocidad.

Si observamos la composición celular, podemos tener una imagen de los requerimientos que se deben tener en cuenta para un cultivo celular. Un microorganismo cosechado en fase exponencial, tiene en peso seco los siguientes componentes :

DNA	2 a 3 %
RNA	10 a 15%
Proteína	40 a 60%
Polisacáridos	15 a 20%
Lípidos	10 a 15%

Según Pirt 1975, hay cinco requisitos fundamentales para el crecimiento de un microorganismo en un cultivo :

1. Fuente de energía
2. Nutrientes para proveer de los materiales esenciales de los cuales se sintetiza biomasa.
3. Ausencia de inhibidores que eviten el crecimiento
4. Inóculo viable
5. Condiciones fisicoquímicas óptimas.

Para diseñar un medio de cultivo es necesario tener en cuenta el metabolismo primario y secundario del microorganismo; desafortunadamente es muy raro que se puedan tener estudios completos de tales metabolismos. El medio debe responder hasta donde sea posible, a los requerimientos del microorganismo. Debe tener :

Fuente de Nitrógeno : Debe haber suficiente nitrógeno disponible para la producción de biomasa. Muchos microorganismos utilizan Nitrógeno inorgánico en forma de nitrato de amonio, pero en estos casos generalmente se estimula el crecimiento adicionando nitrógeno orgánico.

Fuente de energía: Generalmente constituida por carbohidratos o lípidos, pero el esqueleto de carbono de la fuente de nitrógeno también contribuye.

Medio de producción : No basta el diseño de un buen medio de crecimiento para obtener una producción adecuada, el medio de fermentación debe inducir la producción del metabolito secundario; para ello deben limitarse nutrientes, como el control de carbohidratos, la limitación por Nitrógeno es menos común.

Es importante tener en cuenta que el balance C/N es un factor que influye en la fermentación, permitiendo controlar el crecimiento y la

producción del antibiótico. La adición de precursor es obvio que posibilita el estímulo del metabolismo secundario, aunque para ello es indispensable el conocimiento de la secuencia bioquímica. En conclusión, el diseño de un medio óptimo debe reunir las siguientes condiciones:

- a. Satisfacer las demandas nutricionales del microorganismo.
- b. Que sea barato
- c. Que pueda ser sustituido por materias primas de contenido químico similar, para producción industrial.

## V. Inmovilización

La inmovilización de células como nuevo sistema de bioconversiones ha despertado mucho interés en los últimos diez años. Su investigación se ha orientado a la optimización de procesos en Biotecnología. Entre los cuales se podrían mencionar los siguientes:

Reacciones monoenzimáticas. Tales como degradación, hidrólisis, isomerización, etc.

Reacciones multienzimáticas. En las cuales se requiere que esté en completa actividad la maquinaria metabólica celular. Como en el caso de los antibióticos y producción de alcohol.

Estos sistemas ofrecen ventajas, entre las cuales se pueden relieves:

- a) No es necesario purificar la enzima
- b) No se requieren cofactores
- c) No se pierde mucha actividad
- d) Se puede operar a altas tasas de dilución sin que se produzca wash-out.
- c) Hay posibilidad de acelerar la reacción, debido al incremento de la concentración celular por unidad de área.

Las células inmovilizadas se pueden considerar en estado estacionario

inducido por deficiencia de nutrientes. La estabilidad de estos sistemas depende de las enzimas involucradas en estos procesos sintéticos; así las células sólo pueden ser mantenidas por períodos de tiempo determinados con toda su actividad metabólica presente. La inactivación se puede producir por desnaturalización de enzimas, pérdida de metabolitos intermediarios, escasez de nutrientes, inhibición por otros metabolitos; variaciones de pH, presión osmótica en torno a las macromoléculas.

#### MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN

Los Métodos de inmovilización de células, son básicamente los mismos métodos utilizados en inmovilización de enzimas.

En la Tabla número 6, está la clasificación de las técnicas utilizadas para inmovilizar, factores que influyen en cada caso y algunos soportes utilizados. La Figura 7A, da una visión más gráfica de los fenómenos que se suceden.

Dichos métodos se pueden clasificar de la siguiente manera:

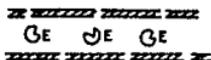
##### 1. Adsorción:

La adsorción de células engloba la formación de un gran número de uniones por puentes de hidrógeno.

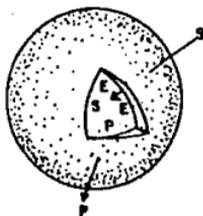
T A B L A No. 6

## METODOS DE INMOVILIZACION PARA CELULAS

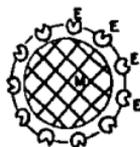
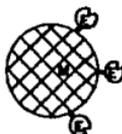
TECNICAS DE INMOVILIZACION		FACTORES QUE INFLUYEN	SOPORTES
ADSORCION	Propiedades Celulares	Composición de pared celular Carga Edad Características de crecimiento	Cerámica Tezontle Vidrio
	Propiedades del soporte	Composición Carga superficial Area de superficie pH	
ATRAPAMIENTO	Propiedades Celulares	Estructura celular uniforme	Agar Alginatos Carragenina Celofán Acrilamida
	Propiedades del soporte	Tamaño Forma de gelificación pH	
ENLACE COVALENTE	Propiedades Celulares	Composición de pared celular y carga	Isocianato Aminosilanos Glutaraldehido
	Propiedades del soporte	Grupos funcionales y carga superficial	



A T R A P A M I E N T O



E N C A P S U L A C I O N



E N T R E C R U Z A M I E N T O

E N L A C E   C O V A L E N T E



A D S O R P C I O N

La adsorción depende de la naturaleza de la carga de la pared celular la cual está distribuida, de acuerdo a los grupos amino y carboxilo. Es inespecífica y la estabilidad está determinada por la velocidad de desorción de las células del soporte; este fenómeno se ve incrementado por cambios de pH o por fuerza iónica; cuando se adsorben las células solo en la superficie del soporte, también por fluído rápido o por contacto con burbujas de aire se sueltan. Es desventajoso el hecho de que sólo un número pequeño de las células expuestas al soporte se inmovilicen. Una ventaja es la recuperación del catalizador por desorción cambiando bruscamente el pH o la fuerza iónica.

## 2. Atrapamiento.

### a. Atrapamiento en geles:

Este sistema se ha desarrollado en hidrogeles; es una técnica comúnmente aplicada, versátil y puede utilizarse en cualquier tipo de células. El atrapamiento puede realizarse por enlace covalente como es el caso de la poliacrilamida; por fuerza iónica como la inmovilización en alginato de calcio. Los poros de la matriz que tiene atrapadas las células, deben ser suficientemente grandes para permitir una difusión razonable de los componentes del medio de cultivo hacia el interior y del producto hacia afuera.

b. Encapsulación:

Las células son retenidas dentro de una membrana semipermeable, que permite al sustrato y al producto difundirse con relativa libertad.

3. Enlace Covalente

Las células se acoplan directamente a un soporte activado. La unión puede hacerse a cualquier componente reactivo de la superficie celular; amino, carboxilo, sulfidrilo, imidazol o grupos fenólicos de proteínas que también pueden ser utilizados. Tienen la ventaja de que las uniones a la superficie, se hacen por un enlace estable por largos periodos de tiempo, así el rompimiento celular está minimizado.

Los Soportes

Los soportes para inmovilización de células, deben poseer características importantes como son:

a. Resistencia a la degradación microbiológica:

Los soportes ricos en fuente de carbono como el almidón, o ricos en fuente de nitrógeno como las proteínas son potencialmente buenos nutrientes para los microorganismos.

b. Estabilidad térmica:

Debe resistir las temperaturas de operación sin alterar su configuración.

c. Forma y tamaño de partícula:

Estas dos características tienen su máxima importancia con respecto a la operación de los reactores.

Las partículas grandes disminuyen la caída de presión y la difusión e impide que los nutrientes lleguen a las células. Con partículas de tamaño grande se desaprovecha la actividad de la mayor parte de las células inmovilizadas.

d. No debe reaccionar con el producto:

e. Debe ser de fácil adquisición, manejo y en la medida de las posibilidades que se puedan reactivar las células.

f. La resistencia mecánica

## VI. Reactores

Biorreactores: Son recipientes en los cuales se llevan a cabo reacciones bioquímicas, ya sea de enzimas libres o por células microbianas

La selección del reactor depende de algunos criterios específicos (109)

1. Propiedades físicas y químicas del medio de cultivo
2. Naturaleza del material del soporte
3. Tipo de células inmovilizadas
4. Tipo de reacciones que se llevan a cabo
5. Naturaleza del producto de reacción

Para el diseño del reactor se debe tener en cuenta además de las características arriba enumeradas: el flujo, las características de mezclado, el modo de operación, la concentración de reactantes también juega un papel importante, en el caso de reacciones enzimáticas.

Los reactores biológicos se clasifican según su modo de operación y características de flujo de la siguiente manera (115).

## \* REACTORES BIOLÓGICOS

FORMA DE OPERACION	CARACTERISTICAS DE FLUJO	TIPO DE REACTOR
I Intermitente	Mezclado perfecto	Reactor tanque agitado
II Continuos	Flujo pistón	Columna empacada Columna fluidizada Tubo enzima Enzima capa fina Fibra porosa
	Mezclado perfecto	Un solo reactor tanque agitado continuo (CSTR) o múltiple (CSTR)

\* (115)

Tanque agitado:

Es el tipo más simple, está constituido por un tanque y un agitador. Puede ser tipo Batch o continuo.

Los reactores tipo Batch se cargan una sola vez y se cosecha al final. El Batch es un sistema cerrado con respecto al cambio de materia con el medio ambiente (6).

En los reactores continuos, hay alimentación y salida continua, es un sistema abierto con respecto al cambio de materia por el medio ambiente.

### Columnas empacadas.

Son las más ampliamente usadas para células y enzimas inmovilizadas , según la forma como fluye el sustrato, pueden ser de tres tipo:

Flujo ascendente

Flujo descendente, y

Recirculación

### Reactores de lecho fluidizado.

El líquido fluye a través de las partículas sólidas. La máxima velocidad de flujo es el punto en el cual todas las partículas se resuspenden en el flujo de gas.

La biofluidización ha sido definida como la aplicación de principios básicos de fluidización a bioprocesos donde se usan microorganismos completos o células libres. En la literatura hay tres áreas de aplicación (5).

1. Enzimas inmovilizadas sobre una matriz sólida.
2. Biofluidización de cultivos puros de células inmovilizadas sobre una matriz sólida.
3. En tratamiento de desechos.

Reactores de flujo continuo con tanque agitado: En el vaso se agita vigorosamente, se mezcla para tener composición uniforme. La concentración de oxígeno disuelto es la misma a través de la fase líquida. Una lógica similar puede aplicarse para la transferencia de calor, problema ocasionado por el crecimiento microbiano, el vaso agitado puede remover adecuadamente el calor equipado con un buen controlador de temperatura. El sustrato se hace pasar del tanque agitado a la columna donde se hallan las células inmovilizadas.

## OBJETIVOS

1. Producir Eritromicina por el método de inmovilización de células completas. Utilizando un soporte que permita a las células atrapadas mantener todas sus funciones metabólicas, para producir el antibiótico.
2. Comparar el método de producción de Eritromicina, por células inmovilizadas vivas, con la producción por fermentación tradicional en Batch.
3. Optimizar el nuevo método, con el propósito de disminuir los costos de producción, para poderlo aplicar en mayor escala.

## METODOLOGIA GENERAL

El esquema general de trabajo se desarrolló considerando los siguientes aspectos fundamentales :

1. Caracterización del microorganismo
2. Inmovilización
3. Operación de reactores.

### 1. ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO.

Antes de iniciar el proceso de inmovilización, debe haber familiarización con el manejo del microorganismo : mantenimiento de la cepa, características de esporulación y medios de cultivo. Buscar condiciones ambientales adecuadas : pH, temperatura y aireación. Seguir la curva de crecimiento del microorganismo, midiendo producción del antibiótico y consumo de sustrato (azúcares).

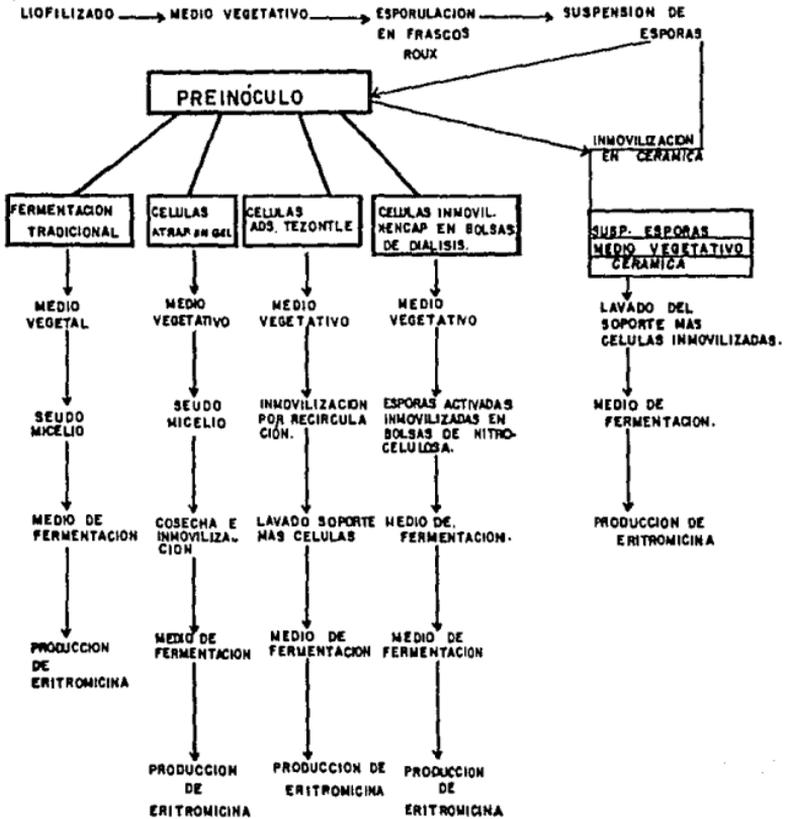
Está claro que debe buscarse la edad del cultivo óptima para la inmovilización del microorganismo. Hay una correlación entre la edad del

cultivo y la actividad de las células inmovilizadas. Los resultados de estos experimentos están reportados en el Capítulo de CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO.

## 2. INMOVILIZACION.

Para desarrollar este aspecto nos apoyamos en los datos obtenidos en la primera parte del trabajo. Los métodos de inmovilización utilizados, los soportes, y las características particulares de cada proceso están descritas en el Capítulo de INMOVILIZACION. Nos importa destacar aquí el esquema general sobre el cual edificamos nuestro trabajo. Ver el siguiente esquema.

3. OPERACION DE REACTORES. Una vez las células se inmovilizaron, se eligieron los reactores más apropiados para este tipo de fermentación. Los reactores deben estar diseñados de tal manera que tanto el sustrato como el oxígeno estén al alcance de las células. En nuestro trabajo damos cuenta de tres tipos de reactores utilizados, de acuerdo con el soporte y sistemas de inmovilización.

FIG. 8 ESQUEMA DE TRABAJO

## MATERIALES Y METODOS

Microorganismos : Para el desarrollo de este trabajo se utilizó Streptomyces erythreus, colección del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, cepa de alta productividad.

El microorganismo empleado para valorar el antibiótico fue Sarcina lutea NRRL-13-1018, obtenida del Agricultural Research Service Culture Collection y conservado por el Northern Regional Research Laboratory en Peoria, Illinois.

Preservación de la cepa : El S. erythreus fue preservado en tubos de cultivo 16 x 150 mm, con tapa rosca, en medio sólido inclinado de agar nutritivo a 40°C.

La Sarcina lutea se preservó en medio de cultivo agar cerebro corazón, en tubos de cultivo 16 x 150 mm con tapa rosca a 40°C.

Esporulación de Streptomyces erythreus : Se usaron placas y frascos Roux con medio sólido. Las placas se inocularon por estrías, los frascos Roux con suspensión de esporas activadas a 37°C a 220 rpm, en medio líquido. Se incubaron a 37°C por 9 días, al término de los

cuales la esporulación fue completa. Se cosecharon con perlas de vidrio para obtener suspensiones estándar.

Medio de cultivo completo para Streptomyces erythreus.

Extracto de malta            10 g

Extracto de levadura        4 g

Glucosa                        4 g

Agar                             2 g

Agua destilada:

cantidad suficiente para: 1 litro

pH - 7.3 antes de esterilizar.

Medio de Crecimiento Producción: Para crecimiento y producción de biomasa, utilizamos el mismo medio de cultivo, pero líquido. Este medio de cultivo se empleó siempre que se necesitó biomasa para inmovilizar o en caso de activación de esporas.

Medio de Producción: El medio con el cual trabajamos en la producción de Eritromicina en todos los sistemas de inmovilización, incluyendo los experimentos realizados para saber a qué edad deben cosecharse las células para inmovilizar.

Extracto de malta            10 g

Extracto de levadura        4 g

Agua destilada csp            1 litro  
pH antes de esterilizar    7.3

Las condiciones de crecimiento y producción se describen en el siguiente Capítulo.

Equipo :

- Fotocolorímetro marca Baush & Lomb, Spectronic 20
- Centrífuga marca Savat con regulación de velocidad y tiempo.
- Potenciómetro Corning modelo 125
- Cuarto de temperatura constante equipado con agitadores rotatorios alternantes.
- Autoclave
- Campana de flujo laminar horizontal.

El equipo utilizado con el diseño de reactores se detalla en el Capítulo respectivo.

Reactivos y Materias primas.

Todos los reactivos de análisis y los medios de cultivo fueron marca DIFCO. La kappa Carragenina grado industrial, obtenida de un distribuidor de materias primas.

Métodos de análisis (Ver las técnicas en el Anexo).

### 1. Valoración de Eritromicina.

La Eritromicina se determinó por dos métodos, Colorimétrico basado en el desarrollo de una coloración intensa en presencia de ácido sulfúrico 27N, el cual tiene su máxima absorción a 484 nm.

El segundo método : por difusión en gel, es un método biológico que tiene su fundamento en la inhibición del crecimiento de un microorganismo sensible al antibiótico.

### 2. Determinación de azúcares.

Se realizó por el método de antrona . El principio de esta reacción es la condensación del antronolol, el cual reacciona con ácido sulfúrico creando un derivado del furfural de los azúcares presentes. Los amino azúcares N-acetil-amino azúcares no reaccionan con este reactivo.

### 3. Determinación de biomasa.

Se realizó por tres métodos.

Paquete micelial : Basado en el principio del hematocrito. Se mide el porcentaje de biomasa en un tubo graduado después de centrifugar.

Densidad óptica : Se mide la variación en absorbancia, a medida que se va incrementando el crecimiento celular.

Peso seco : Se hizo con membranas Millipore con un poro de 0.45  $\mu$ .

4. Para la inmovilización en Kappa Carragenina se siguió la técnica de Tetsuy B, Tosa et al, (109), modificada por nosotros para no curtir, dando mayor consistencia al gel, trabajando con diferentes buffers.

