

2 E. No. 117



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA LA
DETERMINACION DE AMINOACIDOS DE HARINA DE SOYA
USADA COMO NUTRIENTE EN LA PRODUCCION DE
ANTIBIOTICOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r o p o n e

BERTHA LILA VENTURA ESCANGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

| | Página |
|---|--------|
| I .-. INTRODUCCION. - - - - - | 1 |
| II. -. IMPORTANCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA MATERIA PRIMA DURANTE LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE ANTIBIO-- TICOS. - - - - - | 4 |
| A.- Generalidades. - - - - - | 4 |
| B.- Harina de Soya como fuente de Nitrógeno. - - - - - | 6 |
| C.- Proceso para la Obtención de Harina de Soya. - - - - - | 9 |
| III.- ANTECEDENTES DE LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS. - - - - - | 14 |
| A.- Generalidades.- - - - - | 14 |
| A.1.- Aspectos económicos .- - - - - | 16 |
| A.2.- Aspectos técnicos. - - - - - | 22 |
| B.- Los antibióticos Macrólidos. - - - - - | 26 |
| B.1.- Eritromicina. - - - - - | 26 |
| B.1.a.- Sales ácidas.- - - - - | 26 |
| B.1.b.- Esteres de desosamina. - - - - - | 26 |
| B.1.c.- Mecanismo de acción. - - - - - | 27 |
| B.2.- Oleandomicina. - - - - - | 27 |
| B.3.- Espiramicina.- - - - - | 27 |
| B.4.- Carbomicina.- - - - - | 28 |
| B.5.- Metimicina.- - - - - | 28 |
| C.- Biosíntesis de Eritromicina. - - - - - | 35 |
| C.1.- Producción del 6-deoxieritronólido-B . - - - - | 36 |
| C.2.- Transformación de 6-deoxieritronólido-B. - - - - | 37 |
| en Eritronólido-B. | |

| | |
|---|----|
| C.3.- Formación de los azúcares y su incorporación a la molécula de lactona. - - - - - | 41 |
| C.4.- Incorporación de la D-desosamina en 3 - (O) Micarosileritronólido-B.- - - - - | 43 |
| C.5.- Transformación de la eritromicina D en - eritromicina B y en eritromicina A. - - - - - | 43 |
| D.- Análisis de Aminoácidos. - - - - - | 47 |
| D.1.- Cromatografía de reparto.- - - - - | 47 |
| D.2.- Cromatografía de capa fina.- - - - - | 49 |
| D.3.- Cromatografía por resinas de intercambio iónico. - - - - - | 51 |
| D.4.Método de análisis desarrollado.- - - - - | 54 |
| IV .- PARTE EXPERIMENTAL. - - - - - | 56 |
| A.- Material.- - - - - | 60 |
| B.- Métodos. - - - - - | 61 |
| V .- RESULTADOS.- - - - - | 71 |
| DISCUSION. - - - - - | 81 |
| CONCLUSION.- - - - - | 86 |
| BIBLIOGRAFIA . - - - - - | 87 |

I.- INTRODUCCION

I N T R O D U C C I O N

Con la finalidad de desarrollar una mejor producción - en el campo de la industria farmacéutica y ante la creciente inquietud por la necesidad de cubrir las constantes demandas de - fármacos, que se acentúan con el crecimiento de la población, es necesario mejorar o renovar las actuales técnicas de producción de antibióticos por otras que sean más eficientes y que redi---túen la economía esperada.

Desde el inicio de la aplicación de la microbiología - industrial, se han realizado estudios en la búsqueda de diferentes medios de cultivo o nutrientes, para la producción de medicamentos biosintéticos encontrando que la harina de soya ha dado muy buenos resultados como nutriente para los microorganismos que sintetizan estos productos.

En la actualidad se ha incrementado el desarrollo de - la producción de soya con tendencia a aminorar su costo en el - mercado, situación encomiable ya que en México se sufría de una dependencia ancestral del maíz y del frijol que son productos - de un bajo valor biológico, por lo que la soya, estando en ventaja a este respecto se consume de varias formas para la alimenta

(2)

tación humana.

La harina de soya constituye una mezcla compleja de nutrientes de suministro barato y de fácil disponibilidad como fuente de carbono y nitrógeno orgánico para los microorganismos así esta proteína tiene como función, la de suministrar los aminoácidos en combinación adecuada para su aprovechamiento en las síntesis microbiana entre las que se encuentran las de antibióticos.

El desarrollo de la tecnología Bioquímica nos lleva a una situación ventajosa en los procesos fermentativos, ya que ésta se vale de recursos renovables para la conversión de, por ejemplo, carbohidratos y compuestos nitrogenados a productos de fermentación más complejos; esto marca una gran diferencia con los productos sintéticos hechos en el Laboratorio que son difíciles en su proceso, resultando obsoleto este camino para la obtención de éstos en la mayoría de los casos; además de que se utilizan para su síntesis productos derivados del petróleo que es un recurso no renovable.

Es importante no perder de vista lo anterior, ya que resulta imprescindible el desarrollo de la tecnología bioquímica en la producción de moléculas complejas como la eritromicina, insulina, y una diversidad de esteroides que marcan una expansión de esta industria a nivel nacional e internacional.

La elaboración de este trabajo obedece a la necesidad de contribuir a un mejor estudio de la determinación de la ca

(3)

lidad de la proteína en la harina de soya por su contenido de aminoácidos, que son utilizados por los microorganismos como nutrientes para la producción de antibióticos.

Siendo la harina de soya una importante fuente de nitrógeno que la Biotecnología utiliza para la obtención de antibióticos, se ha escogido uno de ellos, la Eritromicina como ejemplo en el desarrollo de este trabajo.

II.- IMPORTANCIA DE LA FUENTE DE
NITROGENO EN LA MATERIA PRIMA
DURANTE LA PRODUCCION IND
USTRIAL DE ANTIBIOTICOS.

IMPORTANCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO EN LA
MATERIA PRIMA DURANTE LA PRODUCCION INDUS-
TRIAL DE ANTIBIOTICOS.

A.-Generalidades.

Es importante comprender el aprovechamiento que en --
proporciones equilibradas de los nutrientes hace cada microorg
ganismo. Estos nutrientes los utilizará para su crecimiento
y síntesis de su material celular así como para la producción
de metabolitos en cuanto la célula cuenta con la capacidad en
zimática y el ambiente favorable para tal producción.

Un microorganismo que se utiliza en producción biosin
tética necesita en primer lugar un conjunto de nutrientes ade
cuados que le permitan crecer (sintetizar su material celular
y aumentar la población) y, una vez satisfechas estas necesi-
dades, eventualmente el microorganismo derivará algunos meta-
bolitos intermedios a la producción de su sustancias secunda-
rias.

En general, los microorganismos requieren de una va-
riedad de nutrientes para su funcionamiento normal, para esto
es necesaria la presencia de materia orgánica que proporciona
carbono y oxígeno, con este fin se incorporan a los medios de
cultivo azúcares como glucosa, lactosa, sacarosa, almidones,
dextrinas, ácidos como el acético, ácido propiónico, ácido bu-
tírico; cetoácidos e hidroácidos. Son indispensables los --

(5)

compuestos nitrogenados y así los microorganismos son capaces de utilizar una variedad de aminoácidos, purinas, pirimidinas, una fuente proteica para proveer los aminoácidos.

Además para el crecimiento microbiano, es preciso que el medio de cultivo, contenga iones inorgánicos para mantener el equilibrio de membrana, presión osmótica y acción enzimática, se pueden citar: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cl^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} y hasta Zn^{2+} y CO_3^{2-} . (1)

El nitrógeno, juega diversas funciones en el metabolismo microbiano:

a) El nitrógeno generalmente deriva de ciertos metabolitos incorporándose posteriormente en productos sintetizados por el microorganismo como es el caso de ciertos antibióticos

b) En algunos procesos metabólicos es necesaria la presencia de altas concentraciones de amonio, para la aminación reductiva, en ejemplo de esto, es la reacción de la glutamatp deshidrogenasa con la cual se obtiene el glutamato a partir de cetoglutarato.

c) El amoniaco o sus productos metabólicos muestran también represión en la síntesis de algunas enzimas de la vía catabólica del nitrógeno como en *Aspergillus nidulans* y ciertas levaduras. (2)

Es por esto que es importante estudiar niveles y efectos de las fuentes de Nitrógeno en el metabolismo Microbiano.