5. Inmovilización en Cerámica.

Se crecieron las células en presencia de medio de cultivo y soporte. Luego se lavó de manera suficiente, basta probar que no quedaban células libres, controlando con siembras en medio de cultivo.

6. Inmovilización en Tezontle .

Se hizo creciendo células y se inmovilizaron recirculándolas en el soporte, lavado y recirculación de medio de fermentación.

7. Inmovilización por encapsulación en bolsas de diálisis.

Se inmovilizaron esporas activadas, en las cápsulas colocadas en medio de cultivo con temperatura y agitación controladas.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

## CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO

- Se utilizó una cepa de alta productividad de Streptomyces erythrus, colección del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Desarrollo experimental

Para iniciar el trabajo experimental fue necesario conocer algunas características de comportamiento del microorganismo como son :

1. Características de esporulación
2. Características de crecimiento y producción del antibiótico
3. Condiciones para producción de biomasa en medio completo.

Todos los experimentos se desarrollaron por duplicado a dos temperaturas : 29 y 37 grados centígrados. De acuerdo con los datos reportados en la literatura, se realizó el diseño de este trabajo.

Esporulación : El microorganismo se sembró en medio selectivo completo

para Streptomyces erythreus.

Extracto de levadura	0.4 g
Extracto de malta	1.0 g
Bacto dextrosa	0.4 g
Bacto agar	1.5 g
Agua destilada c.s.p.	100 cc

pH antes de esterilizar : 7.3. Se ajustó con NaOH en solución 0.1N.

Medio sólido

a.	Se incubaron a 29°C	luz oscuridad
	34°C	luz oscuridad

durante 9 días.

Resultados : El crecimiento más rápido y la mejor esporulación se obtuvo a 37°C en la oscuridad.

- b. Se creció en frascos Roux con diferentes concentraciones de agar. Se puede decir que el microorganismo presenta buen desarrollo y esporulación en las concentraciones de 1.5, 2.0 y 3.0

por ciento de agar, aún sin ser cubiertos.

- c. Un experimento colateral fue crecer en una base de agar en matrices planas de dos litros Fembach. Se observó que se pueden contaminar con mayor facilidad, además es difícil observar el crecimiento del microorganismo; en los frascos Roux es más factible y disminuyen los riesgos de contaminación.

#### Desarrollo de los microorganismos en medio líquido.

Se hizo un cultivo en medio líquido así: En un Fembach con un litro de medio completo para S. erythreus, se colocó un preinóculo de 50 cc crecido a 37°C durante 24 horas. El cultivo se incubó a 37°C, con agitación constante de 225 rrp, durante 60 horas. Hubo buen crecimiento y se observó coloración café rojiza característica. El micelio crece muy desglosado y delgado, la recuperación del micelio se hizo por centrifugación a 9000 rpm en un rotor GSA, con buena pelétización.

#### CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION.

Se procedió a hacer una curva de crecimiento en las siguientes condiciones :

Tiempo total de crecimiento :	100 horas
Temperatura :	37 y 39°C
pH inicial antes de esterilizar:	7.3

Agitación	225 rpm
Volumen real	1 litro
Alícuotas de muestra	10 ml cada 8 horas
Tiempo de esterilización	20 minutos
Medio de cultivo	Medio completo para <u>S. erythreus</u> .
Volumen del Matraz	2.8 litros

### Procedimiento .

Se trabajó por duplicado, partiendo de un pre-inóculo de 50 ml, crecido durante 24 horas. En cada litro de medio se colocó el pre-inóculo; el cultivo se incubó con agitación constante. En cada temperatura se trabajó con cuatro matraces; dos se sembraron a las 0 horas y dos cuando los primeros tenían 12 horas de crecimiento, lo que nos permite ver el crecimiento durante todo el tiempo.

La toma de muestra se hizo en forma estéril y se procesaron de la siguiente manera :

En un tubo de centrifuga graduado se toma una alícuota de 10 ml exactamente medidos, se centrifuga a 3000 rpm, durante 10 minutos, para medir biomasa por el método de paquete micelial (Packing mycelial volume). El precipitado se resuspende en agua destilada, para determinar biomasa por densidad óptica. Con el sobrenadante de la primera centrifugación se puede determinar : producción de Eritromicina , pH y consumo de azúcares. (Tabla 7 y Gráfica 1).

TABLA 7. DATOS DE UNAFERMENTACION EN MEDIO VEGETATIVO

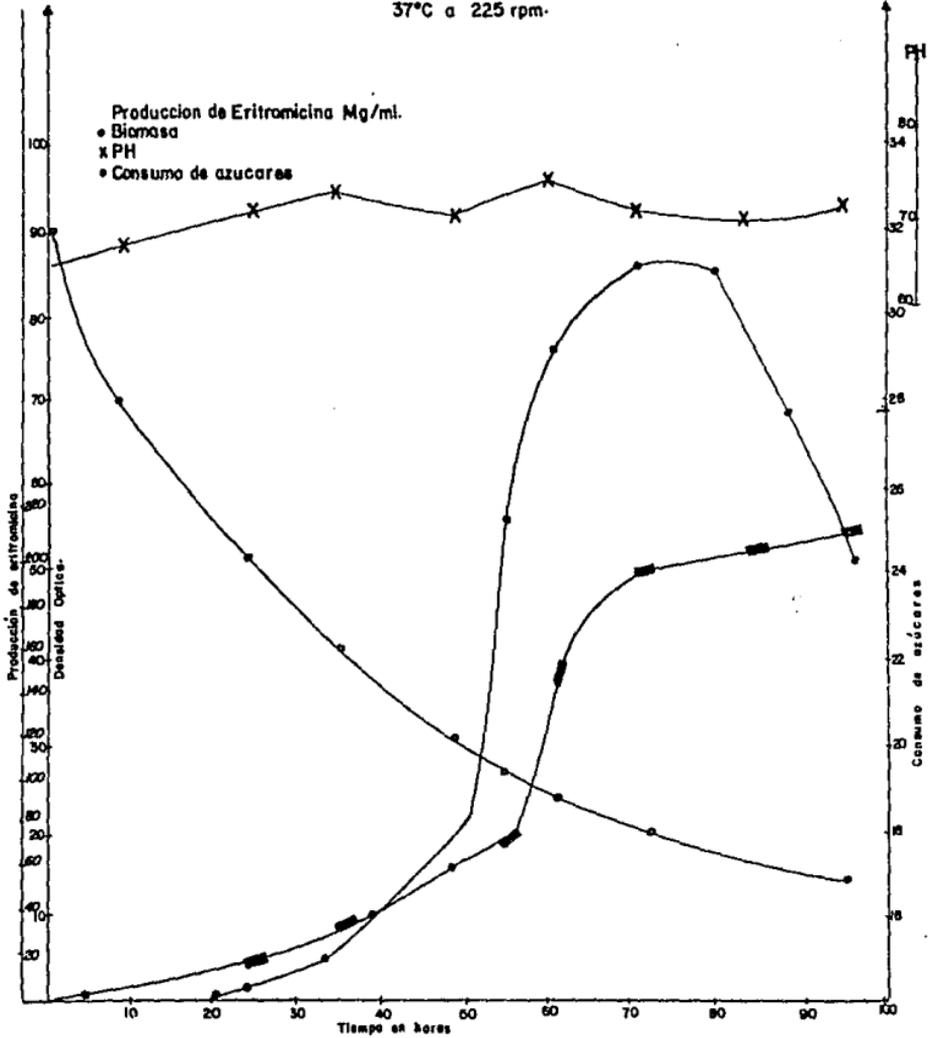
37°C

Velocidad de agitación: 225 rpm.

Tiempo horas	Densidad óptica 540 nm	pH	Consumo de azúcares $\mu\text{g/ml}$ .	Producción de Eritromicina $\mu\text{g/ml}$
0	0.045	6.71	32.000	-
8	0.045	6.64	28.100	-
24	0.060	7.43	24.300	10
36	0.150	7.67	22.300	40
48	0.750	7.61	20.300	60
54	5.500	7.86	19.500	80
60	6.800	7.89	18.500	160
72	9.00	7.12	18.00	200
96	5.50	7.15	16.700	205

GRAFICA 1. FERMENTACION EN MEDIO VEGETATIVO

37°C a 225 rpm.



## ESTUDIOS PRELIMINARES.

Edad a la que se debe inmovilizar el Micelio. El objetivo de este experimento fue determinar la edad a la cual debía cosecharse el micelio para que continúe la producción del antibiótico.

Es conocido, tanto a través de la literatura, como con nuestros resultados experimentales, que la producción se incrementa al final de la fase exponencial del crecimiento y es óptima en la fase estacionaria; experimentos anteriormente reportados demuestran que ésta se inicia aproximadamente a las 26 horas. Debe por lo tanto buscarse un tiempo de cosecha entre las 26 horas que se inicia la producción y las 50 horas en la cual se inicia la lisis celular.

Diseñamos este experimento cosechando el micelio a las 26, 36 y 48 horas y se midió la producción del antibiótico a diferentes tiempos, como puede observarse en la Tabla 8 de resultados. (La técnica se puede ver en el Anexo).

Resultados. Los resultados de este experimento se pueden apreciar más fácilmente en la gráfica número dos. El micelio cosechado a las 26 horas no aumenta la producción del antibiótico después de la cosecha y posterior transferencia al medio de fermentación lo que indica que se afectan los procesos metabólicos celulares, de tal forma que durante todo el tiempo que se tomaron muestras no hubo

recuperación.

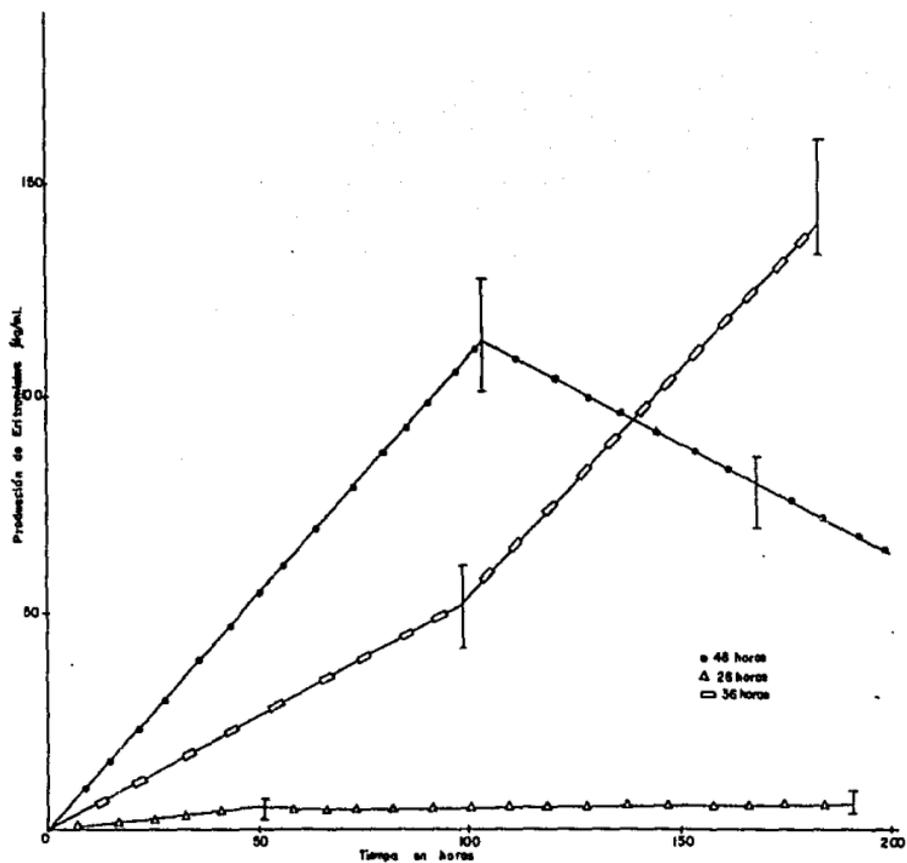
El micelio cosechado a las 48 horas, más rápidamente llega a una mejor producción, pero decae en la etapa subsiguiente.

El micelio cosechado a las 36 horas presenta una producción más continua y siempre en ascenso, hasta alcanzar una producción superior a la que cosechamos a las 48 horas, aunque en mayor tiempo. Se decide entonces que si se desea inmovilizar micelio debe hacerse cosechándolo a las 36 horas.

TABLA 8. EDAD DEL MICELIO A INMOVILIZAR

Edad de cosecha del micelio en horas	Tiempos en los que se midió producción horas	Producción de Eritromicina $\mu\text{g/ml}$	
		1er. experimento.	2o. experimento
26	92	4.35	4.76
		4.80	5.90
36	97	60.1	39.15
		67.2	41.16
48	104	100.6	127.1
		100.6	127.1
26	188	4.50	7.76
		4.55	7.99
36	183	134.6	145.6
		131.7	155.9
48	166	70.5	93.4
		69.5	84.3

GRAFICA 2. EDAD DE COSECHA DE LAS CELULAS  
PARA INMOVILIZAR.



MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN Y SOPORTES

Los métodos de inmovilización y soportes se eligieron de acuerdo con las condiciones exigidas por el proceso:

1. Mantener activa toda la maquinaria metabólica celular
2. Permitir una buena transferencia de masa.
3. Resistencia mecánica, la cual evita que se alteren las propiedades fisicoquímicas del soporte o haya desprendimiento celular.
4. Evitar tratamiento con sustancias químicas que alteren la vida celular
5. El soporte no debe reaccionar con el producto, ni alterar sus propiedades fisicoquímicas.
6. Soportar las temperaturas y pH requeridos para el proceso.

Los métodos de inmovilización de células utilizadas para el desarrollo de este proyecto y los soportes fueron los siguientes:

- A) Atrapamiento en gel: Se utilizó kappa carragenina como soporte y las células en forma de micelio lavado.
- B) Adsorción:                    En Cerámica: creciendo las células en presencia del soporte y con agitación.  
   Tezontle: inmovilizando el micelio por recirculación.

- C) Encapsulación: Se utilizaron sacos de nitro celulosa o colodión inmovilizando esporas activas.

Los reactores que se diseñaron en cada uno de los casos están descritos en el capítulo correspondiente.

### INMOVILIZACION EN GEL DE KAPPA CARRAGENINA

Se eligió este método de atrapamiento en gel, utilizando como soporte kappa carragenina, porque estudios realizados confirman que las células permanecen viables y pueden multiplicarse en el gel; aunque se detectó también que hay disminución de células en la inmovilización ( 30 ).

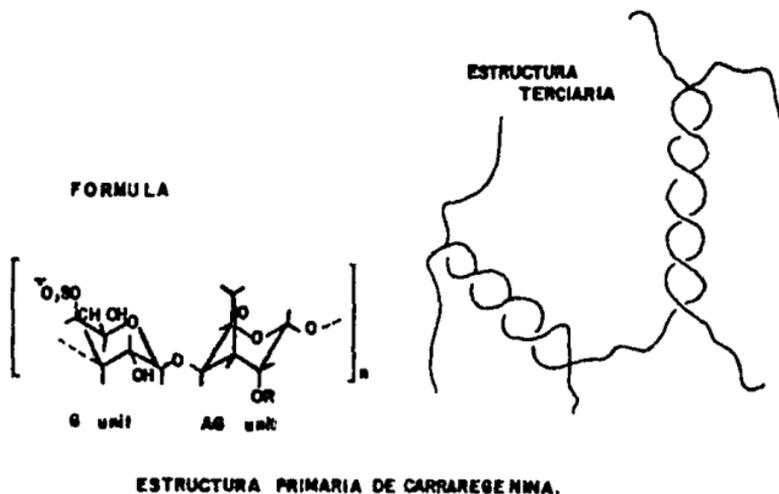
Estudios comparativos de células inmovilizadas en policrelamida (ampliamente utilizada) y kappa carragenina arrojaron mejores resultados para el caso de kappa carragenina con las siguientes ventajas (109):

- Igual o mejor actividad, mejor estabilidad en el curtido, mayor resistencia, susceptible de mejorar la gelificación con diferentes iones.
- No es necesario el tratamiento con sustancias químicas que cambien la estructura química de las células microbianas.
- Fácil consecución, bajo costo y el tamaño de poro que deja el gel, previene el paso de macromoléculas, como proteínas, en otras que puedan destruir el gel y deja circular compuestos de bajo peso molecular.

### CARACTERISTICAS DE LA INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN GEL DE KAPPA CARRAGENINA

La kappa carragenina es un polisacárido natural, con variada densidad de carga. Es estereo regular ( -A -B )<sub>n</sub>, colpolímero -- (1 — 3) - O B D galacto piranosil (1 — 4) O 3,6 anhidro galacto piranosil con varias cantidades de sulfato Fig. 11

FIG. 11 ESTRUCTURAS DE LA kappa Carragenina



La estructura secundaria y terciaria es un polisacárido de doble hélice (74).

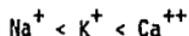
Las cadenas se unen por formación de doble hélice dando una estructura tridimensional, los intersticios son ocupados por agua y pequeñas moléculas o iones. Esta estructura se hincha por ósmosis.

La estructura cuaternaria : Se da por unión a cadenas cooperativas como galactomanosa, en condiciones donde podría no ser estable e incluir cambio de configuración.

Las variaciones de parámetros como temperatura, pH y concentración iónica pueden inducir cambios conformacionales o asociación molecular caracterizada por la anisotropía de la solución y movilidad restringida de segmentos (79). La formación del gel disminuye la movilidad de unidades monoméricas o segmentos de la cadena con interacciones ampliamente dipolares. El ordenamiento de las moléculas en forma helicoidal, incrementa la rotación óptica.

Se estudiaron los efectos de algunos iones en la gelificación de kappa carragenina y se demostró que la fuerza del gel depende de la estabilización. Este grado de ordenamiento se incrementa con algunos iones a temperaturas bajas. El grado de influencia está dado por  $K^+ > Ca^{++} > Na^+$  para kappa carragenina (76).

También se demostró que la temperatura de fusión del polímero se incrementa con iones en el orden siguiente :



#### DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para la inmovilización de células de Streptomyces erythreus utilizamos la técnica de Tetsuy Atosa (109).

Con base en experimentos previos, ya reportados, las condiciones de

inmovilización fueron las siguientes :

Las células utilizadas para la inmovilización se obtuvieron partiendo de un preinóculo de esporas activadas durante 24 horas en medio completo para Streptomyces erythreus, a 220 rpm, a 35°C en matraces de 125 ml, con 50 ml de medio de cultivo. Cada preinóculo fue transferido a un matraz Fernbach de dos litros con 1 litro del mismo medio, crecidos en iguales condiciones que el preinóculo en cuanto a agitación y temperatura, pero se cosecharon a las 36 horas por centrifugación a 9000 rpm. El pH se ajustó a 7.5 antes de esterilizar. Este trabajo se realizó en condiciones de esterilidad.