B.- Harina de Soya como Fuente de Nitrógeno.

La soya -(Glicine soja)- es una leguminosa producida principalmente en Oriente de donde procede una variedad de alimentos tradicionales a base de ella. Está formada por una proteína del grupo de las globulinas y en ella la glicina es el aminoácido que se encuentra en mayor cantidad; contiene también albúmina, glutelina y prolamina. Dentro de las proteínas se encuentran también, aunque en pequeñas cantidades las enzimas características de la soya, la ureasa que se ve aumentada en la soya germinada y la uricasa que actúa sobre el ácido úrico con formación de alantoina . (3)

La porción grasa está constituida por 60% de ácidos grasos monoinsaturados y diinsaturados; 40% de acil gliceroles triinsaturados; entre los ácidos grasos, encontramos ac. lignocérico, ac. araquidónico, ac. esteárico, ac. palmítico, ac. oléico, ac. linoléico y ac. linolénico; esteroides como fitosteroides también se ha visto la presencia de fosfoinosítidos y otros lípidos en menor cantidad . (4)

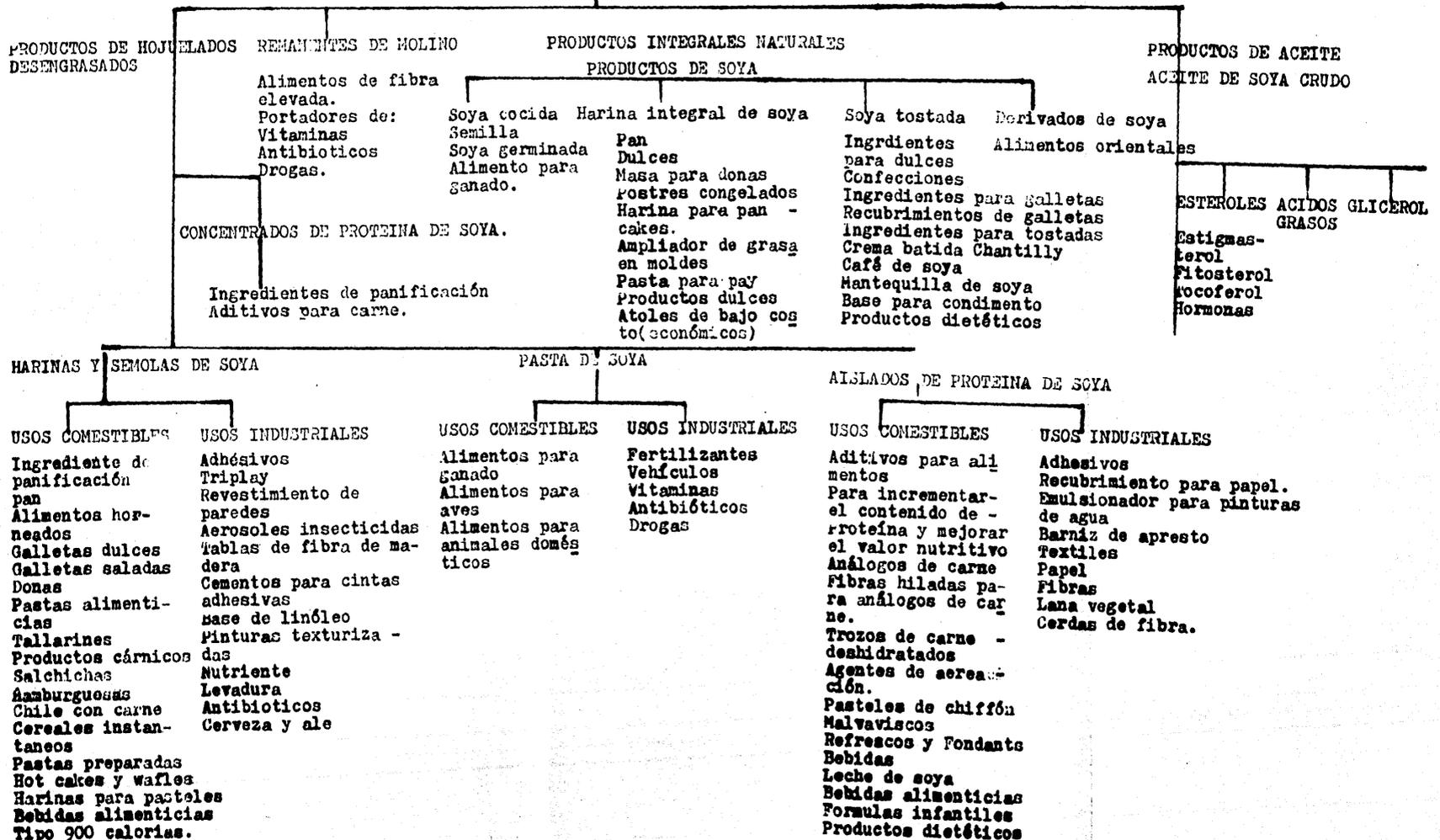
La incorporación de la soya a las industrias de producción biosintética, ha venido a dar un mayor realce al desarrollo de éstas y un panorama óptimo a sus aspectos económico; tal incorporación se traduce en un empuje a una gran diversidad de industrias ver tabla 1, (27) es interesante mencionar el aspecto anterior, ya que las ventajas logradas en el proce-

so deben ser bilaterales, es decir, para el productor y el consumidor, que merece la oportunidad de adquirir productos de buena calidad y a bajos precios; así pues, con la introducción de la soya a tales industrias se logra abatir el precio del producto que se fabrica con derivados de ésta, debido a que no hay otra proteína similar disponible en cantidades industriales y a bajo costo.

Así la soya con su buena calidad protéica ha logrado sustituir en los alimentos la proteína animal sin que se pueda manifestar algún descenso significativo en el valor nutricional del alimento. En la industria de alimentos la soya tiene funciones como las que se indican a continuación en productos procesados, ⁽⁵⁾ cuando se usa como aditivo e ingrediente; es importante mencionar que el alimento procesado debe ser beneficiado en un buen rango de funcionalidad, esto se refiere a funciones tales como absorción de agua, de grasa; el batido, espesado y retención de humedad, oscurecimiento, espumante, emulsificante, incremento o decremento del volumen, mejoramiento de apariencia, también puede usarse en panadería como base en la formulación y en productos de cereales. Es importante en la complementación de ciertas harinas, así como en la formulación de alimentos para bebé y para la producción de concentrados de proteínas y de proteínas purificadas.

TABLA 1
LA APLICACION DE LOS PRODUCTOS DE SOYA A DIVERSAS INDUSTRIAS

SOYA:



C.- Proceso para la obtención de Harina de Soya.

Inicialmente se efectúa la recepción del grano, y enseguida viene su almacenamiento, para lo cual se secan a un 10% de humedad residual y se llevan después al proceso. El proceso consiste en triturar los granos con un molino de rodillos con lo que se obtienen de 4 a 6 trozos por cada grano, que con moliendas posteriores dan partículas cada vez más pequeñas, las cáscaras se logran separar por medio de una corriente de aire y el grano se ablanda por medio de una corriente de vapor, se presionan y se obtienen después las hojuelas llenas de grasa en las cuales se efectuará el proceso de extracción de aceite.

El aceite es extraído presionando las hojuelas; ver fig. 1 (6) son lavadas posteriormente con hexano y el aceite se calienta para evaporar el hexano que después se condensa para volverse a usar, antes del refinamiento la lecitina puede ser separada, secada, refinada, blanqueada y refluidizada por la adición de pequeñas cantidades de ácidos grasos. El aceite se refina con alcalí, se blanquea, se desodoriza y, si se desea, puede hidrogenarse.

Para producir hojuelas tostadas se usa un mayor calentamiento con lo cual se destruyen las enzimas y factores anti nutricionales presentes en las hojuelas, comunmente se utilizan para la alimentación animal y reciben el nombre de "soya-

meal"; por el contrario, si en el proceso las hojuelas no se calientan directamente y se usan bajas presiones y temperaturas, la solubilidad de la proteína se conserva, obteniéndose hojuelas blancas altamente solubles y que pueden ser procesadas a concentradas y aisladas de proteínas de este último se obtendrá proteína texturizada.

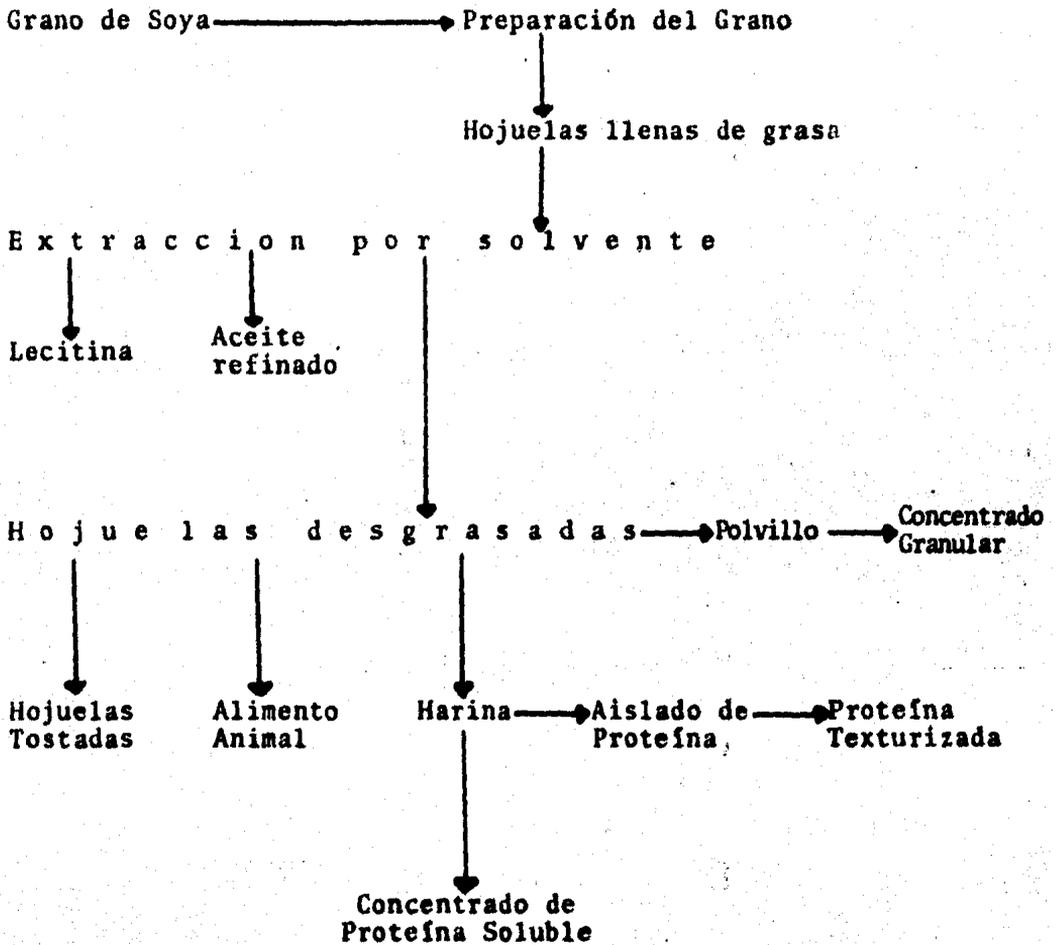
El tratamiento calórico recibido es inversamente proporcional al índice de dispersión de la proteína, para ésta valoración se trabaja el método de la determinación del índice de solubilidad del nitrógeno -NSI- Que es el porcentaje del Nitrógeno total el cual es soluble en agua bajo condiciones controladas de extracción dado por el AOAC, ⁽⁷⁾ la tabla 2 ⁽⁸⁾ nos da una relación de la variación del calor y el índice de dispersión de una proteína.

Las hojuelas son la base para la obtención de diferentes tamaños de partículas según el caso. Como puede verse en la fig 2 ⁽⁶⁾ se obtiene una diversidad de productos mediante procesos específicos de hidrólisis y extracción para cada uno de ellos; esta figura esquematiza los productos que se pueden obtener a partir de hojuelas desgrasadas.

En la tabla 3 ⁽⁹⁾ se clasifican diferentes tamaños de partículas según el producto deseado.

FIG. 1

DEL GRANO DE SOYA A SUS PRODUCTOS ⁽⁶⁾



(12)

T A B L A. 2.

VARIACION DEL INDICE DE DISPERSION DE PROTEINAS
CON RESPECTO DEL TRATAMIENTO CALORIFICO RECIBIDO (8)

| TIPO DE CALENTAMIENTO | °C | INDICE DE DISPERSION DE LA PROTEINA |
|------------------------|--------|-------------------------------------|
| | | % De Proteina Soluble en agua. |
| BAJO CALENTAMIENTO | 84 °C | 90 - 95 |
| LIGERO CALENTAMIENTO | 95 °C | 70 - 80 |
| CALENTAMIENTO MODERADO | 100 °C | 35 - 45 |
| TOSTADO | 120 °C | 8 - 20 |

T A B L A. 3.

TAMAÑO DE PARTICULAS PARA PRODUCTOS DE SOYA (9)

| PRODUCTOS | TAMAÑO DE PARTICULAS TAMICES - No. de MALLAS* |
|---------------|--|
| HOJUELAS | 50 |
| POLVO GRUESO | 20/40 |
| POLVO MEDIANO | 40/80 |
| POLVO FINO | menos de 100 |
| HARINA FINA | " 200 |