Capacidad del soporte : La capacidad del soporte se determinó para definir qué cantidad de células es posible inmovilizar sin que se altere notablemente la contextura del gel. Es decir, debe buscarse la mayor cantidad de células que pueda retener el soporte.

TABLA 9. CAPACIDAD DEL SOPORTE

Peso húmedo de células de <u>S.erythreus</u>	Peso seco	Gelificación
10 g	1.0 g	Buena textura del gel
15 g	1.5 g	Buena textura del gel
20 g	2.0 g	Mala textura del gel

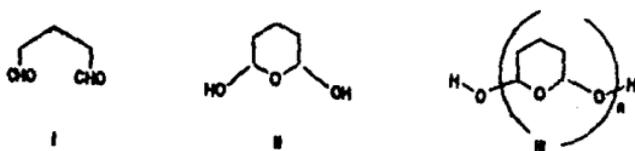
Se utilizaron entonces 15g de peso húmedo de células por 3.5g de Kappa Carragenina, se completó a 100 g con buffer de fosfatos.

#### CURTIDO DE CELULAS INMOVILIZADAS

Se determinó la cantidad óptima de curtiente, como la mínima concentración del mismo que proporcione la mayor estabilidad y resistencia mecánica, sin producir daño en las células.

Se utilizó como curtiente glutaraldehído (1-5-pentano-dial). La reacción es de polimerización en medio alcalino en solución acuosa. Esta reacción depende exponencialmente de la temperatura y el pH. Las reacciones del glutaraldehído en solución acuosa se utilizan para modificaciones químicas y estabilización de proteínas. En la Figura se aprecian las diferentes formas en que se encuentra. Las formas I y II están en equilibrio con la III (72).

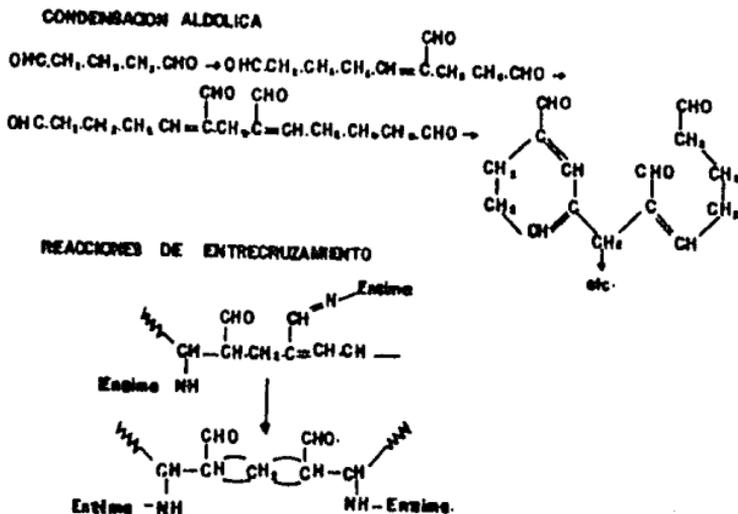
FIG.12 FORMAS EN EQUILIBRIO DEL GLUTARALDEHIDO EN SOLUCION ACUOSA



Es de esperarse que la reacción entre un grupo amino y un aldehído de una base de Schiff. Estas bases son estables en un rango de pH menor que en reacciones glutaraldehído-proteína. La razón de tal comportamiento fue discutida por F.M. Richards et al, (75) quienes descubrieron en el glutaraldehído la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -aldehídos insaturados, responsables de entrecruzamientos con proteínas. En la Fig.13 se aprecian las reacciones con proteínas y condensaciones aldólicas.

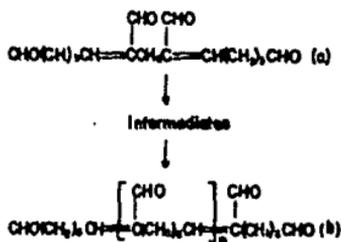
#### REACCIONES DE GLUTARALDEHIDO CON PROTEINAS Y CONDENSACION ALDOLICA

FIG. 13:



En el siguiente esquema se ve la polimerización en medio alcalino.

FIG.14 ESQUEMA DE POLIMERIZACION DEL GLUTARALDEHIDO EN SOLUCION ACUOSA EN MEDIO ALCALINO. POLIMERO TIPO ALDOL.



Se demostró la presencia de un polímero tipo aldol en solución alcalina, que reacciona con proteína al aumento de la temperatura. A medida que se aumenta el pH y tiempo de exposición, se desprenden los grupos aldehído. La pérdida de reactividad de estos grupos en solución alcalina provoca una disminución de la actividad bactericida (63).

Se postuló que hay dos factores que gobiernan la actividad de la reacción en medio alcalino; la distancia entre los grupos aldehído y su tendencia a polimerizarse (16).

En los sistemas inmovilizados se ha utilizado la reacción en medio alcalino, puesto que ofrece menos riesgos de daño celular.

El curtido se hizo en medio alcalino, tratando las células inmovilizadas con etilendiamina, que es un reactivo bifuncional, el cual reacciona posteriormente con el glutaraldehído. Este se utilizó en diferentes concentraciones y se probó la resistencia al flujo de las células inmovilizadas por atrapamiento en el gel.

Los resultados se ven en la tabla 10.

TABLA 10

TIEMPO DE CURTIDO Y RESISTENCIA AL FLUJO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CURTIENTE.

Tiempo curtido minutos	Curtiente % p/v	Tiempo de duración del soporte + células inmovilizadas. horas
30	.5	2
30	.75	8
30	1.0	> 120
30	1.25	> 120

De acuerdo con los resultados experimentales, se debe utilizar el cur-

tiente en una concentración de 1.0 % p/v, durante 30 minutos.

#### PRODUCCION DE ERITROMICINA CON CELULAS INMOVILIZADAS

Con las condiciones definidas anteriormente se procedió a montar una columna con células inmovilizadas para determinar la producción del antibiótico. Se inmovilizaron 15 gramos (peso húmedo) de células en un gel de carragenina 3.5%, curtidas con glutaraldehído al 1.0% p/v. Se midió la producción de Eritromicina en una columna empacada con células inmovilizadas, recirculación del medio de cultivo, control de temperatura, burbujeo de aire, agitación externa y tiempo de residencia de 10 minutos.

TABLA 11

PRODUCCION DE ERITROMICINA EN UNA COLUMNA EMPACADA CON CELULAS INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA.

Tiempo-horas	Producción $\mu\text{g/ml}$
16	2.60
42	21.00
90	11.00
113	4.20

Como se observa en las Tablas 11, 11A y 11B, por la forma como se pierde casi totalmente, la producción específica y la productividad del antibió

TABLA 11 A  
 TABLA DE PRODUCCION Y PRODUCTIVIDAD ESPECIFICA CON CELULAS LIBRES  
 E INMOVILIZADAS

Tiempo en horas	Concentración de eritromicina mg/l	Productividad de eritromicina mg/lh		Producción específica mg de eritromicina por g. de células	
		Inmovilizadas	Batch	Inmovilizadas	Batch
16	2.60	0.1625	0.20	15.25	10.50
42	21.00	0.50	1.05	12.82	41.86
90	11.00	0.122	2.77	6.70	38.67
113	4,20	0.037	1.90	2.56	34.13

TABLA 11 B  
 % DE PRODUCTIVIDAD Y PRODUCCION ESPECIFICA DE CELULAS INMOVILIZADAS  
 CON RESPECTO A CELULAS LIBRES

Tiempo en horas	% de productividad de Eritromicina de células inmovilizadas con respecto a células libres	% de producción específica de células inmovilizadas con respecto a células libres
16	81.25	50
42	47.65	30.62
90	4.40	17.32
113	1.94	7.50

tico; nos cuestionamos:

- a. ¿Por qué disminuyó la Eritromicina que se había producido ?
- b. ¿Por qué es tan baja la producción ?

Con respecto al caso a), encontramos que el pH disminuyó a 3.5, razón por la cual se degradó el antibiótico. Este cambio en el pH fue determinado por un contaminante plenamente identificado con reacciones bioquímicas ; Pseudomona aeruginosa.

El caso b) nos llevó a preguntarnos si efectivamente había actividad metabólica, o si la baja productividad se debía a la liberación paulatina del antibiótico que había en el momento de la inmovilización. Se decide entonces probar viabilidad de las células después de inmovilizadas y curtidas, en relación con células inmovilizadas sin curtir y micelio lavado, ya que cuando no se contaminó tampoco hubo producción.

La técnica para medir viabilidad tiene limitaciones por las características de crecimiento del microorganismo; no lo hace como las bacterias en colonias, sino en agregados miceliares. Esto hace difícil hacer las cuentas. Aunque la técnica no es muy exacta, sí nos informa acerca de qué podemos esperar de la viabilidad de las células en nuestro caso. No podemos apelar a medir por consumo de oxígeno, porque no se dispone de los aparatos suficientemente sensibles para esta medición.

## VIABILIDAD CELULAR

Células lavadas: Se determinó viabilidad después de 24 horas de cosecha.

Células inmovilizadas sin curtir: Se determinó viabilidad después de 24 horas de inmovilizar.

Células inmovilizadas curtidas: Se determinó viabilidad después de 24 horas de inmovilizar y curtir.

## VIABILIDAD CELULAR

Células lavadas	Células inmovilizadas sin curtir	Células inmovilizadas curtidas
$2.9 \times 10^4$	$1.3 \times 10^3$	no viables
$1.6 \times 10^4$	$2.7 \times 10^3$	no viables

Este número de células corresponde a una muestra de .15 g de peso húmedo.

Como puede observarse en la tabla anterior, el número de agregados miceliares es baja. Con el ánimo de conseguir mejores resultados en nuestra técnica, decidimos probar si se estaba produciendo daño a las células al momento de la determinación, por cambios bruscos de presión osmótica que condujera a la lisis celular. Se probaron entonces viabilidad en soluciones isotónicas, hipertónicas y agua, con los resultados de la Tabla 12.

Por los resultados obtenidos, vemos que no se presenta daño por cambios en la presión osmótica; donde mayor inactivación se presenta es en solución salina isotónica, donde pierde cuatro órdenes de magnitud.

TABLA 12

INFLUENCIA DE LA PRESION OSMOTICA EN LA VIABILIDAD CELULAR.

Soluciones	No. de agregados miceliales	
	24 horas	144 horas
Solución salina isotónica	$2.9 \times 10^8$	$6.0 \times 10^4$
KCl ligeramente hipertónica	$1.24 \times 10^6$	$2.2 \times 10^3$
Sacarosa hipertónica	$6.08 \times 10^8$	$2.0 \times 10^5$
Agua	$3.06 \times 10^8$	$2.3 \times 10^5$

Se decidió utilizar KCl, donde la viabilidad decrece en igual orden que en sacarosa, porque no es un nutriente.

Todo lo anterior avala nuestra posición; la técnica no es muy exacta pero nos permite observar cómo se pierde la viabilidad y en nuestro caso nos permite diferenciar claramente lo que ocurre en nuestro sistema, como puede conservarse en la tabla 13

De estos experimentos concluimos que al curtir las células pierden su actividad metabólica.

Por lo tanto, es indispensable optimizar el soporte, para conseguir...

TABLA 13

VIABILIDAD DEL MICELIO LAVADO, INMOVILIZADO CURTIDO Y SIN CURTIR A LAS 24 HORAS

Micelio lavado No. agregados miceliars	Inm. sin curtir No. agregados miceliars	Inm. Curtido No. agregados miceliars
$2.9 \times 10^5$	$1.0 \times 10^4$	no creció
$1.6 \times 10^5$	$2.7 \times 10^4$	no creció

mejor resistencia mecánica , sin necesidad de curtir. Como ya se analizó, la carragenina es susceptible a ciertos iones y pH. Decidimos entonces probar diferentes buffers variando su capacidad molar.

TABLA 14

PRUEBAS DE GELIFICACION CON DIFERENTES BUFFERS

Buffer	pH	Capacidad molar	Resultado
Fosfatos de K	7.0	0.2	Buena gelificación. pH final = 12
Citratos de K	7.0	0.3	No gelifica
Acetato de K	7.0	0.03	Buena gelificación. pH final = 8.0

También se disminuyó el tamaño de partícula del soporte, de 5 mm se pasó a tres mm.

Los resultados de esta optimización fueron : el mejor buffer es el de acetato de potasio, pH de 7.0 y 0.03 de capacidad molar. El tamaño de partícula del soporte fue de 3 mm. Así se logró tener un soporte sin curtir y mantenerlo en una columna con un flujo de un tiempo de resistencia de diez minutos y durante cinco días.

Con las condiciones mencionadas anteriormente, se probó de nuevo la producción de Eritromicina, inmovilizando las células en el soporte ya optimizado, utilizando oxígeno puro, con los siguientes resultados:

TABLA 15

PRODUCCION DE ERITROMICINA POR CELULAS INMOVILIZADAS EN  
K. CARRAGENINA SIN CURTIR

Tiempo	Producción
4	No hubo
18	" "
24	" "
30	Se contaminó
36	No produjo
48	" "

Otros experimentos realizados con Carragenina fueron los siguientes :

En iguales condiciones de inmovilización, sin curtir, se probó la producción en un matraz aireado, con medio de cultivo y sesenta revoluciones por minuto. Se midió la producción del antibiótico y esta fue negativa.

Se realizaron también experimentos inmovilizando esporas. Se determinó la capacidad del soporte.Gel de Carragenina al 3.5%.

TABLA 16

CAPACIDAD DEL SOPORTE KAPPA CARRAGENINA CON ESPORAS DE S. erythreus

Peso seco mg	Consistencia del Gel
11.8	Buena consistencia
16.52	" "
23.60	" "
28.32	" "
47.20	No gelifica

Se inmovilizaron 30 mg: de esporas en el gel de Carragenina al 3.5%.

Las esporas inmovilizadas se colocaron en matraces aireados sin que hubiese habido producción; se observó además que el desarrollo de las

esporas es muy escaso.

### INMOVILIZACION POR ADSORCION EN CERAMICA

Anteriormente enunciamos las características de inmovilización por este sistema. A las ya mencionadas vale la pena adicionar las siguientes :

Restricciones difusionales externas del medio sobre la capa límite no agitada alrededor de la partícula con células inmovilizadas.

Restricciones difusionales internas del producto con el material del soporte.

Los efectos difusionales son las modificaciones más importantes inherentes a la cinética de las células inmovilizadas. Las restricciones externas difusionales pueden ser minimizadas por el incremento de la velocidad de agitación en el tanque y por aumento de flujo en un reactor tubular. Las reacciones con células inmovilizadas son más complejas por la posibilidad de división celular y el metabolismo completo

de las células inmobilizadas el cual debe regenerar cofactores y el uso de mecanismos de transporte activo. La adsorción se basa en las interacciones electrostáticas (fuerzas de Van der Waals), entre la carga de las células microbiales y la carga del soporte. La cerámica permite que las células permanezcan vivas y no se altere su actividad enzimática.

CERAMICA : Las características del soporte son :

Densidad de la cerámica :	1.83. g/cm <sup>3</sup>
Agua de adsorción :	26.00 % en peso
Tamaño de partícula :	0.59 - 1.17 mm

Diseño experimental : Nos propusimos en primer lugar demostrar que se inmobilizan las células. Para hallar este objetivo trabajamos con esporas activadas durante 24 horas, en medio de cultivo para Streptomyces erythreus, a 35°C y 220 rpm. El preinóculo se vertió sobre un matraz que contenía cerámica estéril en medio de cultivo. Se crecieron las células con cerámica, luego se lavó con solución salina hasta comprobar que no quedaban células libres, luego fueron trasladadas las células inmobilizadas en la cerámica a otro matraz con medio de cultivo estéril y se pudo comprobar que había producción del antibiótico, lo que nos aseguró que evidentemente se había logrado la inmo-

vilización, además que las células se mantenían viables.

En segundo lugar se probó la producción en un reactor y se midió la producción.

TABLA 17

## PRODUCCION DE ERITROMICINA CON CELULAS INMOVILIZADAS EN CERAMICA

Tiempo - horas	Concentración del antibiótico µg/ml
0	No hay antibiótico
24	200
48	325

A partir de las 36 horas hay desorción de las células, por lo tanto no se siguió midiendo la producción, es lógico que el aumento en la producción se debe entonces al crecimiento en el fermentador y no se

sabe qué tanto a las células inmovilizadas.

El flujo se varió hasta obtener 2 ml por minuto, sin poder evitar la desorción. Los problemas de contaminación en este sistema también fueron críticos, en el paso donde hay que lavar las células después de la inmovilización se contamina con muchísima facilidad. Siempre se trabajó bajo control. Este se garantizó colocando de las mismas células inmovilizadas utilizadas para la columna, otra cantidad determinada en un matraz con medio de cultivo para asegurar la viabilidad de las células y su capacidad para producir el antibiótico.

Es de anotar que durante el desarrollo de este experimento, así como en los anteriores, la producción se midió por bioensayo. En una de las columnas que se montó, la producción frente a un estándar de Eritromicina fue de 3000 µg/ml, pero ya esta se había contaminado, lo que nos hizo aislar el contaminante y determinar si el contaminante estaba produciendo antibiosis o realmente la producción se debía al Streptomyces erythreus. Efectivamente el contaminante produjo antibiosis, se identificó por pruebas bioquímicas como Pseudomonas aeruginosa. Por este hecho pasamos a desarrollar un nuevo trabajo con esta cepa para identificar qué tipo de compuesto es el que tiene tales características y que desde luego no es el objetivo a tratar aquí.

De los resultados obtenidos con cerámica y que nunca fueron reproducibles, decidimos buscar otro sistema de inmovilización. Se diseñó el

trabajo utilizando la encapsulación en bolsas de diálisis.

#### ENCAPSULACION EN SACOS DE NITROCELULOSA

El soporte utilizado fueron bolsas de diálisis estándar con las siguientes características : son de nitrocelulosa, con un diámetro de cilindro de 21 mm, espesor de  $3.54 \times 10^{-4}$  mm.

Las esporas se filtraron y luego fueron activadas durante 36 horas a 35°C, se colocaron en los sacos de diálisis los cuales previamente se habían sujetado de un matraz con medio de cultivo. La producción se comparó con la del micelio libre; se tomaron muestras cada 24 horas descabezando matraces hasta las 200 horas obteniendo los resultados consignados en la Tabla 18.

Como se observa en la Tabla 18.A, la productividad con células inmovilizadas es superior hasta las 48 horas con relación a la producción de Batch, de este tiempo en adelante empieza a estar por debajo de la producción en Batch. A las 200 horas su productividad desciende hasta 51.48%, con respecto a las células libres.

Hay una variación en el pH entre el sistema inmovilizado y el de células libres que influyen directamente en la producción. El pH en las

TABLA 18

PRODUCCION DE ERITROMICINA POR CELULAS INMOVILIZADAS POR ENCAPSULACION

CELULAS INMOVILIZADAS			CELULAS LIBRES	
Tiempo/horas	Eritromicina µg/ml	pH	Eritromicina µg/ml	pH
24	14.10	6.69		
48	17.00	6.62	10.62	6.92
48	17.00	6.63	12.82	6.32
72	24.80	6.41	29.90	7.49
			29.90	7.53
96	36.61	6.60	43.59	7.51
			52.62	7.69
120	24.80	6.99	92.57	7.74
	36.00	6.50	76.69	7.67
144	63.50	6.78	111.75	7.71
	63.50	6.66	111.75	7.74
166	84.20	6.88	92.57	7.71
	84.20	6.98	162.57	8.07
200	84.0	6.84	196.57	8.12
	84.2	6.42	196.57	8.20

TABLA 18 A

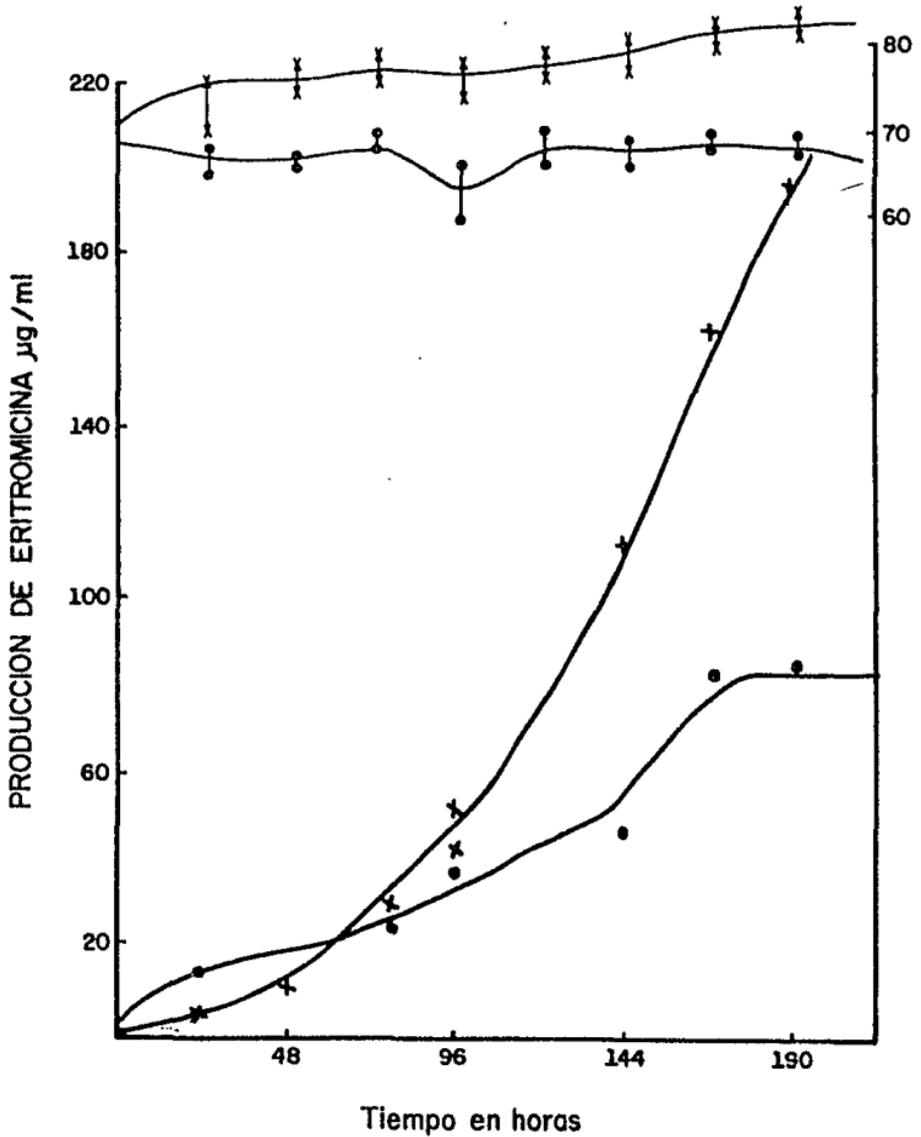
COMPARACION ENTRE LA PRODUCTIVIDAD POR CELULAS LIBRES Y CELULAS ATRAPADAS EN SACOS DE NITROCELULOSA.

TIEMPO HORAS	PRODUCTIVIDAD POR CELULAS LIBRES mg/l.h	PRODUCTIVIDAD POR CELULAS ENCAPSULADAS mg/l.h	% DE PRODUCTIVIDAD DE CELULAS INMOVILIZADAS CON RESPECTO A CELULAS LIBRES
24	0.44	0.587	133.40
48	0.27	0.354	131.10
72	0.42	0.344	79.52
96	0.47	0.378	80.42
120	0.77	0.300	38.96

\* ver cálculos en el anexo

Productividad =  $\frac{\text{concentración de eritromicina (mg/l)}}{\text{tiempo en horas}}$

CURVAS DE PRODUCCION DE ERITROMICINA DE  
MICELIO LAVADO (x) MICELIO INMOVILIZADO (●)



células inmovilizadas está por debajo del rango que encontramos en las curvas de crecimiento para la máxima velocidad de producción que está entre 6.9 y 7.5. En cambio en el sistema de células libres el pH siempre permaneció por encima del límite inferior.

#### INMOVILIZACION POR ADSORCION EN TEZONTLE

El tezontle es una piedra de origen volcánico, de color rojo, gris oscuro o negro, tiene la ventaja de ser altamente porosa. Se decidió trabajar con tezontle porque ofrece las siguientes ventajas :

- a. Es un soporte inerte
- b. Se puede definir el tamaño de partícula
- c. Tiene mayor porosidad que la cerámica
- d. Empacado en columnas deja muchos espacios interparticulares, que disminuye problemas de transferencia de masa.

Ensayos preliminares. Se lavó con agua destilada y se esterilizó por una hora para determinar posibles cambios de pH; el pH no varió después de la esterilización; permaneció en 6.8.

Tamaño de partícula. El tamaño de partícula se determinó haciendo pasar el tezontle molido por un tamiz entre mallas # 10 con abertura de 2 mm y # 30 con abertura de 0.59 mm o sea que el tamaño de partículas oscila entre 0.59 mm y 2 mm.

Esterilización. Se realizó en una mufla a 300°C durante una hora.

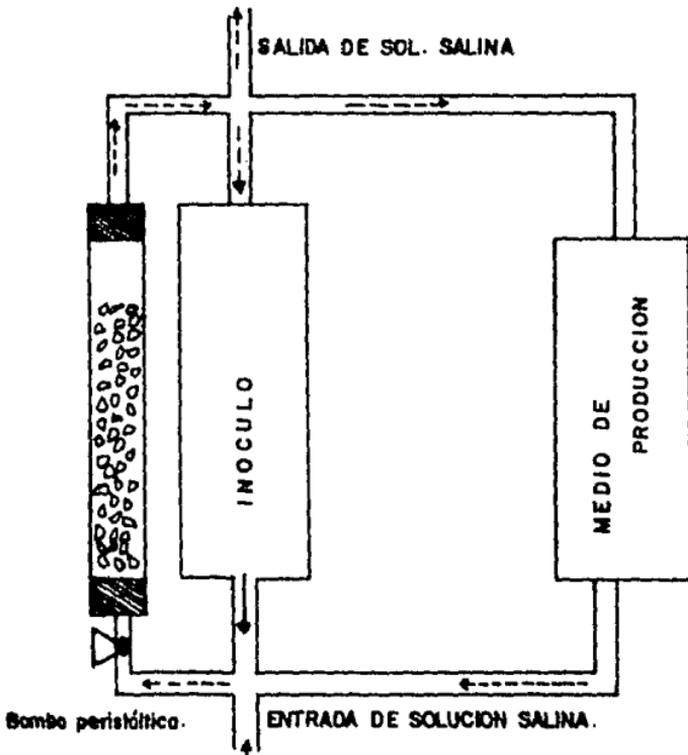
Inmovilización. Se llevó a cabo creciendo el micelio en un matraz con medio de cultivo y tezontle estéril, luego se observó en el microscopio después de haber sido agitado durante 8 horas. Para distinguir las células del soporte coloreamos con violeta de genciana y se detectó claramente que el micelio se enreda en las paredes irregulares del soporte.

Se montó un reactor similar al que trabajamos con cerámica.

Operación del reactor. El preinóculo es de esporas activadas por 24 horas a 35°C. Con este se inoculó un fermentador dejando crecer por 24 horas las células, de este se inmovilizó por recirculación en la columna empacada durante 12 horas y se lavó con solución salina estéril. A esta columna empacada se le hizo pasar medio de cultivo de fermentación y se midió la producción del antibiótico. A las 24 horas no había producido y a las 36 ya estaba contaminado.

Con la experiencia desarrollada durante estos procesos de inmovilización se pensó en el diseño de un sistema cerrado, que evite totalmente la manipulación; es decir, que se inmovilice, lave y recircule medio de fermentación sin abrir para nada el sistema tal como se presenta en el diagrama (Ver todos los detalles del reactor y técnica en el Anexo).

FIG. 15      DIAGRAMA DEL SISTEMA CERRADO EN INMOVILIZACION EN  
TEZONTLE



En este sistema se trabajó de la siguiente forma :

Preinóculo de esporas activadas durante 24 horas a 35°C. Se inoculó el primer fermentador y se creció durante 16 horas; se inmovilizó por recirculación 8 horas y luego se lavó por 2 horas. Se midió la producción como se muestra en la Tabla siguiente :

TABLA 19

PRODUCCION DE ERITROMICINA POR CELULAS INMOVILIZADAS EN TEZONTLE

Muestra	Tiempo-horas	Producción de Eritromicina	pH	Esterilidad
1	16	No produjo	6.50	+
2	26	" .	6.42	+
3	40	"	6.40	+
4	72	"	6.36	+
5	95	" -	6.36	+

Como podemos apreciar en la tabla anterior, el problema de contaminación se superó pero no hubo producción. También puede apreciarse que el pH permanece muy bajo durante todo el experimento, factor que puede ser el responsable de que no se produzca el antibiótico. Se adicionó al sistema un controlador de pH, calibrado en un rango de 6.9 a 7.5, rango en el cual se halla la máxima velocidad de producción según las curvas de crecimiento.

Se operó de nuevo el sistema en iguales condiciones que el anterior obteniendo los siguientes resultados :

TABLA 20

PRODUCCION DE ERITROMICINA POR CELULAS INMOVILIZADAS EN TEZONTLE CON CONTROL DE pH.

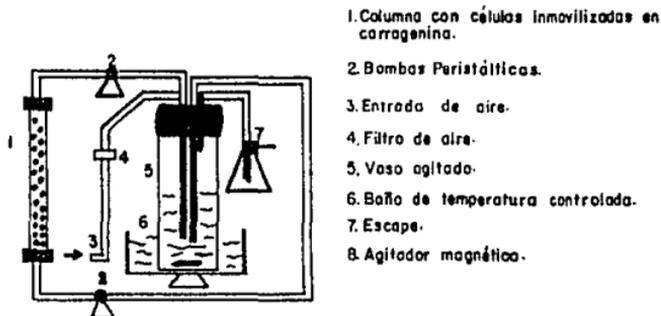
Muestra	Tiempo-horas	Producción de Eritromicina	Esterilidad
1	24	+	+
2	48	+	Creció micelio
3	72	+	" "
4	96	+	" "

Es imposible juzgar que la producción se debe a las células inmobilizadas o al micelio que crece en el fermentador que se ha desprendido del soporte. Esto nos lleva a pensar que es necesario optimizar el sistema.

## REACTORES

Para el trabajo experimental se utilizaron los siguientes reactores:

FIG. 19. REACTOR PARA CELULAS INMOVILIZADAS EN CARRAGENINA



Volúmen vacío: Se determinó así; una vez empacadas las columnas, se midió el volúmen del líquido no ocupado por el soporte con las células inmobilizadas

Características del reactor:

Largo de la columna : 50 cm

Diámetro de la columna: 2,3 mm

Volúmen vacío 25 ml

Flujo 1.4 ml/minuto

Tiempo de residencia:  $\frac{\text{volumen vacío}}{\text{flujo}}$

Tiempo de residencia: 17.8 minutos

Soporte más células inmobilizadas: 42.0 gramos

Volumen del vaso : 1 litro

Volumen del medio : 500 ml

Vaso agitado con temperatura controlada y burbujeo de aire (previamente filtrado).

Agitador : spin-master , modelo 4802

Controlador de temperatura : Heizung Heating Chauffage Termomics.

Operación. El anterior diagrama divide el sistema para la producción de Eritromicina por células inmovilizadas de Streptomyces erythreus. Las células inmovilizadas, lavadas se colocan en la columna que tiene una chaqueta para controlar la temperatura. La temperatura del reactor se mantiene a 35°C con agua caliente que pasa a través de la chaqueta. El medio completo para S. erythreus previamente aireado y a 35°C se hace circular por la columna utilizando una bomba peristáltica, a un flujo de 1.4 ml/minuto y regresando de nuevo al vaso agitado. De este se sacan las muestras para determinar la producción del antibiótico.

Para el caso de células inmovilizadas en cerámica, sólo se varió la columna que fue cambiada por un frasco lavador de gases para tener menos puntos de contaminación.

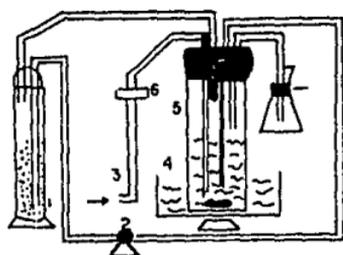
Características del reactor :

Vaso lavador de gases :

Altura 18 cm

diámetro 3 cm

FIG. 20. REACTOR PARA CELULAS INMOVILIZADAS EN CERAMICA



1. Células inmovilizadas en cerámica.
2. Bomba Peristáltica.
3. Entrada de aire.
4. Baño de temperatura controlada.
5. Vaso agitado.
6. Filtro de aire.
7. Escape.

Volumen vacío	160 ml
Flujo	14 ml/minuto
Tiempo de residencia	11.42 minutos
Soporte más células inmovilizadas	30 gramos
Volumen del vaso agitado	1 litro
Volumen del medio	500 ml
Aireación	1 vvm

Operación. Las células inmovilizadas lavadas se colocan en el frasco lavador de gases y se procede en igual forma que en el reactor anterior. La temperatura se controla sumergiendo el frasco lavador en un baño con temperatura controlada a 35°C. La velocidad del flujo 14ml/min.

Reactor para células inmovilizadas en tezontle.Características :

Se utilizó como columna también un frasco lavador de gases.

Altura	18 cm
Diámetro	3 cm
Volumen vacío	140 ml
Flujo	14 ml/minuto
Tiempo de residencia	10 minutos
Soporte más células inmovi-	
lizadas	40 gramos
Aireación	1 vvm

Operación. Se operó en iguales condiciones que el de cerámica.

Características :

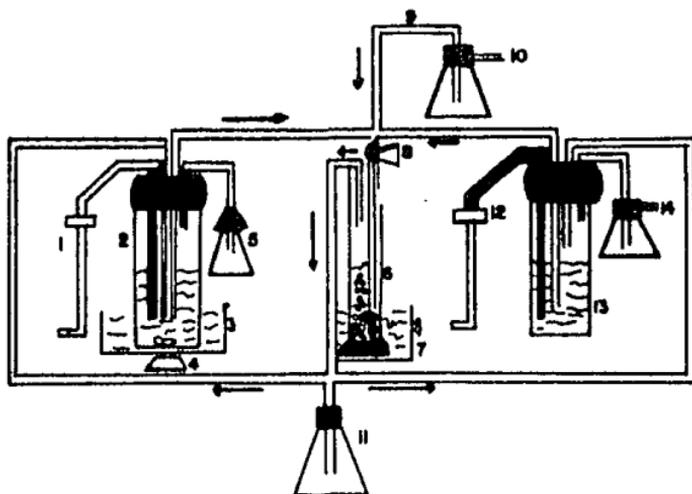
Se utilizó como columna un frasco lavador de gases.

Altura	18 cm
Diámetro	3 cm
Volumen vacío	140 ml
Flujo	14 ml/minuto

Tiempo de residencia	10 minutos
Agitación	420 'rpm
Soporte más células inmovilizadas	40 gramos
Volumen de medio	500 ml
Volumen de fermentadores	1 litro
Aire	1.0 vvm

Reactor para inmovilizar en tezontle, con sistema incorporado de lavado y recirculación del medio de producción.

FIG. 2. REACTOR PARA CELULAS INMOVILIZADAS EN TEZONTLE



Equipo: Agitador magnético Sipin master 4802 Cole Parmer

Controlador de temperatura para columna y fermentador: Heczung Heating  
Chauffage.

Bombas peristálticas : Electro-Craft Corporation Cole Parmer  
Bioflo Model C30 New Brunswick, Scientific Co. Inc. Edison, N.J.USA.

Controlador de pH : Centro de Instrumentos, UNAM

Adaptado a una bomba peristáltica y su respectivo  
Reostato Master Flex.

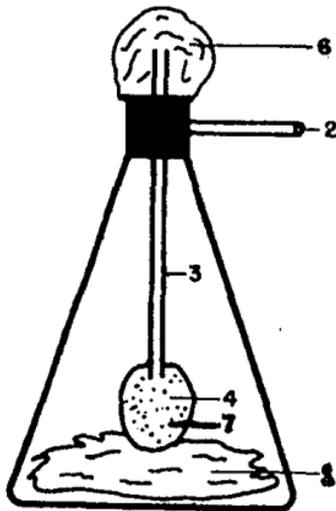
1. filtro de aire
2. Tanque agitado con control de temperatura para crecer células.
3. Baño termostatado
4. Agitador magnético
5. Escape
6. Columna con células inmovilizadas en tezontle
7. Baño termostatado
8. Bomba peristáltica
9. Entrada de solución salina para lavar las células inmovilizadas.
10. Entrada de aire al recipiente con solución salina
11. Recipiente para recibir el deshecho del lavado
12. Filtro de aire.

13. Fermentador de un litro, con control de temperatura, agitación entrada de aire, con un electrodo para control de pH.
14. Escape del fermentador.

Operación. Según el diagrama podemos apreciar que se dispone de dos fermentadores en línea, uno para crecer el preinóculo e inmovilizar y otro para la producción.

Se inocula el primer fermentador, se deja crecer, se hace circular por la columna durante 8 horas para inmovilizar, luego se lava por espacio de dos horas con solución salina estéril y se inicia la recirculación del medio de producción. En el primer fermentador se empleó un agitador magnético, aireación 1 vvm y control de temperatura. En el de producción se controla pH, temperatura, agitación, aireación. En los procesos tanto de inmovilización, lavado y producción se controló la velocidad de flujo.

**FIG.22. SISTEMA DE INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN SACOS DE NITROCELULOSA**



- 1.- Medio de cultivo.
- 2.- Aireación.
- 3.- Varilla de vidrio.
- 4.- Sacos de nitrocelulosa.
- 5.- Tepon de hule.
- 6.- Protector de esterilidad.
- 7.- Células inmobilizadas.