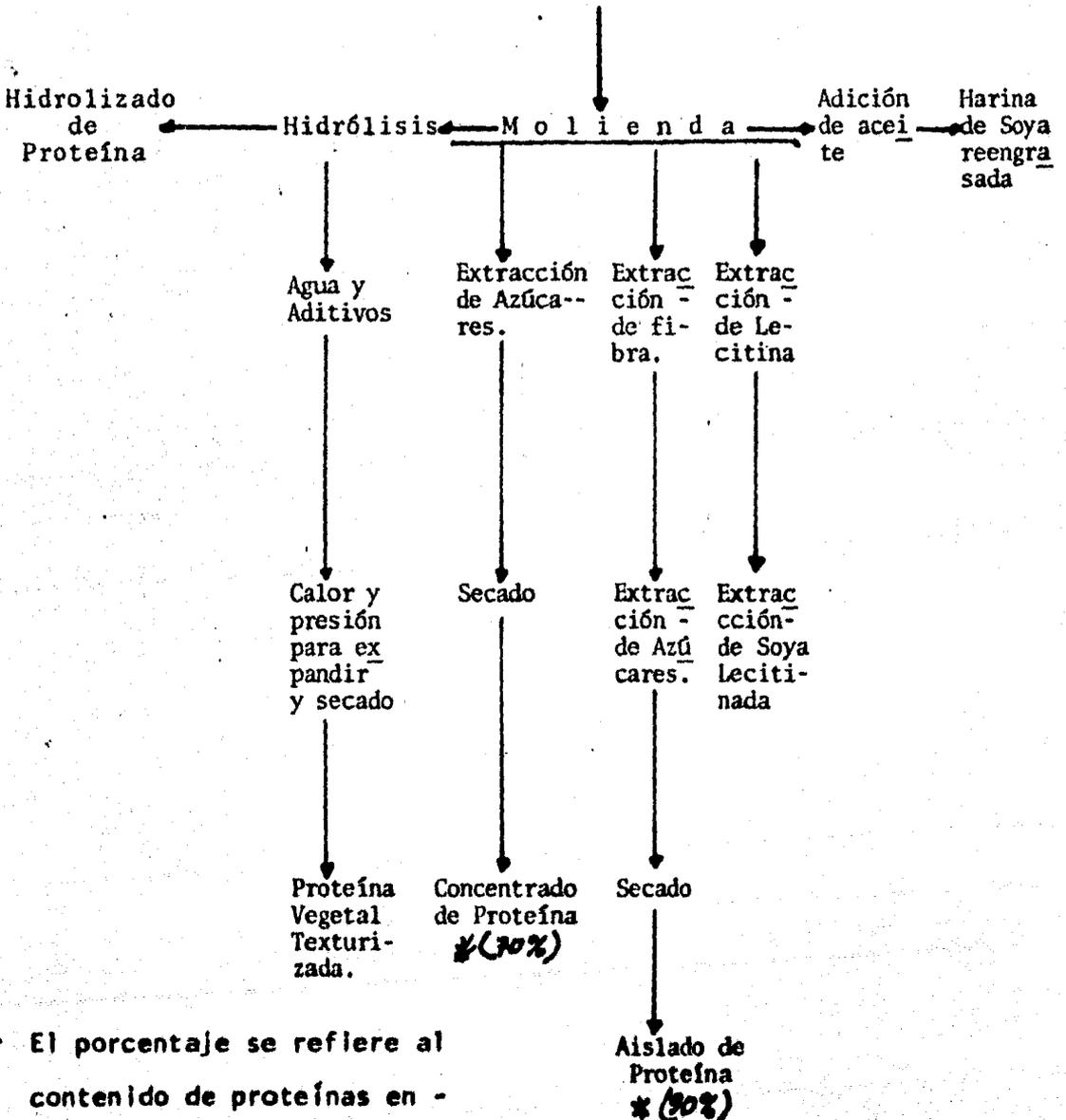
Clasificación de los tamices por números asignados a sus orificios de la red con medidas dadas en mm ó pulg según la American Society for Testing and Materials.

(13)

FIG. 2

PROCESO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DE SOYA (6)

HOJUELAS DESGRASADAS



* El porcentaje se refiere al contenido de proteínas en ese producto.

**III.-ANTECEDENTES DE LA PRODUCCION
DE ANTIBIOTICOS.**

ANTECEDENTES DE LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS

A.- Generalidades.

La fermentación, proceso en el cual las cadenas de reacciones químicas del sistema metabólico de los microorganismos convierten la materia orgánica en productos biosintéticos con la ayuda de enzimas, despertó un gran interés desde sus inicios, con datos desde 6000 años A.C.⁽¹⁰⁾ en Medio Oriente y Europa, primeramente con productos tales como alimentos y bebidas, posteriormente explosivos, solventes y en la actualidad con una diversidad de productos comerciales que cubren una amplia área de necesidades humanas; en la tabla 4⁽¹¹⁾ se pueden apreciar algunos productos industriales que se obtienen por fermentación.

La industria fermentativa ha cobrado cada día mayor importancia, situación meritoria debido a su aportación de moléculas muy complejas y que a la fecha únicamente por esta vía ha sido posible obtenerlas, hemos de reconocer también que se han obtenido productos de biosíntesis que resultan ser intermediarios básicos para posteriores modificaciones químicas para el logro del producto final deseado.

Además, los procesos biosintéticos han hecho posible bajar el costo de muchos productos comerciales mediante la re

ducción de etapas de síntesis químicas. Igualmente, las condiciones en que se realizan estas reacciones biológicas no son extremas, situación con la que se ha logrado abatir sus costos de producción a diferencia de lo que sucede en procesos de síntesis químicas.

La industria farmacéutica tiene augurada una etapa de exitoso desarrollo gracias a los avances sobre la investigación de genética microbiana que ha permitido al hombre manipular las condiciones de crecimiento microbiano modificando así en su favor sus rutas de producción o hacer cambios genéticos en el mismo conducentes a elevar los rendimientos o al logro de síntesis más rápidas que llevan a crear un óptimo panorama lleno de posibilidades para la microbiología industrial.

Entre los productos farmacéuticos de biosíntesis microbiana más importantes están los metabolitos secundarios, y de estos los más conocidos son los antibióticos; se han descubierto más de 5000 de ellos, aunque no todos son aplicables terapéuticamente a seres vivos; alrededor de su 25% son producidos por actinomicetos y el 75% de éstos pertenecen al género *Streptomices*. La importancia de este género se puede apreciar en la Fig.3 que muestra sus productos, antibióticos de gran utilidad farmacéutica.

A.1.- Aspectos Económicos.

Los antibióticos representan la clase más importante de fármacos comercial y clínicamente obtenidas de microorganismos. La información más reciente indica que los mayores volúmenes de antibióticos producidos han sido para cuatro -- grupos importantes, las penicilinas, las cefalosporinas, las tetraciclinas y los macrólidos, estando entre estos últimos la eritromicina como la más importante. (13)

La decisión de la elaboración de un producto está basado en consideraciones de tipo económico con mayor interés-- principalmente hacia el material de conversión o sustrato al producto deseado, el tiempo de tal conversión, equipo utilizado, eficiencia del proceso, el costo que implica recobrar el producto final del medio de fermentación por algún método fisicoquímico, el valor potencial del subproducto y el costo de eliminación o reutilización de desperdicios. (14)

La microbiología con su diversidad de productos de fermentación logrados es la responsable de una gran expansión industrial que se traduce en un capital considerable en la economía mundial y que se mejora con los avances en los conocimientos de las rutas metabólicas del microorganismo que -- permiten la influencia del hombre en ellas y en favor de un incremento de la producción.

T A B L A 4
 PRINCIPALES PRODUCTOS BIOSINTETICOS (11)

| ORGANISMO | CLASE | PRODUCTO |
|------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | Alimentos y Bebidas | |
| Saccharomices Cerevisias | Levadura | Levadura para pan, vino, cerveza |
| Saccharomices Carlsbergensis | Levadura | Cerveza lager |
| Saccharomices Rouxii | Levadura | Salsa de soya |
| Candida Milleri | Levadura | Pan francés acido |
| Lactobacilus Sanfrancisco | Bacteria | Pan francés acido |
| Streptococcus Thermófilus | Bacteria | Yogur |
| Lactobacilus Bulgaricus | Bacteria | Yogur |
| Propionibacterium Shermanii | Bacteria | Queso Suizo |
| Glucobacter Suboxidans | Bacteria | Vinagre |
| Penicillium Roquefortii | Hongo | Queso con vetas azules |
| Penicillium Camembertii | Hongo | Queso camembert y brie |
| Aspergillus Orizae | Hongo | Sake (hidrólisis del almidón) |
| Rhizopus | Hongo | Tempeh |
| Mucor | Hongo | Sufu (requesón de soya) |
| Monascus Purpurea | Hongo | Ang-kak (arroz rojo) |

(11)

| ORGANISMO | CLASE | PRODUCTO |
|--|----------|---|
| Productos Químicos Industriales | | |
| <i>Saccharomices Cerevisiae</i> | Levadura | Etanol (a partir de la glucosa) |
| <i>Kluyveromices Fragilis</i> | Levadura | Etanol (a partir de lactosa) |
| <i>Clostridium Acetobutflicum</i> | Bacteria | Acetona y butanol |
| <i>Aspergillus Niger</i> | Hongo | Polisacáridos |
| Aminoácidos y Nucléótidos como saborizantes. | | |
| <i>Corynebacterium Glutamicum</i> | Bacteria | L-Lisina |
| <i>Corynebacterium Glutamicun</i> | Bacteria | Acido 5-inosínico y 5-guanílico |
| Proteína Unicelular | | |
| <i>Candida Utilis</i> | Levadura | Proteína microbiana desde residuos de la pulpa del papel. |
| <i>Saccharomices Lipolftica</i> | Levadura | Proteína microbiana desde alcanos del petróleo. |
| <i>Metilóphilus Metillotrophus</i> | Bacteria | Proteína microbiana desde el crecimiento en metanol |
| V i t a m i n a s | | |
| <i>Eremothecium Ashbyi</i> | Levadura | Riboflavina |
| <i>Pseudomonas Denitrificans</i> | Bacteria | Vitamina B ₂ |
| <i>Propionibacterium</i> | Bacteria | Vitamina B ₁₂ |

(11)

ORGANISMO**CLASE****PRODUCTO****E n z i m a s**

| | | |
|-----------------------------|-----------|-----------------------|
| Aspergillus Orizae | Hongo | Amilasa |
| Aspergillus Niger | Hongo | Glucamilasa |
| Trichoderma Reesii | Hongo | Celulasa |
| Saccharomices Cerevisiae | Levadura | Invertasa |
| Kluyveromices Fragilis | Levadura | Lactasa |
| Saccharomicopsis Lipolftica | Levadura | Lipasa |
| Aspergillus | Hongo | Pectinasa y proteasas |
| Bacillus | Bacterias | Proteasas |
| Endothia Parasftica | Hongo | Cuajo Microbiano |

P o l i s a c á r i d o s

| | | |
|---------------------------|----------|------------------|
| Leuconostoc Mesenteroides | Bacteria | Dextrano |
| Xantomonas Campestris | Bacteria | Pasta de xantano |

Productos Farmacéuticos

| | | |
|---------------------------|-------|---------------|
| Penicillium Crisogenum | Hongo | Penicilinas |
| Cephalosporium Acremonium | Hongo | Cefalosporina |

(61)

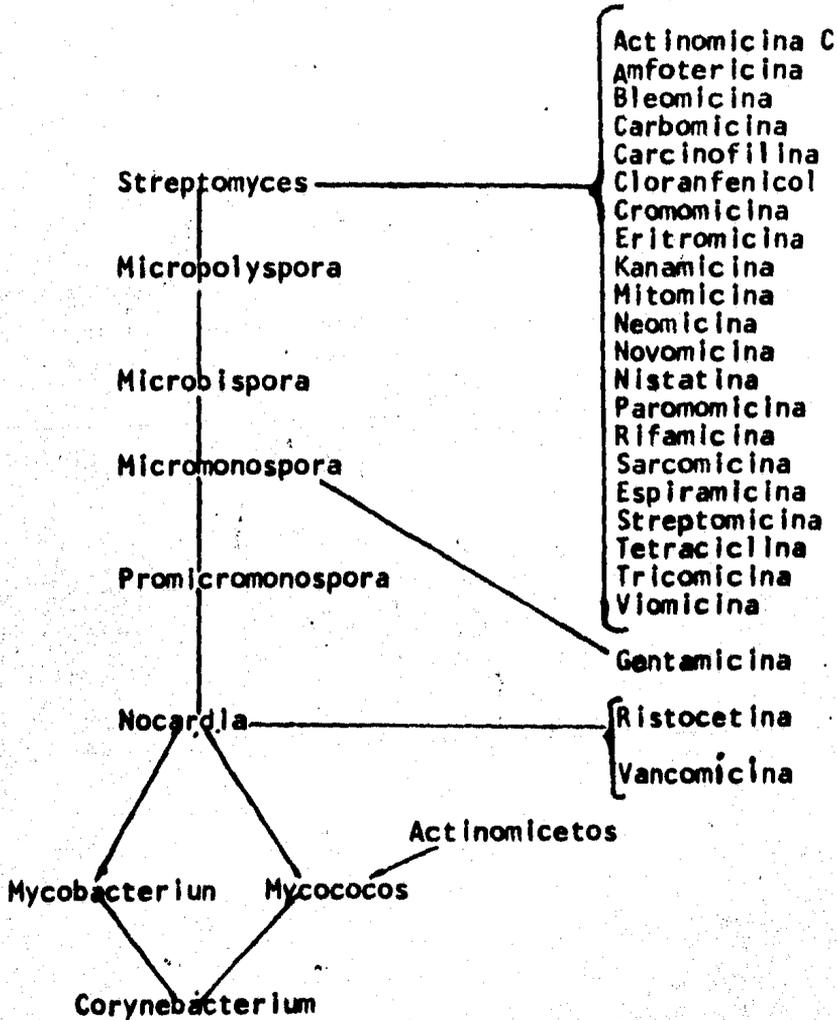
| ORGANISMO | CLASE | PRODUCTO |
|--|----------|---|
| Productos Farmacéuticos | | |
| Streptomices | Bacteria | Anfotericina-B, Kanamicinas Neomicina, Streptomicina, - Tetraciclina. |
| Bacillus Brevis | Bacteria | Gramicidina-S |
| Bacillus Subtilis | Bacteria | Bacitracina. |
| Bacillus Polimixa | Bacteria | Polimixina. |
| Rizopus Nigricans | Hongo | Transformación de esteroides. |
| Hibridomas | | Inmunoglobulinas y anticuer- pos monoclonales |
| Líneas Celulares de Mamíferos | | Interferon |
| Escherichia Coli (mediante técnicas del DNA recombinante) | Bacteria | Insulina, Hormona humana de crecimiento, somatostatina. |
| C a r o t e n o i d e s | | |
| Blakslea Trispora | Hongo | Beta Caroteno |

(98)

Fig.3

LA IMPORTANCIA DE ACTINOMICETALES Y SU GENERO STREPTOMYCES COMO PRODUCTORES DE ANTIBIOTICOS

(12)



A.2.- Aspectos Técnicos.

Un proceso de fermentación con Streptomices eritreus nos lleva a obtener la eritromicina base, basicidad debida - al grupo amino de la desosamina en la molécula de la eritromicina; el proceso requiere la cepa adecuada, así como también el sustrato indispensable para la fermentación que deberá contener fuentes de nitrógeno, carbono, sales minerales y factores de crecimiento. Es indispensable controlar otras variables como son el pH, la agitación, la temperatura, el oxígeno, la viscosidad y tiempo óptimo de producción del antibiótico. (26)

Es necesario obtener un buen balance del oxígeno requerido para lograr que la absorción de oxígeno iguale al menos la demanda volumétrica máxima de éste, requerida por el cultivo. No podemos pasar por alto ninguna de estas variables para el desarrollo del microorganismo. En la fig. 4 (15) se puede apreciar un diagrama para una planta piloto de fermentación continua para la producción de antibióticos.

El fermentador está acondicionado con salida para toma de muestras, lo cual nos permite conocer la concentración del metabolito presente en el caldo de fermentación así como otros parámetros indispensables para seguir la marcha del proceso con los datos obtenidos mediante los análisis adecuados.