Temperatura	37°C
Agitación	220 rpm
Ajuste de pH antes de esterilizar	7.5
Medio de cultivo	Mes
Tiempo de esterilizar	15' 20 libras
Volúmen del medio	50 ml
Matraces	125 ml

Bolsas de diálisis estandar de celulosa.

35 mm por 100'

Diámetro calculado 21 mm

Espesor 0.0009''

 Condiciones de producción para células inmovilizadas y libres.

Agitación 220 rpm

Medio cultivo Mes

Temperatura 35°C

pH antes de esterilizar 7.5

Volumen 50 ml

Corección de volumen 10%

Matraces 125 ml. quitasatos

Inóculo 2 mg., de espesor en peso seco

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

## CURVAS DE CRECIMIENTO.

Los resultados obtenidos en este capítulo corresponden a experimentos realizados por duplicado a 37°C, después de cubrir una etapa de estandarización de técnicas y definir la metodología del trabajo.

De la Gráfica No. 1 podemos obtener los siguientes datos :

1. A las 50 horas se inicia la fase exponencial del crecimiento, que coincide con un ligero incremento en la producción de Eritromicina, se hace más drástica al final de la fase exponencial y tiene su máximo en la fase estacionaria, lo que coincide con los datos reportados en la literatura (95).
2. La producción de biomasa sigue la curva típica, sin que se presente comportamiento diáuxico.
3. A medida que aumenta la producción de biomasa también aumenta el consumo de azúcares, cuando la curva llega a su fase estacionaria el consumo de azúcares disminuye notablemente permaneciendo casi constante.

4. El pH de la etapa inicial tiende a disminuir, pero éste se eleva nuevamente, probablemente porque se utilizan ácidos orgánicos, así como se registra la aparición de compuestos nitrogenados provenientes de la lisis celular. El rango de pH al cual se da la máxima velocidad de producción está entre 6.9 y 7.5.
5. Se aprecia también la influencia de la temperatura en los experimentos realizados. Los realizados a 29°C presentan la misma tendencia en el crecimiento, pero es más lenta, igual que el consumo de azúcares y la producción es menor con respecto a los experimentos realizados a 37°C.
6. En la determinación del crecimiento celular por dos métodos : Densidad Óptica y Paquete Miceliar se encontró una correlación lineal. Aunque el método de paquete miceliar no es muy exacto, se logró estandarizar el método y utilizar un medio de cultivo son sólidos en suspensión Gráfica 8,
7. Cuando el crecimiento celular alcanza su fase estacionaria, disminuye tanto la densidad óptica como el paquete miceliar. Sobre el estado de las células en fase estacionaria hay diferentes teorías, pero lo que se ha reportado para el caso del Streptomyces erythreus, es que hay lisis celular.
8. La velocidad de crecimiento para el caso que nos atañe, fue de

0.04 horas<sup>-1</sup>. Es decir, que la velocidad de crecimiento es muy lenta comparada con la velocidad de crecimiento de levaduras y bacterias. El tiempo de duplicación fue de 17.25 horas. La  $\mu$  se determinó entre las 48 y 72 horas.

El trabajo realizado en esta parte, coincide en su gran mayoría con los reportados por la literatura, en cuanto a la tendencia y los rangos en que se obtuvieron los resultados.

#### EDAD DE COSECHA DEL MICELIO PARA SU INMOVILIZACION.

Se sabe que hay una correlación entre la edad del cultivo y la producción del antibiótico. Esta teoría fue claramente comprobada con los experimentos que se desarrollan, obteniendo los siguientes resultados: El Micelio cosechado a las 48 horas produce más rápidamente pero decrece porque hay lisis celular. Con el micelio cosechado a las 36 horas la producción es más lenta pero siempre va en ascenso, durante el tiempo que se determinó.

#### INMOVILIZACION EN CARRAGENINA

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo pueden resumirse así: Se optimizó el soporte curtido con glutaraldehído (capacidad, porcentaje de curtiente y resistencia mecánica) y se determinó la productividad de eritromicina, en las tablas 11 - 11A y 11B, se observa que la productividad decae del 50% al 7.5% con respecto a las células libres, en un tiempo de 133 horas.

Este fenómeno se sucedió por contaminación con Pseudomonas, la eritromicina detectada, no se produjo sino que se liberó por estar presente en las células antes de la inmovilización. Esto quedó en evidencia al realizar pruebas de viabilidad; aún a bajas concentraciones de curtierte, había muerte celular. La viabilidad es condición indispensable para la producción de un metabolito secundario.

Parece ser que el glutaraldehído en contacto con paredes celulares Gram positivas, produce contracción de las capas externas de las células que encierran componentes lipoproteicos e inactivación de la pared celular asociada con el periplasma, donde hay enzimas que parecen ser cruciales para la viabilidad celular. Aunque la capa de péptido-glicana es más pequeña que en Gram negativo, ofrece numerosos sitios de interacciones de moléculas de glutaraldehído que no requieren penetración extensa para realizar éste efecto (36).

Se corroboró lo reportado en la literatura acerca de la influencia de los iones en la gelificación. Se obtuvo un soporte sin curtir con determinadas características: 15 gramos de peso húmedo en células en un gel de 3.5% de Carragenina, en un buffer de acetatos de pH 7.0 y capacidad molar de 0.03, 3 mm de tamaño de partícula y mayor resistencia mecánica, no se desintegró cuando se operó en una columna, con un tiempo de residencia de 10 minutos durante 5 días. Este sistema optimizado se probó con aire y con oxígeno puro, con iguales resultados. En ningún caso durante el tiempo en que fué posible medir sin que hubiese contaminación o sea hasta 36 horas, no hubo producción.

Este trabajo se complicó por las dificultades para obtener un sistema

estéril, que permitiera obtener resultados claros en menor tiempo. Para llegar a nuestro sistema final hay que pasar por una serie de manipulaciones, como indica la técnica, todas ellas susceptibles de contaminación. Adicionalmente para la producción se utilizó un medio rico, con pH 7.0, donde fácilmente pueden ofrecer multitud de contaminantes. Aunado a ello, está el hecho de que la producción del antibiótico es muy lenta. Todo esto trae como secuela una contaminación continua que disminuye el pH e impide la producción del metabolito.

Aunque la inmovilización en Kappa Carragenina ha sido muy utilizada para desarrollar procesos enzimáticos con células completas, en nuestro caso, donde las células deben conservar su actividad metabólica no dio buenos resultados. Los factores limitantes podrían ser de diferentes tipos :

a. El sustrato no llega o llega en muy poca cantidad a las células.

Está claramente comprobado que estas retienen su viabilidad, que el medio de cultivo utilizado permite que haya producción cuando se trata de células libres, las condiciones ambientales adecuadas, probadas en las curvas de crecimiento. Por lo tanto, es lógico pensar que las limitaciones pueden ser debidas a que la contextura del gel impide la difusión del sustrato al interior del mismo.

b. Problemas de transferencia de oxígeno: Por la misma razón anterior,

podría estar impedido el paso del oxígeno disuelto. Cuando se utilizó aire se midió la entrada de este (1 vvm), y en el caso del Oxígeno puro se determinó la entrada del gas teniendo presente el volumen que se puede disolver, a la temperatura de operación. En los dos casos hay oxígeno disuelto y no hubo producción.

- c. Alteraciones en las condiciones ambientales celulares en el momento de la inmovilización, que puede producir cambios en las estructuras celulares.

En los dos primeros casos la inhibición por nutrientes, por deficiencia de oxígeno o por condiciones adversas en general, puede ocasionar la esporulación, estado en el cual las funciones metabólicas están limitadas a fenómenos de latencia pero no está la maquinaria metabólica activa.

#### INMOVILIZACION EN CERAMICA

Este tipo de inmovilización no se realizó de la manera tradicional, recirculando una suspensión de células libres a través del soporte. Se procedió a crecer las células en presencia del soporte y medio de cultivo. Se comprobó que había inmovilización lavando y colocando el soporte con células inmovilizadas en un matraz con medio de producción. En este sistema de inmovilización se presentó el problema de

la desorción de las células y no fue posible controlarlo ni siquiera trabajando a velocidades de flujo muy pequeñas; a altos tiempos de resistencia. Antes de que este fenómeno ocurriera, se pudo medir producción.

El sistema de inmovilización por adsorción está basado en interacciones electrostáticas. La superficie de las células tienen potencial (-), como resultado de la ionización de varios grupos químicos entre el área superficial (116).

Alrededor del punto anterior hay discrepancia entre diferentes autores e investigadores. Se ha reportado que el potencial Z juega un papel importante en la interacción célula soporte. En el caso de levaduras (30) cargadas (-), es preferible soporte de carga positiva, para su inmovilización. La cerámica con carga negativa pero a pH 4.0 el valor negativo de la cerámica decrece y la unión se hace más fuerte, el flujo puede ir a mayor velocidad. Otros autores restan importancia al potencial Z (61) optimizaron la inmovilización de S. cerevisiae con carga negativa, a pH 7.2; se creía que por interacción habría repulsión.

Otro factor importante a tener en cuenta es la composición de la pared celular; en el caso de los Streptomyces, ésta contiene sustancias tales como : ácido L-diamino pimélico y glicina. Los grupos amino y carboxilos presentes en las paredes celulares pueden interactuar con

el soporte.

A pesar de ser un método sencillo las células permanecen vivas y no se altera su actividad metabólica, la desorción que se da por cambios de pH o fuerza iónica, o por alta velocidad de flujo, es un fenómeno inevitable en nuestro sistema en particular.

#### INMOVILIZACION POR ENCAPSULACION EN SACOS DE NITROCELULOSA.

La inmovilización por encapsulación se ha utilizado para diferentes reacciones enzimáticas a nivel laboratorio. Se determinó la producción de Eritromicina por este sistema y se comparó con la producción en Batch (ver Tabla 18.A). Fué mayor la productividad de células inmovilizadas por encapsulación las primeras 48 horas, de este tiempo en adelante, descendió la productividad, (de 133% al 38.96 a las 120 hrs).

Aunque ha sido de mucha importancia demostrar que hay producción por células inmovilizadas, también tenemos claro que nuestro objetivo es escalar. Este sistema que venimos discutiendo tiene serias limitaciones para nuestro propósito; es difícil diseñarlo a mayor escala por las restricciones tales como la velocidad de difusión a través de las membranas utilizadas como cápsulas.

Es de anotar cómo por este sistema se disminuye el pH del medio, en relación con la fermentación con células libres, pero este no se -

determinó experimentalmente. Es necesario entonces controlar el pH durante la fermentación con células inmovilizadas. La viscosidad en el sistema de células libres se incrementa; en el caso de las células inmovilizadas permanece constante en el medio, aunque aumenta al interior de la cápsula. La posibilidad de escalar este tipo de sistemas está en conseguir una cápsula que permita mayor velocidad de difusión, permitiendo la salida del producto al exterior y la entrada de oxígeno y nutrientes.

#### INMOVILIZACION EN TEZONTLE

Con este nuevo sistema logramos avanzar en cuanto a la superación del problema principal del desarrollo de este trabajo; la contaminación. Se eliminó toda la manipulación operando mecánicamente y con todas las posibilidades de escalar.

Durante el tiempo que operamos con este soporte, se detectó un incremento en la producción de biomasa. Hay paso de células al medio de producción. Se probó que hubo adhesión a la superficie del soporte y quedan células retenidas en espacios interparticulares, por lo tanto al circular el medio de cultivo se pasaron a éste; no se logró detectar si había fenómeno de desorción o no.

Este soporte es más poroso que la cerámica, por ello debe tener más área disponible, sin embargo; éste no es un criterio absoluto; se ha

reportado que en sílica, la cantidad de células adsorbidas decrece con el incremento del área superficial del soporte (65).

Inmovilizando en tezontle, con control de pH durante toda la fermentación, se obtuvo producción del antibiótico y un incremento en la producción de biomasa; fue imposible determinar la cantidad de Eritromicina producida por las células inmovilizadas y la producción por células circulantes en el medio de fermentación. Al igual que no se logra detectar si hay fenómeno de desorción, porque también quedan células retenidas en espacios interparticulares. Aunque trabajamos con parámetros definidos previamente con otros soportes, como rangos de pH, tiempo en el cual se deben inmovilizar las células es indispensable que con este sistema en particular se diseñe en la optimización del mismo.

Es preciso optimizar : capacidad del soporte, es decir, el número de células que se deben inmovilizar. La edad del cultivo, haciendo pruebas a diferentes tiempos de crecimiento, puesto que los ensayos preliminares ya descritos, parten del supuesto de que no hay más crecimiento celular, después de la inmovilización. Debe también optimizarse el medio de cultivo para la fermentación que permita limitación por alguno de los nutrientes para que solamente se mantengan las funciones metabólicas, sin aumentar la biomasa. Como este soporte es original, debe hacerse un estudio de su composición química y de los metales que pueden inhibir también la producción.

Lo anteriormente expuesto nos habla de un trabajo de gran envergadura que puede ser objeto de otros proyectos de investigación.

## DISCUSION

Los objetivos que nos propusimos alcanzar con nuestro trabajo fueron los siguientes :

- a. Producir Eritromicina por células inmovilizadas vivas de Streptomyces erythreus.
- b. Comparar la producción por células inmovilizadas, con la obtenida por fermentación tradicional en Batch.
- c. Aplicar el nuevo sistema a mayor escala.

De estos propósitos se lograron dos :

- a. Producir Eritromicina con células inmovilizadas de Streptomyces erythreus. Se obtuvieron resultados positivos en todos los sistemas probados, excepto cuando se utilizó como soporte Kappa Carragenina.
- b. Comparar la producción por células inmovilizadas, con la fermentación tradicional en Batch. Fue posible solamente cuando se usó

como soporte sacos de nitrocelulosa. Cuando se inmovilizó por adsorción, no fué posible cuantificar la producción por los problemas de desorción ya discutidos.

En el caso de inmovilización por encapsulación en sacos de nitrocelulosa, se compararon los resultados obtenidos, con la productividad en Batch (ver tabla 18.A). La productividad por células inmovilizadas supera hasta las 48 horas en un 31.10%, la obtenida con células libres, de este tiempo en adelante empieza a decrecer hasta obtener a las 200 horas solamente 38.96%, es muy probable que la viscosidad al interior de los sacos, vaya haciendo cada vez más difícil la transferencia de masa, impidiendo al abastecimiento de las células y por ende la productividad no se incrementa. El pH del medio de cultivo en el sistema inmovilizado es menor, que en el de células libres, No podría asegurarse un pH homogéneo en el primer sistema (por células inmovilizadas encapsuladas en sacos de nitrocelulosa) puede ocurrir que el metabolito se acumule al interior de los sacos, por dificultades de difusión de éste al medio de cultivo.

Aunque es difícil establecer patrones de comparación cuando tenemos diferentes microorganismos, soportes y productos obtenidos. Para el caso particular de la Eritromicina no hay ningún caso reportado; sin embargo, los existentes nos pueden dar una idea de la forma como se diseñan estos procesos y se detectan los problemas que se presentan.

En la Tabla 21 podemos apreciar los antibióticos producidos con células inmovilizadas.

De los antibióticos descritos en la tabla siguiente podemos demostrar que:

Los geles de acrilamida son un soporte común para producir Penicilina, Bacitracina y Cefalosporinas. En los dos primeros casos se hizo por polimerización directa de monómeros de acrilamida, con rendimientos del 15% para Penicilina y 20-25% de Bacitracina. Con respecto a las células libres, en ambos casos se mejora la producción si crecen las células en el soporte por exposición a nutrientes. La pérdida de actividad se atribuyó a efectos tóxicos del monómero durante la formación del gel.

Para las cefalosporinas se realizó un pretratamiento del gel con -- grupos de acil hidrazidas, y posterior reacción de entrecruzamiento con reactivos bifuncionales, en presencia de las células viables; a las 72 horas se obtuvo una producción similar al sistema Batch, según sus autores.

Al tiempo los autores del primer trabajo de Bacitracina lograron optimizar el sistema por variación de condiciones fisicoquímicas como aireación y en cultivo continuo.

Los dos intentos de optimizar por dos vías diferentes, nos muestran las variables incluidas en este tipo de procesos; decidir qué es más factible va de acuerdo con los costos de producción; en general se

TABLA 21 . PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS CON CELULAS INMOVILIZADAS.

Antibiótico	Microorganismo	Soporte	Producción % respecto del sistema Batch.
Penicilina	<u>Penicillium chrisogenum</u>	Colágena Alginato de Ca. Poliacrilamida	trazas 45° (87) 15
Bacitracina	<u>Bacillus sp.</u>	Gel de poliacrilamida	20-25 (87)
Cefalosporinas	<u>Streptomyces clavuligerus</u>	Gel de poliacrilamida, prepolimerizado, mas entrecruzamiento con reactivo bifuncional.	A las 72 horas Similar al Batch. (106)
Eritromicina*	<u>Streptomyces erythreus</u>	Encapsulación en bolsas de nitrocelulosa	Hasta las 48 la productividad fué superior a las células libres. aproximadamente en 31.10%

\*Eritromicina: son los resultados de nuestra investigación, para el caso en que se utilizaron bolsas de nitrocelulosa o Colodión para encapsular.

debe tratar por un lado de optimizar el soporte y por el otro las condiciones del sistema.

Lo que es común para todos los casos expuestos, es que ninguno supera la producción de Batch, además no se logran acelerar las reacciones enzimáticas para la producción del antibiótico, excepto en el trabajo que realizamos en el cual se logró superar la productividad del sistema tradicional.

Además de los soportes y sus condiciones fisicoquímicas, se hace preciso comprender que las características fisiológicas del microorganismo juegan un papel muy importante, las cuales hay que tener en cuenta..

- Debe garantizarse que el estado fisiológico de las células y su viabilidad estén intactas.
- Determinar si se produce o no autólisis al ser inmovilizadas. Chibata reporta lisis celular en geles de acrilamida.
- Debe producirse la regeneración de cofactores y reutilización. Aunado a estas condiciones debe tenerse un conocimiento del microorganismo (estructura, características, vía metabólica para la producción del metabolito, sistemas de regulación, relación de crecimiento y producción, entre otras). Las características fisicoquímicas de los soportes, reactores y condiciones de operación.

## CONCLUSIONES

1. Las curvas de crecimiento, producción y consumo de azúcares, están de acuerdo con las reportadas por la literatura; la producción está parcialmente asociada al crecimiento.
2. Se determinó que la producción del antibiótico está en función de la edad del cultivo. Por ende, la importancia de definir en qué edad deben cosecharse las células para inmovilizar. En nuestro caso se encontró experimentalmente que la edad debe ser 36 horas.
3. El objetivo de obtener Eritromicina por células inmovilizadas vivas de Streptomyces erythreus, se logró en todos los soportes probados, excepto en Kappa Carragenina, en el método de adsorción (con cerámica y tezontle) se midió producción antes de la desorción de las células.
4. La comparación de producción en Batch y por células inmovilizadas, se realizó cuando se empleó como soporte los sacos de nitrocelulosa, alcanzando una productividad superior en un 31,1% a las 48 horas, con respecto a la producción en Batch (ver Tabla 18.A). Después de éste tiempo, disminuye, hasta representar solamente el 38.96% de la obtenida por células libres. Se detectó eritromicina en el sistema en el que su utilizó como soporte kappa carragenina curtida. La productividad disminuye de 50% al 7.5% con respecto al Batch. En este caso hubo solamente liberación de la eritromicina que estaba presente en las células antes de inmovilizar y se degradó porque la contaminación con Pseudomonas, disminuye el pH.

5. De los soportes utilizados:

- a. El que brinda menos potencial es la Kappa Carragenina, para las condiciones de nuestro sistema en particular, porque hay problemas de difusión a través del gel.
- b. En cerámica hay desorción de células y al escalar pueden presentarse problemas de transferencia de masa, por su alta densidad.
- c. El caso del tezontle merece especial atención, es un soporte muy poroso y de gran superficie de adsorción.
- d. Inmovilización en sacos de nitrocelulosa: Se ve difícil, si no imposible escalar por este sistema por problemas de transferencia de masa hacia el interior de los sacos y las caídas de presión fuera del saco puede ocasionar ruptura de los mismos.

6. Para el futuro, las fermentaciones en Batch tienen que ser sustituidas por este tipo de sistemas; de ahí la importancia de ahondar en su desarrollo.

Hemos conocido también la experimentación que se hace en este campo y aún no publicada, en la cual utilizan soportes menos densos que el agua, empacados en columnas utilizando sistemas de fluidización; las partículas de soportes tales como la bermiculita en un lecho fluidizado, no tienen problemas de transferencia de masa y son fácilmente resuspendidas en gas.

7. Así, hay que pensar en dos diferentes tipos de sistemas :

En soportes muy porosos que no den problemas de transferencia de masa y presenten bastante superficie de adsorción, o en soportes como la berniculita que es menos denso que el agua y también ofrece todas las posibilidades de ser escalado. La decisión sobre qué sistema utilizar la dan los criterios generales para escoger los soportes ya enunciados.

8. Los Reactores que se emplearon cumplieron las funciones para las cuales fueron diseñados. Se emplearon reactores de flujo continuo, con columna empacada y recirculación de medio de cultivo, con controles de temperatura y aireación.

BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Aharonowitz, Y.y Demain, A.L., 1978 Carbon Catabolite Regulation of Cephalosporin Production in Streptomyces elavuligerus. Antimicrob. Agents Chemother. 14:159-164.
- (2) Aharonowits, Y.y Demain, D.L., (1979). Nitrogen Nutrition and Regulation of Cephalosporin Production in Strptomyces Clovuligerus. Can J. Microbiol. 25:61-67
- (3) Alacevic, M. et al (1966). Interspecific recombination a mono antibiotic-producing Streptomyces in antibiotics; Advances in Research, production and clinical use by Herd and Zdenar, London.
- (4) Attwell, R.W. and Cross T. Germination of actinomycetes spores. Actinomycetales: characteristics and practical importance. Ed. by Sykes and Skinner Academic Press, London, N.Y.
- (5) Baker C.G.T., Margaritis, A. and Bergougnow, M.A. (1980). Fluidization principles and applications to Biotechnology en Advances in Biotechnology vol. I. Scientific and Engineering Principles Ed. Murry Mood-Young. Proceeding of the sixth international.
- (6) Bailey and Ollis, (1977). Biochemical Engineering Fundamentals McGraw Hill Kogakusha, Ltd. p. 497-573.
- (7) Becker, B. Lechevalier, M.P. y Lechevalier, H.A. (1965). Chemical Composition of Preparations from stains of various form-genera of Actinomycetes. App. Microbiol. 13, 236.
- (8) Beck, B., Lechevalier P. et al (1965). Chemical Composition of Cell Wall Preparations from Strains of various form genera of aerobic actinomycetes. App. Microbiol. 13, 236.
- (9) Baldacci (1958). Development in the clasification of Actinomycetes. J. Microbiol. 6, 10.
- (10) Biswas, G.D. et al (1971). Transformation in Streptomyces with respect to Antibiotic Production. J. Appl. Bact. 34, 287.
- (11) Boone, C.J., Pine, L. (1968). Rapid Method for Characterization of Actonumycetes by Cell Wall Composition. Appl. Microbiol. 16, 279.

- (12) Bosnjak, M., Topolovec, V. y Vrana, M. (1978). Growth Kinetics of Streptomyces erythreus During Erythromycin Biosynthesis. J. Appl. Chem. Biotechnol. 28 , 791-798.
- (13) Bosnjak, M., Topolovec, V. y Holjevac, M. (1977). Simulation of Microbial Population Differentiation During the process of Antibiotic Biosynthesis. Proc. 12th yug, Intern. Symp. Processing Informatica 77 (6 219) 1-4.
- (14) Bosnjak, M., Vrana, M. y Topolovec, V. (1976a). Growth Kinetics of Streptomyces erythreus During Erythromycin Biosynthesis. Abstracts : Fifth International Fermentation Symposium. Berlin 12. p. 219.
- (15) Bosnjak, M., Holjevac, M. y Johanides, V. (1976). Erythromycin Biosynthesis in Semicontinuous culture of Streptomyces erythreus J. Appl. Chem. Biotechnol. 26, 333-334.
- (16) Boucher, R.M.G., Last, A.J. and Smith, G.K. (1973). Biochemical Mechanisms of Saturated Dialdehydes and their potentiation by Ultrasound. Proceedings of the Western Pharmacological Society 16, 282-288.
- (17) Corcoran, J.W. (1975). S. Adenosylmethionine: Erythromycin C-0-Metiltransferasa. Methods in Enzymology. 43, 487-498.
- (18) Corcoran, J.W. (1973). Genetic Considerations and Erythromycin-production by Streptomyces Erythreus. Genetics of Industrial Microorganisms, Actinomycetes and Fungi. Vol 2. Elsevier. Amsterdam. 339-351.
- (19) Cross, T. (1970) The Diversity of Bacterial Spores. J. Appl. Bact 33-95.
- (20) Cross, T. and Goodfellow. (1973). Taxonomy and Classification of the Actinomycetes. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance, ed by G.S. y Kessonol F.A.S. Kinner. Academic press. London. N.Y.
- (21) Datta, N. Hedges, R.W. (1971). Properties of an R Factor From Pseudomonas Aeruginosa. J. Bact. 108, 1244.
- (22) Demain, A.L. (1967). Biosynthesis of Antibiotics (J. Snelled). Academic Press, N.Y. 1967. p.29

- (23) Demain, A.L. (1970) A.L. and S. Inannue. Biochemistry and regulation of Streptomycinase ( -D. Mannosidase) Formation. Baet. Rev. 34, 1 (1970).
- (24) Demain, A.L. (1972). Celular and Enviromental Factors Affecting the Synthesis and Excretion of Metabolites . J. Appl. Chem. Biotech. 22: 345-362.
- (25) Demain, A.L. (1973). Mutation ond the produción of Secondary Metabolites. Adv. Appl. Microbiol 16: 177-202.
- (26) Demain, A.L. 1973. Introduction to the Symposium on control of Secondary Metabolism. Dev. Ind. Microbiol. 15:59
- (27) Demain, A.L. and Jacqueline, M. Piret. Why Secondary Metabolism? Microbiology 1981 Schelessinger ed. A.S.M. 356-359.
- (28) Ettler, P. y Votruba, J. (1978). Regulation of Erythromycin Fermentation. Abstracts: Eur. Congress on Biotechnology. Interlaken, Suiza. p. 62-64.
- (29) Freeman and Aharonowitz. (1981). Immobilization of Microbial Cell in Cross-Linked, Prepolymerized, Linear polycrylamide Gels: Antibiotic Production by Immobilized Streptomyces Clavuligerus Cells. Biotechnology and Bioengineering, Vol XIII, 2747-2759.
- (30) Frieda, B. Kolot. (1980). New Trends in Yeast Technology Immobilized Cells. Process Biochem 15 (7), 2-8.
- (31) Gallo, M. y Katz, E. (1972). Regulation of Secondary Metabolite Byosynthesis. J. Bacteriology 109: 659-667.
- (32) Gerber, N.N. (1969). A Volatile Metabolite of Actinomycetes, 2 methylisubomed. J. Antibiotics 22, 508.
- (33) Gianfreda, L. Parascandola, Palma, and Scardi, V. (1980). A New Method of Whole Microbial Cell Immobilization. European J. Appl Microbiology. Biotechnology. 11, 6-7.
- (34) Ghose, T.K. and Subhash Chand. (1978). Kinetic and Mass Transfer Studies on the Isomerization of Cellulose Hydrolyzate Using Immobilized Streptomyces Cells. J. Ferment Technol, Vol 56, N°4, pag 315-322.

- (35) Grootwassink, J.W.D., and G.M. Gaucher. (1980). De Novo Biosynthesis of Secondary Metabolism Enzymes in Homogeneous Cultures of Penicillium Urticae J. Bacteriol. 141: 443-455.
- (36) Gormol, S.P., Eileen. M. Scott. (1980). A Review Antimicrobial Activity, Uses and Mechanism of Action of Glutaraldehyde. Journal of Applied Bacteriology 48, 161-190.
- (37) Gordon, R.E. and Mihm, J.M. (1962). The type Species of the Genus Nocardia. J. Gen. Microbial. 27,1.
- (38) Grein, A. Heyer S.P. (1958). Growth Characteristics and Antibiotic production of Actinomycetes isolated from littoral Sediments an material suspended in Sea water. J. Bact 76, 457.
- (39) Grisebach, H. (1978). Biosynthesis of Macrolide Antibiotics. Antibiotics and other Secondary Metabolites. Biosynthesis and production. Academic press. San Francisco. 113-127.
- (40) Gotieb, D. (1966). Biosynthetic Processes Ingerminating Spores in the Fungus Spore. Ed. M.F. Modelin. London.
- (41) Hirsch, C.F. 1981. Regulation of Secondary Metabolism in Microorganisms. Microbiology. Schelessinger. Ed. A.S.M. 360-362.
- (42) Hirsch, C.F., and G.C. Ensign. (1978). Some Properties of Streptomyces viridochromogenes Spores. J. Bacteriol. 134: 1056-1063.
- (43) Josie Wei Chua, Altan Erarslan, Shinichi Kinoshita and Hisaharu Taguchi. (1980). 2,3 Butanediol production by Immobilized. Enterobacter aerogenes IAM 1133 with Kcarrageenan. J. Ferment Technol. Vol. 58, N°2, p. 123-127.
- (44) Jared, H.F., Prescottt, G.C., Hinman, J.W. y Caron, E.L. (1953) Colorimetric Determination of Erythromycin. Anal. Chem. 25, 1195-1197.
- (45) Kagan. C. (1975). Antimicrobial Therapy. Cap. 6. Ed. Saunders, N.Y.
- (46) Kala Koutskii, L.V. and Agre. S. Nina (1973). Endosporas of actinomycetes: Dormancy and Germination. Actinomycetales: Characteristics and practical Importance. Ed. by Sykes y Skinner. Academic Press N.Y.

- (47) Klein, F. Wagner. (1978). Immobilized Whole Cells. Characterization of Immobilized Biocatalysts. Band 84. Nr 1742-1731.
- (48) Korn. A.H., Fearheller. S.H, Filachione. E.M. Glutaraldehyde: Nature of the Reagent. J. Mol. Biol. (1972) 65, 525-529
- (49) Krouwel. P.G, Vander Laan. W.F.M. and Kossen N.W.F. (1980). Continuous production of n-butanol and Isopropanol by Immobilized, Growing. Clostridium butylicum Cells. Biotechnology Letters Vol 2 N°5, 253-258 (1980).
- (50) Küenzi, M.T. (1978). Process Design and Control in Antibiotic Fermentations. Antibiotics and other Secondary Metabolites. Biosynthesis and production. Academic Press. Sn. Francisco 39-56.
- (51) Le Chevalier, H. A. 1975. Appl. Microbiol. 19: 25-57.
- (52) Lutz, A., O. Grooten and Hofferer. J. Evolution et Modifications de la resistance des Staphylocoques. Pathogenes á six Antibiotiques usuels de 1950 á 1956. Ann. Inst. Pasteur 92, 778 (1957) Citado por Oleinick (1975) artículo Noney Oleinick.
- (53) Maddox, I.S., Dunnill. P. and Lilly. M.D. Use of Immobilized Cells of Rhizopus Nigricans for the 11 Hydroxylation of Progesterone BioTech and Bioeng. Vol XXIII, p. 345-354.
- (54) Malik, V.S., and, Vining, L.E. (1970). Metabolism of Chloramphenicol by the producing organism. Can. J. Microbiol. 16: 173
- (55) Martin, J.R., y Egan, R.S. (1970). 5,6 Dideoxy-5-oxo erythronolide B, ashunt Metabolite of Erythromycin Biosynthesis. Biochemistry 9: 3439-3445
- (56) Martin, J.F. (1976). Developments in Industrial Microbiol. 17, 223.
- (57) Martin, J.F. (1977). Control of Antibiotic Synthesis by Phosphate. Advances in Biochemical Engineering Vol 6. Springer. Verlag N.Y. 105-125.
- (58) Martin, J.F., (1979). Economic Microbiology Secondary Product of Metabolism. A.H. Rose. Ed. Academic Press. London 3: 2-23.

- (59) Martin y Demain. (1980). Microbiol. Rev. 44, 230-251.
- (60) Mao, J.C., H., and E.E. Robishaw (1972). Erythromycin a peptidyl transferase effector. Biochemistry 11, 4864.
- (61) Messing, R. and P. Oppermann, R. US. patent 4, 149, 937 (1979)
- (62) Messing, R.A. Carriers for Immobilized Biologically Active Systems. Advances in Biochemical Engineering Vol 10 Immobilized Enzymes I. p. 53-73. (1978).
- (63) Monsan, Puzo, G. and Mazarguil, H. (1975) Etude du mécanisme d'établissement des liaisons Glutaraldéhyde-protéines. Biochimie 57, 1281-1292.
- (64) Bosnjak Marijan, Velinier Topolovec and Mladen Vrana. (1978). Growth Kinetics of Streptomyces erythreus. During Erythromycin Biosynthesis. J. appl. Chem Biotechnol 28 (791-798)
- (65) Navarro, J.M. and Durano, G. (1977) Modification of Yeast Metabolism by Immobilization into porous glass. Europ.J. Applied Microbiology, (4,4,242).
- (66) Oleinick, N.L., (1975). Antibiotics Mechanism of Action of Antimicrobial Agents. J.W. Corcoran. Ed. Springer Verlag. N.Y. III: 396.
- (67) J. Paca, P. Ettler, and V. Grégr (1978). Oxygen Transfer. Rate in Medio Used for Erythromycin Biosynthesis. J. Ferment. Technol. vol. 56. No.2, p. 144-151,
- (68) Pirt, J.S. (1975). Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific. Londres p.17.
- (69) Pirt, J.S. and Righelato, P.C. (1968). "The Influence of Maintenance Energy and Growth Rate on the Metabolic Activity, Morphology and Conidiation of P. Chrysogenum". J. Gen. Microbiol. 50, 399.
- (70) Quintero, R. et al, 1980. Reporte Conacyt. Proyecto GAPA.
- (71) Racznska-Bojanowska, K., Rafalski, A. y Ostrowska Krysiak, B., (1970). Acta Biochimica Polonica. 17:331.

- (72) Rasmussen, K.E. and Albrechtsen, J. (1974). Glytaraldehyde. Influence of pH, Temperature and Buffering on the Polymerization Rate. Histochemistry 38, 19-26.
- (73) Reynolds, P.M. (1954). Extracelular Chitinase from a Streptomyces s.p. J. Gen. Microbiol. 11, 150.
- (74) Ress, D.A. (1972). Shapely Polysaccharides. Biochem. J. (1972) 126, 257-273.
- (75) Richards, F.M. Knowles, J.R. (1968). Glutaraldehyde as a Protein Cross-Linking Reagent. J. Mol. Biol. (1968) 37, 231-233.
- (76) Rinando, M., Karimian, A., Milas, M. Polyelectrolyte Behavior of Carrageenans in Aqueous Solutions. Biopolymers, vol. 18, 1673-1683.
- (77) Romero, T.G. (1981). Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- (78) Rochas, C., Rinando, M. (1980). Activity Coefficients of Counterions and Conformation in Kappa-Carrageenan. Systems. Biopolymers, vol. 19, 1675-1687.
- (79) Rochas, Cyrille, Rinando Marguerite (1980). Structural and Conformational Investigation of Carrageenans. Biopolymers, vol.19, 2165-2175.
- (80) Rose, L.M. (1981). Chemical Reactor Design in Practice Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam Oxford, N.Y.
- (81) Solomons, G.L. (1969). Materials and Methods in Fermentarions. Academic Press. San Francisco.
- (82) Skinner, F.A. (1956b). Inhibition of the Growth of Fungi by Streptomyces s.p. in relation to nutrients Condiciones. J. Gen. Microbiol. 14, 381.
- (83) Skinner, F.A. (1956a) A Method for Distinguishing Between viable spores and Mycelial Fragments of Actinomycetos in soils. J. Gen. Microbiol. 5, 159.
- (84) Smith, R.L., Bungary, H.R. y Pittenger, R.C. (1962) Growth Biosynthesis Relationships in Erythromycin Fermentation. Applied. Microbiology. 10,253-256.

- (85) Stark, W.M. y Smith, R.L. (1961). The Erythromycin Fermentation. Ind. Microbiol. 3, 211-229. .
- (86) Stryer, L. (1980). Biochemistry, 2d, ed. W.H. Freeman N.Y.
- (87) Suzuki, S. and Karube, I. Production of Antibiotic and Enzymes by Immobilized Whole Cells. Immobilized Microbial Cells. Ed.by Venkata Subramanian.
- (88) Turner, W.B. (1973). Secondary Metabolism with Special Reference to Actinomycetales. The Society for Applied Bacteriology. Symposium. Series No.2, ed. 6 Sykes and F.A. Skinner.
- (89) Taunman, S.B., N.R. Jones, F.E. Young, J.W. Corcoran (1966). Sensitivity and resistance to Erythromycin in Bacillus subtilis 168: the Ribosomal Binding of Erythromycin and Chloramphenicol. Biochim. Biophys. Acta 123, 438.
- (90) Vanék, Z. y Majer, J. (1967). "Antibiotics : Biosynthesis". (D. Gottlieb y P.D. Shaw, Eds), vol. II, p. 154-188. Springer-Verlag, Berlin.
- (91) Vorlop, K.D. and J. Klein, (1981). Formation of Spherical Chitosan Biocatalysis by Iontropic Gelation. Biotech. Letters Vol. 3, No.1 9-14.
- (92) Venkatasubramanian, K. and Yoichiro Toda (1979). Nitrogen Fixation by Immobilized Nif Depressed Klebsiella pneumoniae cells. Paper presented ar 2th symposium on Biotechnology. Gatlinburg, Tennessee October 3-5, 1979.
- (93) Wada, M., Kato, J. and Chibata, I, (1979). Immobilized Growing Cells Using Carrageenan Gel and their properties. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8, 241-247.
- (94) Wang, I.C., Cooney, C. L., Demain, A.L., Dunnill, P. Humphrey, A.E., Lilly, M.D. (1981). Fermentation and Enzyme Technology, Ed. by John Wiley and Sons, New York, Toronto.
- (95) J.B. Walker (1967). Enzymic Studies on the CBiosynthesis of Streptomycine and Related Antibiotics". Devs. Med. Microbiol. 8, 109, 1967.