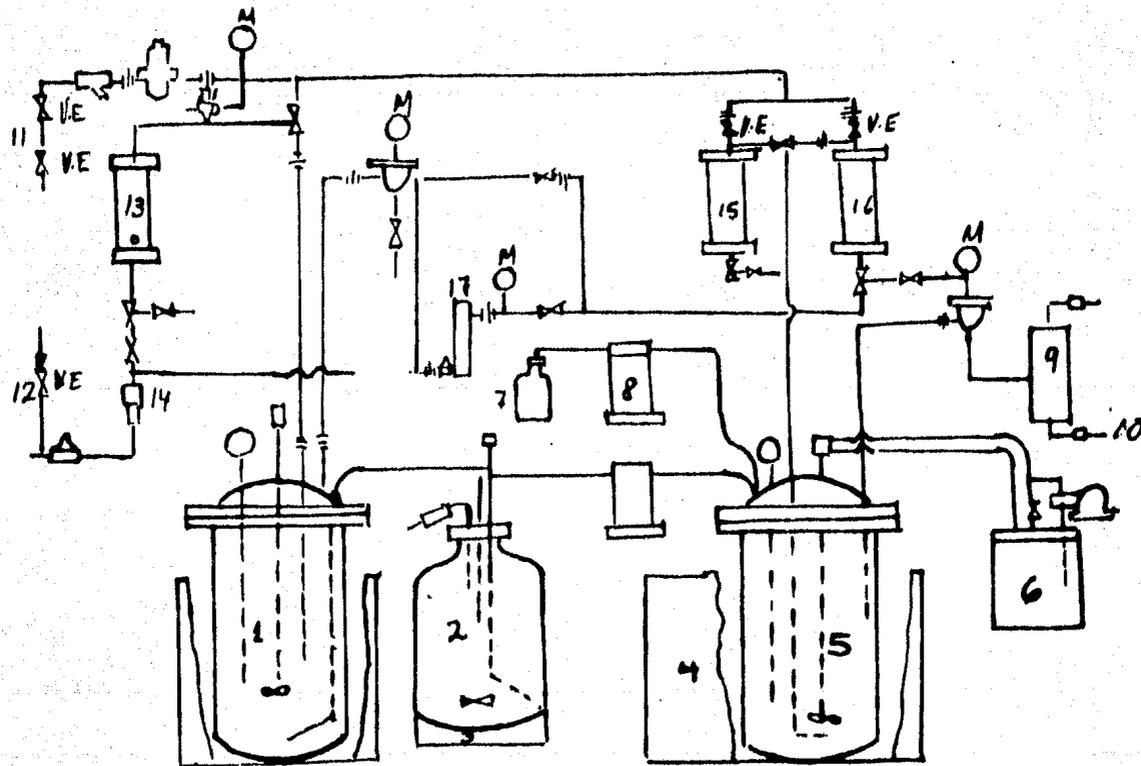
El fermentador está diseñado también para permitir la entrada de aditivos; además un eje de agitación mecánica para lograr la mejor distribución del microorganismo en el caldo de fermentación y así utilizar optimamente los nutrientes contenidos en él.

Una vez que según el curso de la fermentación, el microorganismo ya no produce cantidades costeables de antibióticos, se suspende el proceso y se inicia la extracción del producto.

De la eritromicina base obtenida de fermentación se puede pasar a su sal, el lactato de eritromicina y también a la forma comercial de lauril sulfato de sodio.

Fig.4.

DIAGRAMA ESQUEMATICO DE UNA PLANTA PILOTO DE FERMENTACION PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS. (15)



EN LA SIGUIENTE PAGINA SE PUEDE VER UNA LISTA DE CADA UNA DE LAS PARTES DE ESTA INSTALACION REFERIDAS A SUS CLAVES.

(5)

LOCALIZACION DE PARTES DE LA INSTALACION DE LA FIG.4.

- 1.- Esterilizador.
- 2.- Tanque de Alimentación.
- 3.- Agitador Magnético.
- 4.- Baño de Temperatura Constante.
- 5.- Fermentador.
- 7.- Antiespumante.
- 8.- Bombas.
- 9.- Separador de Producto.
- 10.- Salida de Producto.
- 11.- Suministro de vapor.
- 12.- Suministro de Aire.
- 13.- 15 y 16 Filtro de Carbón.
- 14.- Filtro.
- 17.- Medidor de Flujo.
- V. E.- Válvula de entrada.
- M.- Manómetro.
- T.V.- Trampa de Vapor.

B.- Los antibióticos macrólidos: Eritromicina, Oleandomicina, Espiramicina, Carbomicina y Metimicina.

Los macrólidos son drogas antibióticas producidas por el metabolismo de Actinomicetos, uno de sus géneros, el Streptomyces eritreus produce la eritromicina, ver Fig. ⁽¹⁶⁾, Antibiótico de mayor importancia dentro de este grupo, la olenadomicina es otro macrólido producido por Streptomyces antibioticus y la espiramicina por Streptomyces ambofaciens. ⁽¹⁶⁾

B.1.- Eritromicina.

La eritromicina es un antibiótico sintetizado por --- Streptomyces eritreus, macrólido formado por una lactona macrocíclica y dos deoxiazucaras, ⁽¹⁷⁾ polvo poco soluble de color blanco amarillento y de sabor amargo, por lo que son utilizados de preferencia sus derivados, así tenemos:

B.1.a- Sales Ácidas.-El lactobionato de eritromicina, son -- cristales o polvo blanco o amarillento soluble fácilmente en agua y en alcohol. El estearato de eritromicina, polvo blanco, insoluble en agua por lo que se administran por vía oral, ver fig.5.

B.1.b.- Esteres de la desosamina.-Como ejemplo de esto tenemos el estolato de eritromicina. Cuando se une el propionil lauril sulfato al hidroxilo de la desosamina. Ver Fig. 5 ⁽¹⁶⁾ se -- produce un polvo blanco inodoro insoluble en agua y soluble en alcohol. Otro ester es el etil succinato de eritromicina con-

las mismas propiedades que el anterior, el primero se administra por vía oral y el segundo por vía oral y parenteral

B.1.c.- Mecanismo de acción.-La eritromicina posee una actividad mas bien bacteriostática, aunque a grandes concentraciones es tambien bactericida. Su mecanismo de acción es básicamente por inhibición de la síntesis protéica específicamente sobre la peptidil transferasa y sobre la terminación de cadena polipeptídica.

B.2.- Oleandomicina.- Este antibiótico tiene tambien como núcleo una lactona saturada,⁽¹⁶⁾ Ver. Fig. 6, formada por 13 átomos de carbono (oleanólido) tiene además un grupo epóxido en posición 8 y al igual que la eritromicina la desosamina se encuentra a nivel de carbón 5, pero en lugar de la cladínosa tiene una oleandrosa en carbón 3, tambien se utilizan sus ésteres - así se tiene la troleandomicina o triacetilolandomicina de sabor insípido que es un polvo blanco soluble en agua.

La oleandomicina posee un espectro antimicrobiano parecido a la eritromicina, aunque no tan amplio como ésta ni tan potente.

B.3.- Espiramicina.-⁽¹⁶⁾ Este antibiótico presenta un anillo lactónico o espiranólido con 16 átomos de carbono ⁽¹⁶⁾ tiene además una desosamina unida en el carbon 10, además un aminoazucar, lami

caminos en carbon 5 y a éste azúcar se une una micarosa; es un polvo amorfo blanco o amarillento poco soluble en agua y muy soluble en alcohol. Se administran por vía oral, ver Fig 7

La espiramicina posee un espectro antimicrobiano un poco mas extenso que la oleandomicina, sin embargo su actividad es reducida considerablemente in vitro con respecto a las anteriores.

(16)
 B.4.- Carbomicina, - Es un antibiótico macrólido que tiene aplicación terapéutica, está constituido por un anillo de lactona, que tiene 15 carbonos en el que se unen dos azúcares, una micaminosa y a continuación de ésta micarosa unida con un isovalerato, ver Fig. 8.

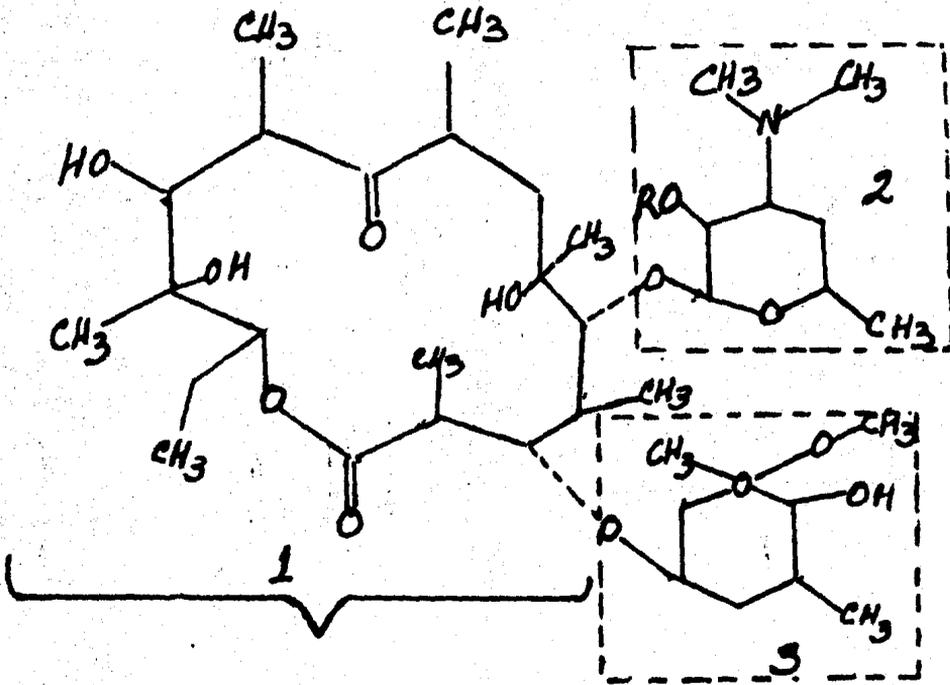
B.5.- Metimicina, - Este antibiótico presenta un anillo formado por 5 unidades de propionato y de acetato, contiene 1 azúcar la desosamina en carbon 3 ver Fig. 9

La Metimicina posee un espectro antimicrobiano semejante a la oleandomicina. Estos antibióticos macrólidos son las mas útiles terapéuticamente hablando.