- (96) Webster, L.A., Shuler, M.L. (1979). Whole Cell Hollow-Fiber Reactor : Effectiveness Factors. Biotechnology and Bioengineering Vol. XXI, pp 1725-1748.
- (97) Weinberg, E.D. (1981). The Concept of Secondary Metabolism. Microbiol. Shelessinger. Ed. A.S.M. p. 356-359.
- (98) Weinberg, E.D. (1971). Secondary Metabolism : Raison d'etre. Presp. Biol. Med. 14, 565.
- (99) Wiley, J. and Sons ., Inc. (1973). Immobilization of Whole Cells in a Membraneus Form. Biotech. and Bioeng. Vol. XV 565-569.
- (100) Williams, S.T. et al (1970). Acomparative Study of Spore Formation in TW. Streptomyces Species. Microbios 5, 17.
- (101) Williams, S.T., Sharples, G.P. and Bradshaw, R.M. (1973). The Fine Structure of the Actinomycetales. Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. Ed. by G.Sykes and Skinner.
- (102) Wolf R. Vieth and K. Venkatsubramanian (1979). Immobilized Microbial Cells in Complex Biocatalysis. Immobilized Microbiol Cells. Ed. by K. Venkatsubramanian American Chemical Society Washington, D.C.
- (103) Woodruff, H.B. (1966). Symp. Soc. Gen. Microbiol. 16,11.
- (104) Yamaguchi, T. (1965). Comparison of the Cell Wall Composition of Morphologically distinct Actinomycetes. J. Ge. Appl. Microbiol. 13, 63
- (105) Yamaguchi, T. (1965). Comparison of the Cell Wall Composition of Morphologically Distinct Actinomycetes. J. Bact. 89,444.
- (106) Yasushi Morikana, Isao Karube and Shuich. Suzuki (1980). Continuous Production of Bacitracin by Immobilized Living Whole Cells of Bacillus s.p. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXII, pp. 1015-1023.
- (107) Yamamoto, K., Tosa, T., Chibata, I. (1980). Continuous Production of L-Alanine Using Pseudomonas dacunhae Immobilized with Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXII, p. 2045-2054 (1980)

- (108) Young, M.M., Lamptey, J., Robinson, C.W. (1980). Immobilization of Yeast Cells on Various Supports for Ethanol Production. Biotechnology Letters Vol. 2, No.12 pp. 541-548 1980.
- (109) Tetsuya Tosa, Tadashi Sato, Takao Mori, Koza Yamamoto, Isao Takata, Yutaka Nishida and Ichero Chibata. Immobilization of Enzymes and Microbiol. Cells Using Carrageenan as Matrix. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXI, 1697-1709 (1979).

## BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

- (110) Cheetham, Peters. Developments in the Immobilization of Microbial Cells and their Applications. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Ed. by Alan Wiserman, N.Y.
- (111) Cheruy, A., Durand, A. Optimization of Erythromycin Biosynthesis by controlling pH and Temperature: Theoretical Aspects and Practical Application, p. 29.
- (112) Sprinkmeyer, H. Pope, H. (1977). Abstracts : Fifth Symposium of the Federation of European Microbiological Societies. Basel, Suiza, p. 26.
- (113) Venkota Subramanian. Immobilized Microbial Cells. American Chemical Society. Washington D.C.
- (114) Rose M.T., Secondary Products of Metabolism, Economics Microbiology Vol.3, pag. 35-46. ed. Academic Press.San Francisco.
- (115) Chibata I. Applications of Immobilized Enzymes and Microbial Cells. Immobilized Enzymes 1978. John Wiley & Sons New York.
- (116) Garth W.Jones. The Attachment of Bacteria to the Surfaces of Animal Cells. Microbial Interactions. Pag. 141-166, Ed. by J.L.Reissing.
- (117) Quintero R., Ingenierfa Bioquímica, pag.133. Ed. Alhambra Mexicana 1981.

ANEXO

METODO COLORIMETRICO PARA DETERMINACION  
DE ERITROMICINA

Referencia: Jard. H. Ford, George C. Prescott, J.W.Hinman, and E. Lous Caron., Analytical Chemistry, Vol. 25 N°8 Agosto 1953.

OBJETIVO: Determinación de Eritromicina por método colorimétrico.

FUNDAMENTO: Este método de análisis esta basado en el desarrollo, de una coloración intensa en presencia de ácido sulfúrico 27 N, la cual tiene su máxima absorción en 484 nm.

Reactivos:

Acido Sulfúrico 27 N: Adicione 719.62 ml. de ácido sulfúrico grado analítico (gravedad específica 1.84) a 280.38 de agua destilada, lentamente y con agitación en un baño de hielo.

Buffer de carbonatos 0.1 molar, pH 9.5: Disuelva 7.47 gramos de Bicarbonato de Potasio y 3.50 g. de carbonato de potasio anhidro en agua destilada y completar a un litro.

Acetato de Amilo: Tomar acetato de amilo grado analítico y adicione 0.1 por ciento de volumen de una solución de bicarbonato de potasio a 5%.

Acido Clorhídrico 0.1 N:

Buffer Fosfato 0.1 M, ph 7: Disuelva 2.72 g. de fosfato de potasio dehidrogenado y 6.84 g. de fosfato ácido de potasio trihidrato en agua y complete a 500 ml.

#### PROCEDIMIENTO

**Curva estandar:** Prepare una solución que contiene 200 por ml. de Eritromicina base, en buffer de fosfatos de pH 7. Diluya alicuotas en solución de manera que den concentraciones de 20 a 200 gamas por ml. Pipetee una alicuota de 5 ml. y -- adicione 5 ml. de ácido sulfúrico 27 N. Después de 30 minutos, leer absorbencia a 485 nm, usando agua destilada como blanco.

Caldo de fermentación: Para determinar Eritromicina de una clado de fermentación se procede de la manera siguiente: Diluya una alicuota del caldo de fermentación en suficiente cantidad de carbonatos hasta que la concentración sea aproximadamente igual a 50 por ml. Filtre y remueva el micelio innecesario. Pipetee 20 ml. de la solución del caldo fermentativo, y adicione 20 ml. de la solución del caldo fermentativo y adicione 20 ml. de acetato de amilo en un tubo de centrifuga, tape el tubo y agite vigorosamente por espacio de 30 segundos. Pipetee 10 ml. de HCL 0.1 N y adicione 10 ml. de la capa de clara de amil acetato en un embudo de decantación y agite vigorosamente por 30 segundos. Drene la capa clara y pipetee 5 ml. dentro de un tubo de ensayo adicione 5 ml. de ácido sulfúrico 27 N. Normal proceda de igual forma que en la curva estandar.

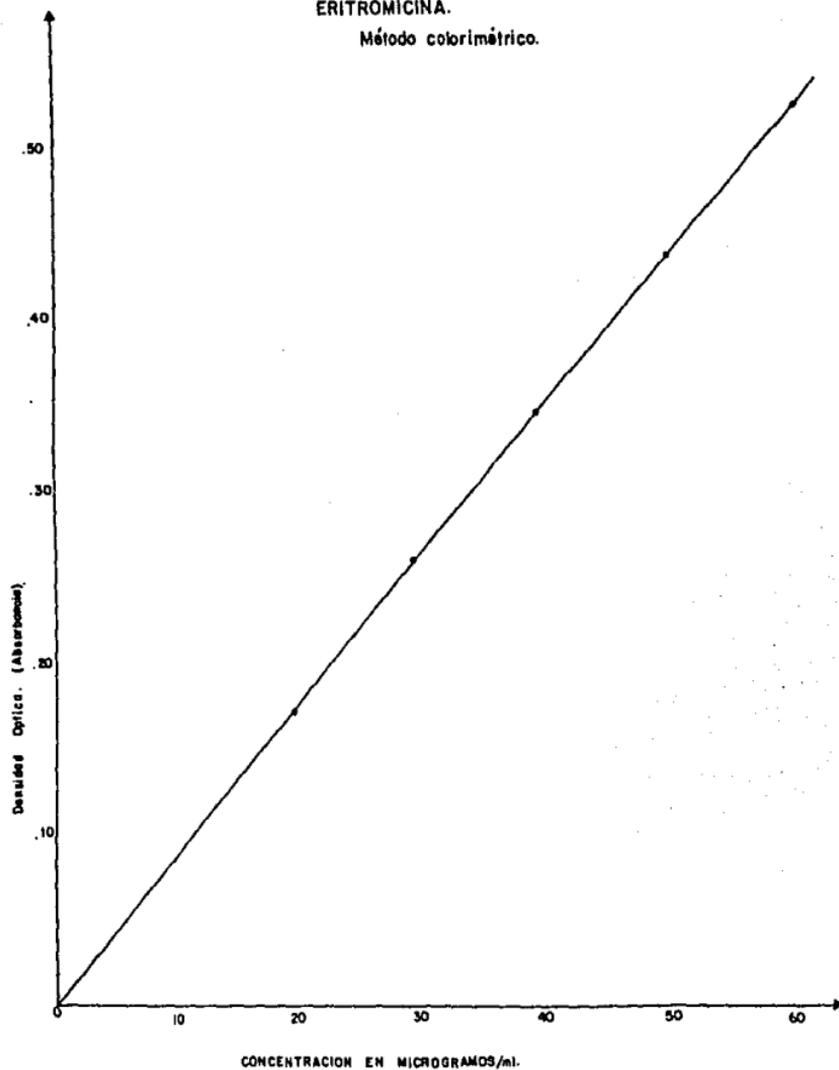
TABLA 21. CURVA ESTANDAR DE ERITROMICINA

## TABLA DE DATOS

CONCENTRACION DE ERITROMICINA mg/ml	D. O. a 485 mμ
20	0.170
30	0.260
40	0.345
50	0.435
60	0.525

GRAFICA 4. CURVA ESTANDAR DE  
ERITROMICINA.

Método colorimétrico.



**DETERMINACION:** Diluir la muestra problema en buffer fosfato pH 7.0, hasta obtener concentraciones aproximadas de 50 mg por ml. Colocar 20 microlitros de la solución sobre el sensidisco. Seguir el mismo procedimiento de la curva estándar, Leer los resultados en la curva estándar para hallar la concentración.

**DETERMINACION DE AZUCARES  
METODO DE ANTRONA.**

**REFERENCIA:** Keleti y Leaderer(1974). Handbook of Micromethods for the Biological Science. Van Nostrand Reinhold, Toronto.

**OBJETIVO:** Determinación de azúcares totales

**FUNDAMENTO:** El principio de la reacción es la condensación del antronolol, el cual reacciona con ácido sulfúrico creando un derivado del furfural de los azúcares presentes.  
Las amino azúcares y N-acetyl-amino azúcares no reaccionan con este reactivo.

**REACTIVOS:** a) Reactivo de antrona: Adicionar a un matraz de 2.000 ml., 330 ml. de agua destilada (fría 4°C), agitar y adicionar 760 ml. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posteriormente adicionar 1 g. de antrona, agitar hasta disolución completa. (el color debe ser amarillo paja).

b) Acido clorhídrico concentrado reactivo analítico.

**CURVA ESTANDAR:** Prepare una solución que contiene 200 por ml. de -

glucosa en agua destilada. Prepare soluciones de 20 a 200 ml. Pipetee una alícuota de 10 ml. de estas - soluciones y adicione 10 ml. de reactivo de antrona, aige vigorosamente. Lleve al baño María en ebulli -- ción por 10 minutos. Colóquelo en un baño de agua fría y lea a 622 mu.

**PREPARACION DE LAS MUESTRAS:**

a) De las muestras provenientes de fermentación, tomar 5 ml. y colocarlos en un matraz aforado de 100 ml. lavando la pipeta con agua destilada, aforar con la misma y agitar vigorosamente. De éste matraz tomar una alícuota de 5 ml. y llevarla a un tubo de ensayo; a continuación adicionarle 1 ml. de HCL concentrado. Colocar el tubo en ebullición durante 22 minutos; adicionar 20 ml. de agua destilada para enfriar. La solución se filtra en papel 615 y se recibe en un matraz aforado de 100 ml., el cual tiene la mitad de agua destilada, después de filtrar la solución del tubo se afora el matraz con agua destilada y agita vigorosamente.

De la solución preparada arriba, tomar 2 ml. en un tubo de ensayo, a la cual se adiciona 10 ml. de -- reactivo de antrona, agitando posteriormente 10 segundos; al mismo tiempo se prepara un blanco, con 2 ml. de agua destilada y 10 ml. de reactivo de -- antrona.

El blanco y muestra se colocan en el baño de ebullición durante 12 minutos; después de los cuales se enfrían en hielo. Leer absorvancia a 622 mu.

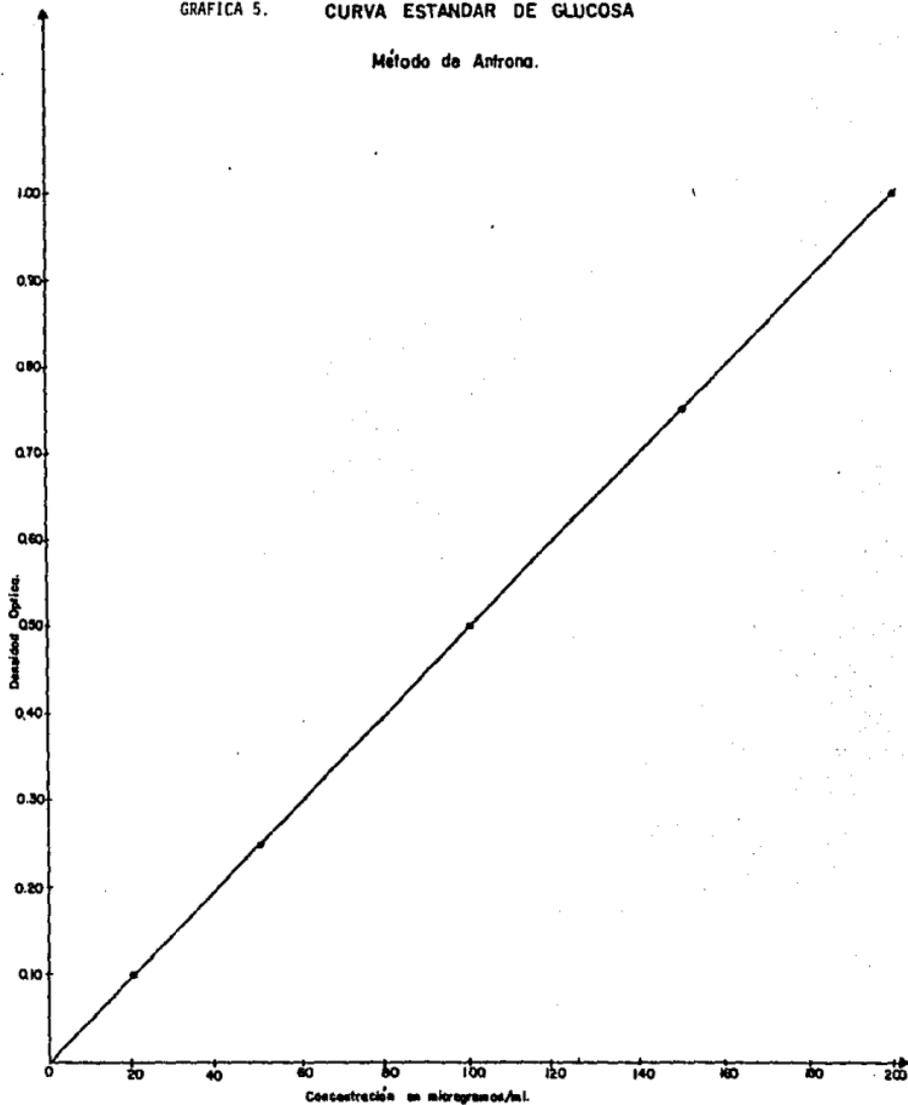
TABLA 22. CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA

METODO DE ANTRONA .

CONCENTRACION en $\mu\text{g}/\text{ml}$ .	D, OPTICA 622 nm,
20	0.100
50	0.245
100	0.510
150	0.750
200	1.000

GRAFICA 5. CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA

Método de Antrona.



DETERMINACION DE BIOMASA S.erytreus POR DENSIDAD OPTICA

## DENSIDAD OPTICA

La densidad óptica es un método sencillo para determinar biomasa, cuando no se tienen en el medio de fermentación sólidos en suspensión.

**ESTANDARIZACION:** Se toma una aluquota de 10 ml. del medio de cultivo (más biomasa), se centrifuga a 3 000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se desecha y el precipitado se resuspende en 5 ml de agua destilada. Se lee a 540 mu, en caso de que la medida de absorbancia sea superior a 1, deben hacerse diluciones y el resultado por el factor de dilución.

T A B L A 23

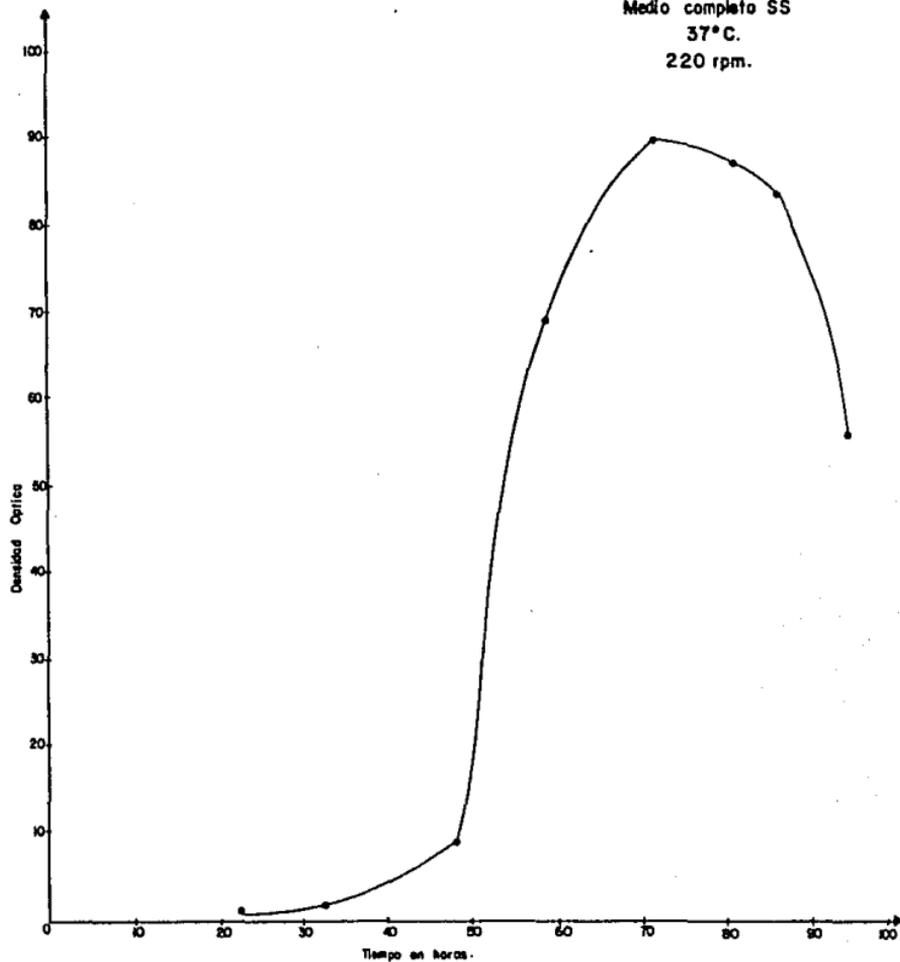
## CURVA DE CRECIMIENTO MEDIDA POR DENSIDAD OPTICA

Tiempo en horas	D.O. 540 mu
0	0,045
8	0,045
24	0,060
36	0,150
48	0,750
54	5,500
60	6,800
72	9,000
96	5,500

GRAFICA 6.