Es importante mencionar que los macrólidos poseen una buena acción antimicrobiana sobre los estafilococos aun cuando estos sean resistentes a ciertos antibióticos como las penicilinas y tetraciclinas.

Fig.5.

(16)
LA ERITROMICINA Y SUS DERIVADOS.



R = H ERITROMICINA A

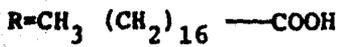
1. - ERITRONOXIDO

2. - DESOSAMINA

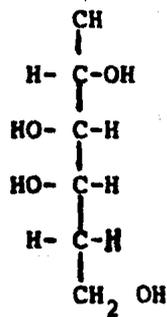
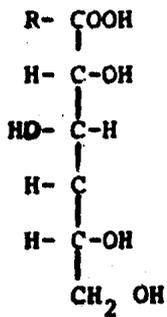
3. - CLADINOSA

(30)

SALES ACIDAS

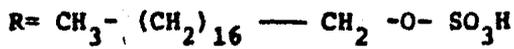


ESTEARATO (PANTOMICINA)

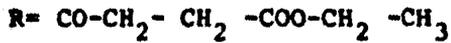


LACTOBIONATO

ESTERES



ESTOLATO (ILOSONE)



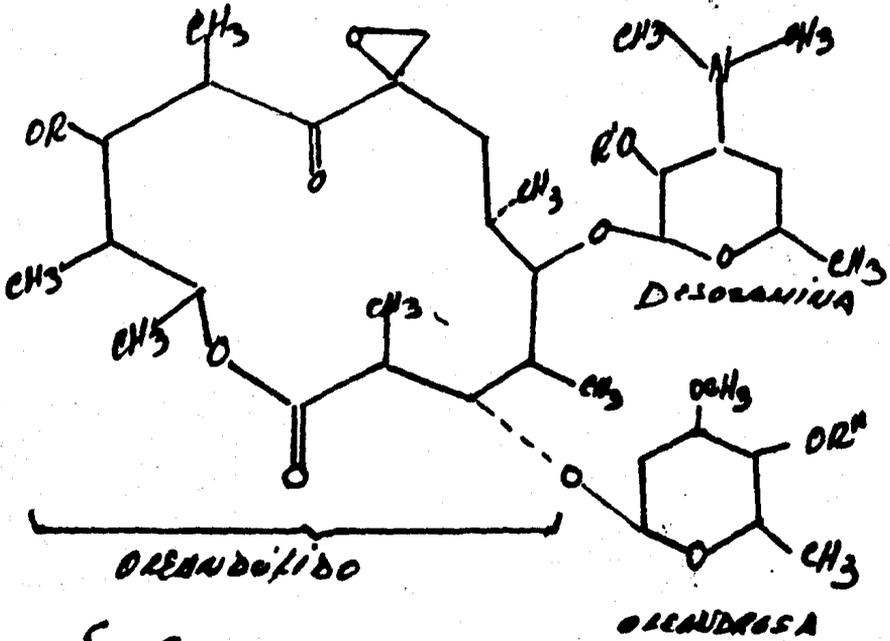
(ETILSUCCI NATO (PANTOMICINA))

(31)

Fig. 6

OLEANDOMICINA⁽¹⁶⁾

$R = -H$
 $R' = -H$
 $R'' = -H$



ESTERES {
 $R = -CO-CH_3$
 $R' = CO-CH_3$
 $R'' = -CO-CH_3$

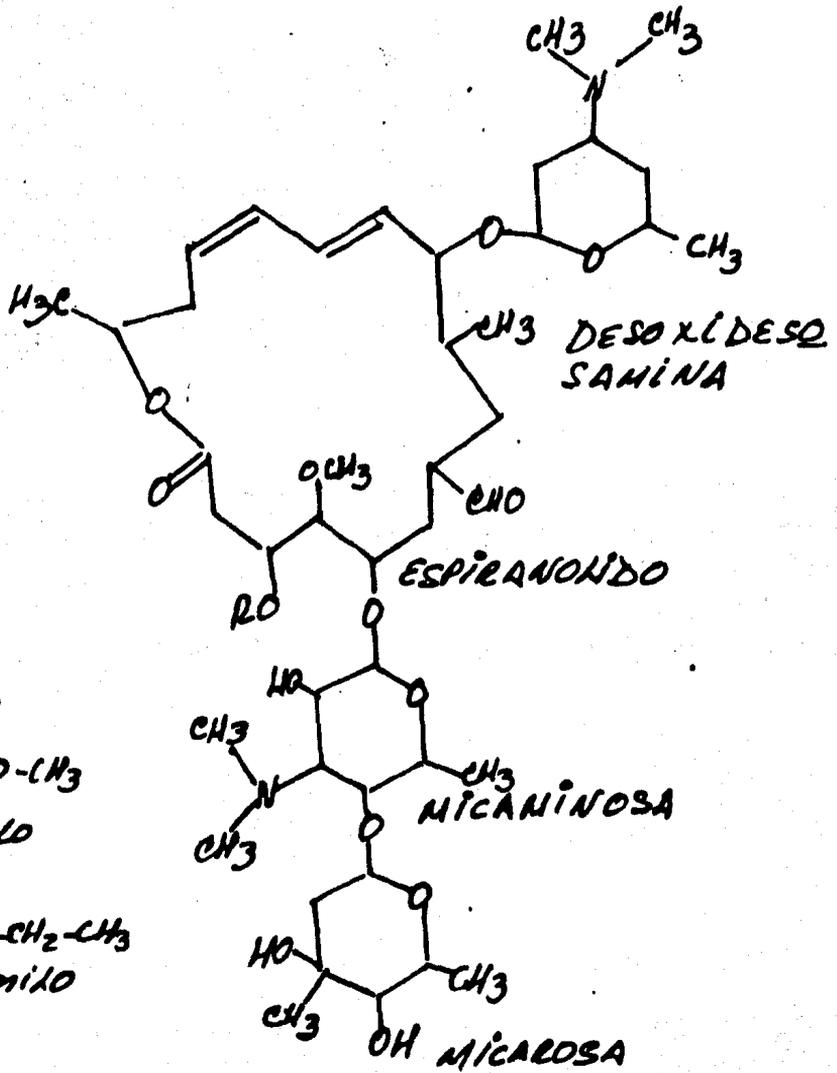
TROLEANDOMICINA

TRIAETILOLEANDOMICINA

(32)

Fig. 7.

(16)
ESPIRAMICINA A.



ESPIRAMICINA-A.