CURVA DE CRECIMIENTO DE  
*STREPTOMYCES ERYTREUS*

Medido por Densidad Optica.

Medio completo SS  
37°C.  
220 rpm.

## DETERMINACION DE BIOMASA POR PAQUETE MICELIAR

REFERENCIAS: PRINCIPLES OF MICROBE AND CELL CULTIVATION, E. TOHN PIRT. (68)

Es método para medir biomasa voluminosa, como cultivo de hongos, la medida del volumen se hace en un tubo graduado de centrifuga. El método no es recomendable si hay sólidos en el medio. Este método necesita ser estandarizado.

ESTANDARIZACION DEL METODO: Coloque 10 ml. de muestra del medio de cultivo mas biomasa, en un tubo de centrifuga y centrifugue a 3 000 rpm durante 10 minutos.

LECTURA: Se debe leer en porcentaje, la cantidad de precipitado en el tubo.

## T A B L A 24

MEDIDA DE BIOMASA DE S. Erythreus POR EL METODO DE  
PAQUETE MICELIAR

Tiempo en horas	Paquete Miceliar % de precipitado
0	.10
8	.10
16	.20
24	.40
36	.70
48	2.50
60	8.00
72	9.0
96	6.0

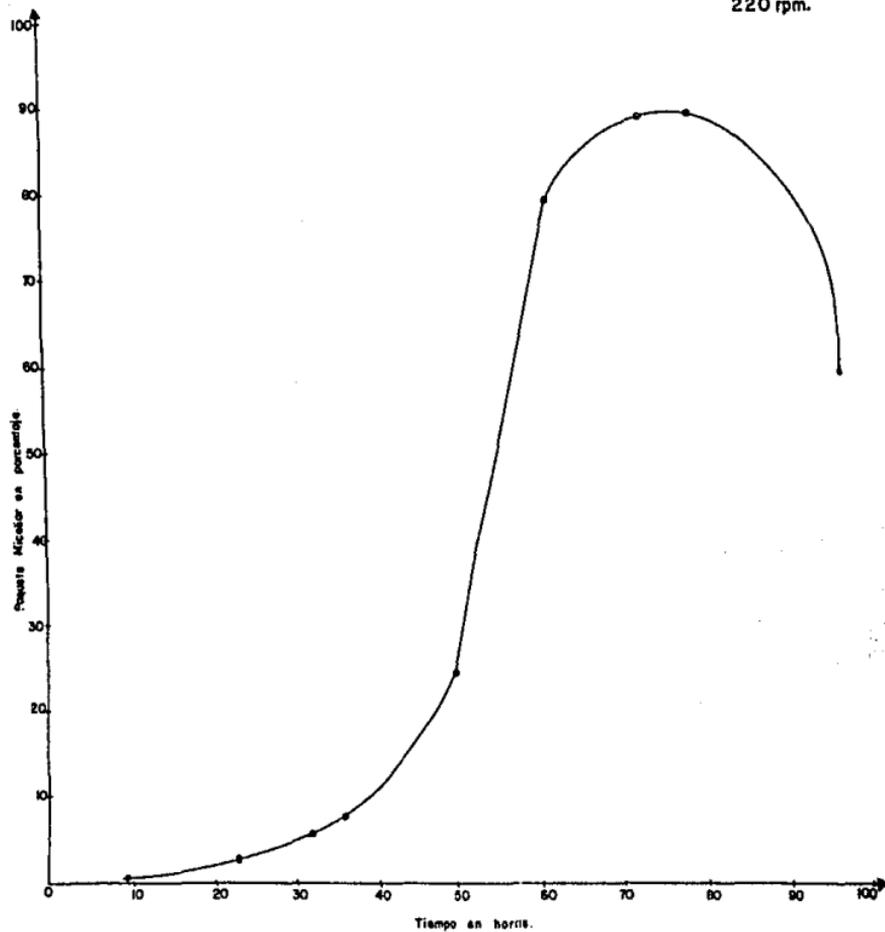
GRAFICA 7. CURVA DE CRECIMIENTO DE  
*STREPTOMYCES ERYTREUS*

Medido por poqueta Micelilar

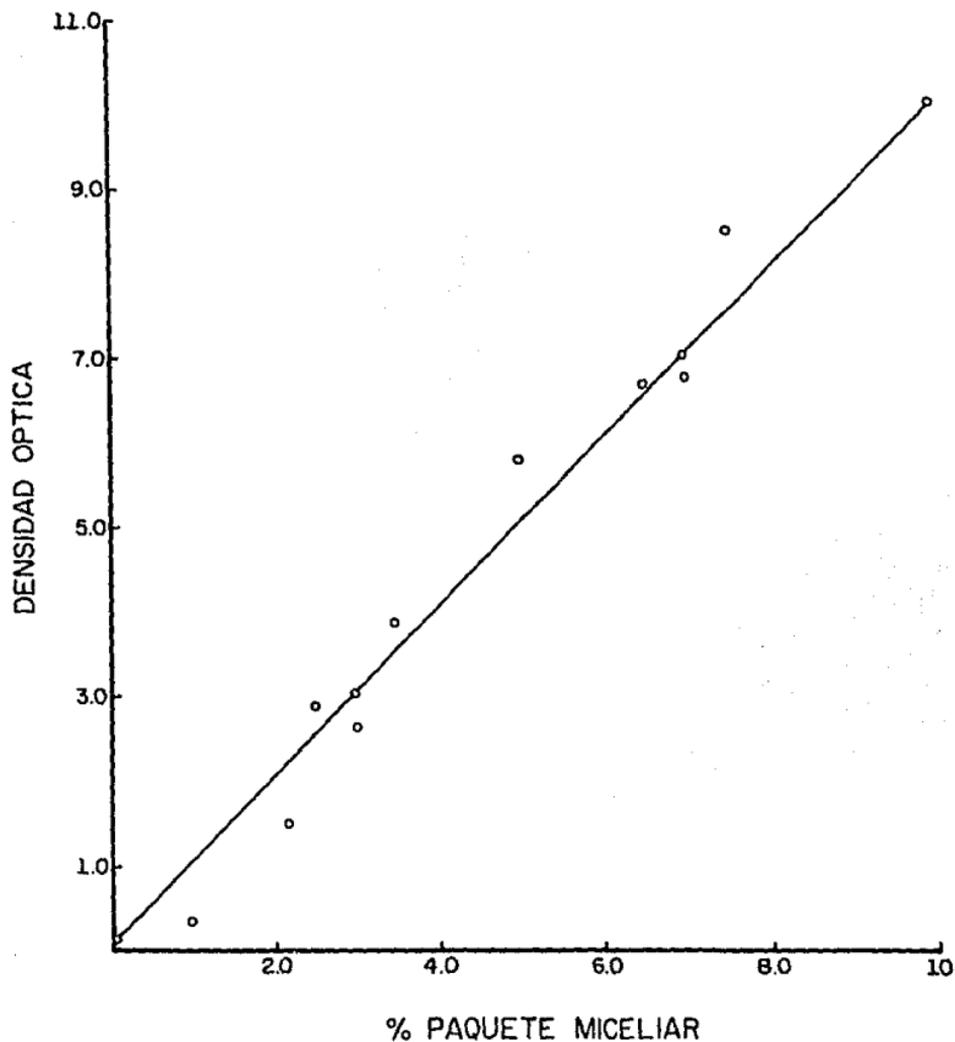
Medio completo SS.

37°C.

220 rpm.



## CORRELACION ENTRE LA DETERMINACION DE BIOMASA POR DENSIDAD OPTICA Y PAQUETE MICELIAR



## B I O E N S A Y O

**OBJETIVO:** Determinación de Eritromicina por método biológico, utilizando técnica de difusión de Agar.

**FUNDAMENTO:** La inhibición de crecimiento de un microorganismo sensible al antibiótico.

### MATERIALES:

**AGRAR NUTRITIVO:** Preparar cajas con 15 cc de agar nutritivo exactamente medidos.

**Sarcina lutea:** La cepa de Sarcina lutea utilizada es una mutante hipersensible a la Eritromicina, NNRL-B-1018, obtenida del Agricultural Research Service Culture Collection, conservado por Northern Regional Research Laboratory, en Peoria, IL.

**SENSIDISCOS VIRGENES:** Sensidiscos ANALYTICA PAPER 1/4" de diámetro con capacidad para 20 - 30  $\mu$ l.

**CURVA PATRON:** Preparar en solución amortiguadora fosfatos pH 7.0, una solución de Eritromicina de 100 mg por ml. Hacer diluciones de 10 a 100 mg por ml. Colocar 20 microlitros de cada solución sobre sus respectivos sensidiscos. Después de permitir la difusión del antibiótico por 2 horas, hacer aspersión con una suspensión de Sarcina lutea. D. Optica aproximada de 2. Incubar por 36 horas a 37°C medir los diámetros de inhibición de crecimiento de la bacteria sensible.

**GRAFICAR:** Logaritmo de la concentración en las abscisas y diámetro de inhibición en los ordenados. Corregir la curva para hallar concentración por ml.

TECNICA PARA DETERMINAR LA EDAD DE COSECHA DEL  
MICELIO PARA INMOVILIZAR

---

Este experimento se diseñó de la siguiente manera:

1. Preparación del preinóculo
  2. Crecimiento en medio vegetativo
  3. Cosecha a diferentes tiempos y determinación de peso húmedo.
  4. Paso al medio de fermentación con fuente de carbono limitada.
  5. Toma de muestra
- 
1. El preinóculo fué común para todos los matraces que contenían medio vegetativo. Se partió de un cultivo crecido en medio sólido. M.C.S., crecido a 37°C y a 225 rpm.
  2. Se inocularon 6 matraces de dos litros, con un litro de medio vegetativo (M.C.S.) en iguales condiciones que el preinóculo.
  3. Se cosecharon las células a 9000 K, en un cotor G.S.A. Dos fenchbach se cosecharon a las 26 horas, dos a las 36 horas y dos a las 48 horas. Se hizo peso húmedo con el fin de colocar en el medio de fermentación, una cantidad de células similar.
  4. En 6 matraces fenchbach de dos litros con un litro de medio de cultivo en el cual se limitó la fuente de carbono (utilizado como medio de fermentación), se inocularon las células en cantidad de 75.5 mg de peso húmedo por cada fenchbach. Las condiciones de fermentación fueron las mismas que para el crecimiento del preinóculo.

Se tomaron muestras y se determinó producción de eritromicina por bioensayo o difusión en gel.

## TECNICA PARA INMOVILIZAR EN CARRAGENIA

REFERENCIA: Tetsuy A. Tosa et al 1979  
Biotechnology and Bioengineering XXI, pag.1697 -  
1709.

La carragenia es un polisacárido compuesto de unidades estructurales de B.D. sulfato de galactosa.

INMOVILIZACION: Disuelva 3.4% (w/u) de K carragenia en 68 ml, de solución de buffer -acetatos- pH 7.0, previamente calentada a 70° a 80°C dejar enfriar a 40°C.

En 32 ml de solución salina a 40°C, suspender 3 g. de micelio cosechado a las 36 horas, mezclar las dos suspensiones. Extender el contenido y colocarlos a 10°C, sobre un lecho de KCL 0.3 molar. Cortar cuadros de 3 mm x 3 mm.

CURTIDA: Tratamiento con glutaraldehído y etilen diamina. 8 ó 10g de peso de la preparación inmovilizada, suspende en 10 ml. de solución de buffer acetatos pH 7.0, 0.3 M de KCL y 0.05 M dietil diamino, agitar por 10 minutos a 5°C., adicione glutaraldehído al 1% por 30 minutos a 5°C. Lavar suficientemente con solución fría de KCL 0.3 M.

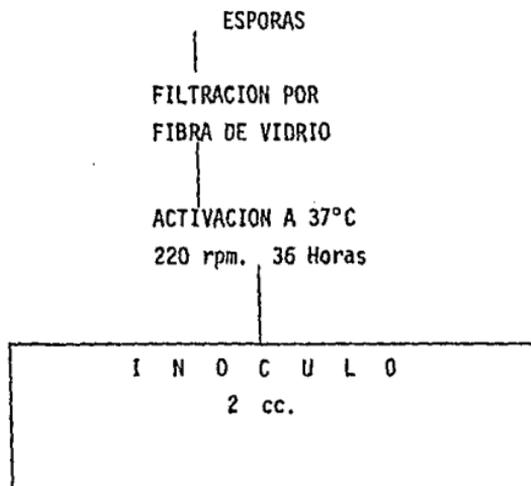
## ENCAPSULACION EN DISCOS DE NITROCELULOSA

Condiciones del experimento.

Se partió de una suspensión estandar de esporas.

EXPERIMENTO DE INMOVILIZACION DE  
*Streptomyces erythreus*

---



INMOVILIZACION

ENCAPSULACION EN  
BOLSAS DIALISIS

Control de micelio  
Libre  
Muestra cada 24 h.

MATRACES PARA DESCABEZAR

24 horas	2 matraces
48 horas	2 matraces
60 horas	2 matraces
96 horas	2 matraces
120 horas	2 matraces
144 horas	2 matraces
166 horas	2 matraces
200 horas	2 matraces

24 h.
48 h.
60 h.
96 h.
120 h.
144 h.
166 h.
200 h.

CALCULOS

$$\text{Productividad} = \frac{\text{concentración de eritromicina mg/l}}{\text{tiempo en horas}}$$

productividad se expresa en mg/ml h. de eritromicina

$$\text{Producción específica} = \frac{\text{concentración de eritromicina}}{\text{g. de células en unidad de volumen}}$$

Cálculos para determinar productividad y producción específica en células INMOVILIZADAS EN GEL de Kappa Carragenina.

Peso Células Inmovilizadas = 15 g. de peso húmedo

1 g. de peso húmedo es equivalente a 0.1301 g de peso seco

- En la Columna hay 42 g de soporte más células inmovilizadas

- En 42 g de soporte hay 6.30 g. de peso húmedo de células que equivale a 0.819 g de peso seco.

Biomasa en peso seco = 0.819 g = 819 mg

Cantidad de Eritromicina = concentración en ug/ml x volúmen en ml.

Volúmen = 500 ml

Concentración ug/ml	Cantidad de ERITROMICINA en ug.
------------------------	---------------------------------------

8.60	4,300
------	-------

21.00	10,500
-------	--------

11.00	5,500
-------	-------

4.20	2,100
------	-------

Producción específica =  $\frac{\text{Cantidad de ERITROMICINA}}{\text{peso seco de BIOMASA}}$

productividad =  $\frac{\text{Cantidad de ERITROMICINA}}{t \times h}$

1 x h

CALCULOS DE PRODUCTIVIDAD Y PRODUCCION ESPECIFICA EN UNA FERMENTACION  
 CON CELULAS INMOVILIZADAS EN GEL DE Kappa carragenina

TIEMPO HORAS	CONCENTRACION DE ERITROMICI CINA mg/l	BIOMASA g/l	PRODUCTIVIDAD DE ERITROMICI NA mg/l.h	PRODUCCION ESPECIFICA mg DE ERITROMICINA POR g DE CELULAS
16	2.60	1.638	0.163	1.50
42	21.00	1.638	0.50	12.82
90	11.00	1.638	0.122	6.70
113	4.20	1.638	0.037	2.56

CALCULOS DE PRODUCTIVIDAD Y PRODUCCION ESPECIFICA EN UNA FERMENTACION  
TRADICIONAL

TIEMPO HORAS	DENSIDAD OPTICA	PESO SECO g/l	CONCENTRACION DE ERITROMICINA mg/l
0	0.045	.7	-
8	0.045	.7	-
24	0.060	.8	10
36	0.150	1.0	40
48	0.750	1.4	60
54	5.500	5.3	80
60	6.800	6.5	160
72	9.000	8.3	200
96	5.500	5.3	205
113	6.500	6.3	215

TIEMPO HORAS	CONCENTRACION DE ERITROMICINA mg/l	BIOMASA g/l	PRODUCTIVIDAD mg/l.h	PRODUCCION ESPECIFICA mg DE ERITROMICINA POR g DE CELULAS
0	-	.7	-	-
8	-	.7	-	-
24	10	.8	0.4	12.50
36	40	1.0	1.1	40.00
48	60	1.4	1.25	42.86
54	80	5.3	1.48	15.09
60	160	6.5	2.66	12.30
72	200	8.3	2.77	24.10
96	205	5.3	2.13	38.67
113	215	6.3	1.90	34.13

CALCULOS PARA PRODUCCION ESPECIFICA Y PRODUCTIVIDAD EN EL BATCH  
 UTILIZADO COMO REFERENCIA PARA LA INMOVILIZACION DE SACOS DE  
 NITROCELULOSA

Vol. 50 ml

TIEMPO HORAS	PESO SECO g/l	CONCENTRACION DE ERITROMICI NA mg/l	PRODUCTIVIDAD DE ERITROMICI NA mg/l.h	PRODUCCION ESPECIFICA EN mg DE ERITROMICINA POR g. DE CELULA
24	.80	10.62	0.44	13.275
48	1.40	12.82	0.27	9.157
72	8.30	29.90	0.42	3.602
96	5.30	43.59	0.45	8.22
120	6.50	92.57	0.77	14.24

CALCULOS PARA PRODUCCION ESPECIFICA Y PRODUCTIVIDAD DE ERITROMICINA POR  
 CELULAS INMOVILIZADAS EN SACOS DE NITROCELULOSA.

Vol. 50 ml

TIEMPO HORAS	PESO SECO g/l	CONCENTRACION DE ERITROMICI NA mg/l	PRODUCTIVIDAD DE ERITROMICI NA mg/l.h	PRODUCCION ESPECIFICA EN mg. DE ERITROMICINA POR g. DE CELULA
24	.80	14.10	0.5875	17.625
48	1.40	17.00	0.3542	12.14
72	8.30	24.80	0.344	2.98
96	5.30	36.31	0.378	10.00
120	6.50	36.00	0.300	5.53