R = -H

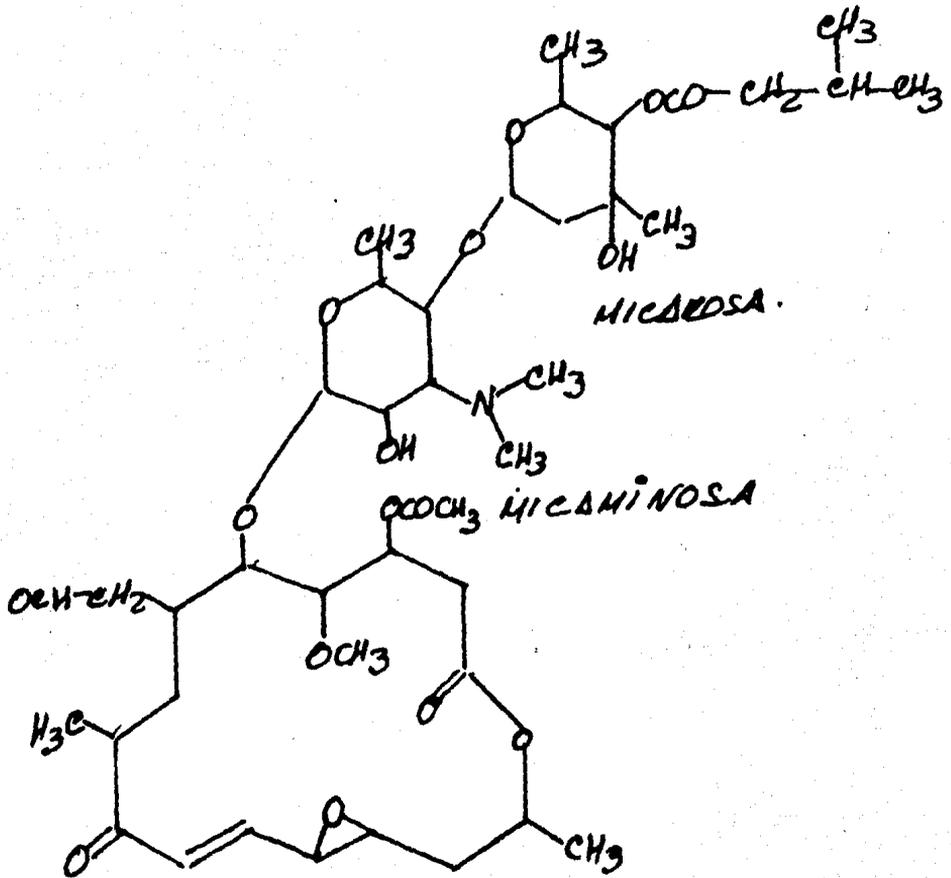
R = -CO-CH₃
Acetilo

R = -CO-CH₂-CH₃
Propionilo

(33)

Fig. 8.

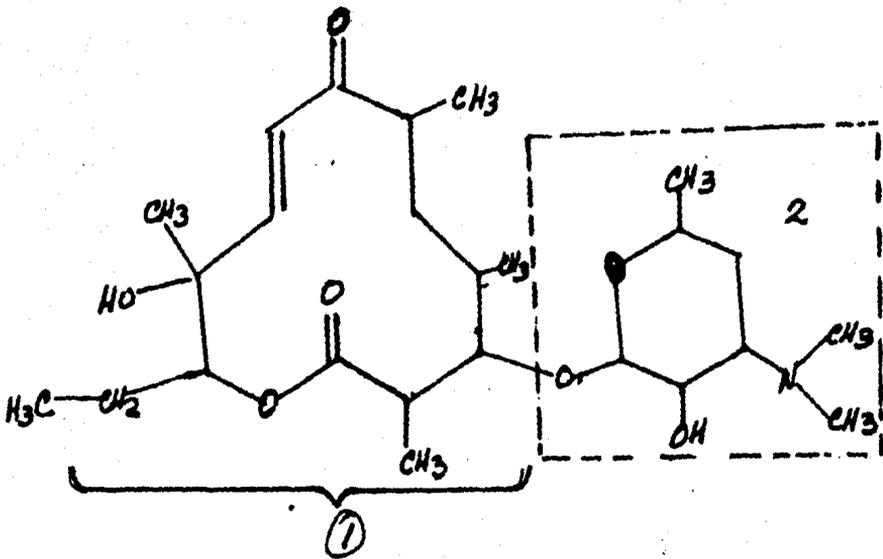
CARBOMICINA (12)



(20)

Fig- 9

METIMICINA¹²



1. - METIMIDO

2. - DESOSAMINA

C.- Biosíntesis de Eritromicina.

El mecanismo de biosíntesis para la producción de la eritromicina ha sido objeto de intenso trabajo, la elucidación de su modelo estructural está basado en estudios sistemáticos de enzimología y bioquímica, los cuales han permitido conocermas en detalle la expresión celular en su desarrollo y función.

Los resultados obtenidos comprobados mediante evidencias experimentales ⁽¹⁷⁾ llevan a considerar que la estructura de la eritromicina se forma mediante dos rutas metabólicas secundarias; tales vías se han estudiado en finos detalles del proceso para su mayor entendimiento, mediante el aislamiento de cada etapa enzimática tratando de determinar las relaciones entre sustrato y aparato enzimático así como su dependencia de ciertos factores como pH, inhibidores y nutrientes del medio que deciden una ruta o vía metabólica; no obstante y a pesar del interés por conocer completamente tal biosíntesis, aún quedan ciertos detalles en vías de aclararse.

La primera vía metabólica implica la producción de una aglicóna que requiere 21 unidades de carbono que son provistas por una molécula de ácido propiónico y seis de 2-metil malonil como primer pilar en la formación de dicho macrólido, ver fig. 10. tales moléculas pueden ser proporcionadas por los intermediarios del metabolismo de oxidación de la glucosa y por el metabolismo de los aminoácidos; el propionato puede venir de am

noácidos como valina, isoleucina, treonina y metionina; en realidad la iniciación de esta biosíntesis ocurre con las formas activadas de sus precursores, propionil CoA y 2-metil malonil CoA. Los dos acil precursores pueden ser formados por interconversión entre sí por la acción de propionil CoA-carboxilasa sobre el propionato y el 2-metilmalonil CoA piruvato transcarboxilasa sobre 2-metilmalonato.

Además de estos precursores también se encuentran la acetil CoA, aceto acetil CoA, malonil CoA que son pilares esenciales para la formación de importantes compuestos como son los terpenos, esteroides, carotenoides, polifenoles y antibióticos macrocíclicos, en la Fig. 11, se esquematiza la participación de estos precursores.

C.1.- Producción de 6-Deoxieritronólido-B.

Se ha dicho que el eritronólido es elaborado por 21 unidades de carbono, ⁽¹⁷⁾ trabajo por el cual es responsable la eritronólido sintetasa del complejo multienzimático celular, que trabaja sólo en cuanto se obtengan las condiciones favorables para producir el 6-deoxieritronólido-B.

La estructura de la molécula de lactona y distribución de sus átomos de carbono y oxígeno, sugiere que su precursor es un oligocétido que conduce a la obtención del ----

6-deoxieritronólido-B, Fig.12, y así se comprueba mediante evidencias acumuladas que la biogénesis de la lactona macrocíclica se efectúa por mecanismos análogos a otros que conducen a la obtención de productos naturales y derivados también de oligocétidos. El proceso y el aparato enzimático para la formación de la lactona puede compararse con la formación del ácido palmítico producido por Streptomyces eritreus que requiere para su biosíntesis 1 grupo acetilo y 7 grupos malonilo.

C.2.-Transformación de 6-Deoxieritronólido-B en EritronólidoB

Se sabe que existe un sistema eritronólido hidroxilasa⁽¹⁷⁾ que parece estar correlacionado con un citromo p450 y con cierta dependencia con la NADPH que convierte el 6-deoxieritronólido-B en eritronólido-B; Ver. fig. (13)

La actividad de dicha hidroxilasa tiene su máximo entre 12 y 20 horas y es en este período donde se encuentra la síntesis del eritronólido-B.

Se ha comprobado la actividad de la hidroxilasa mediante la cuantificación de cantidades radiactivas de producto hidroxilado cuando se pone la enzima y sustrato en las condiciones adecuadas para su actividad.

(38)

Fig. 30

INICIACION BIOSINTETICA DEL ERITRONOLIDO (17)

INTERCONVERSION

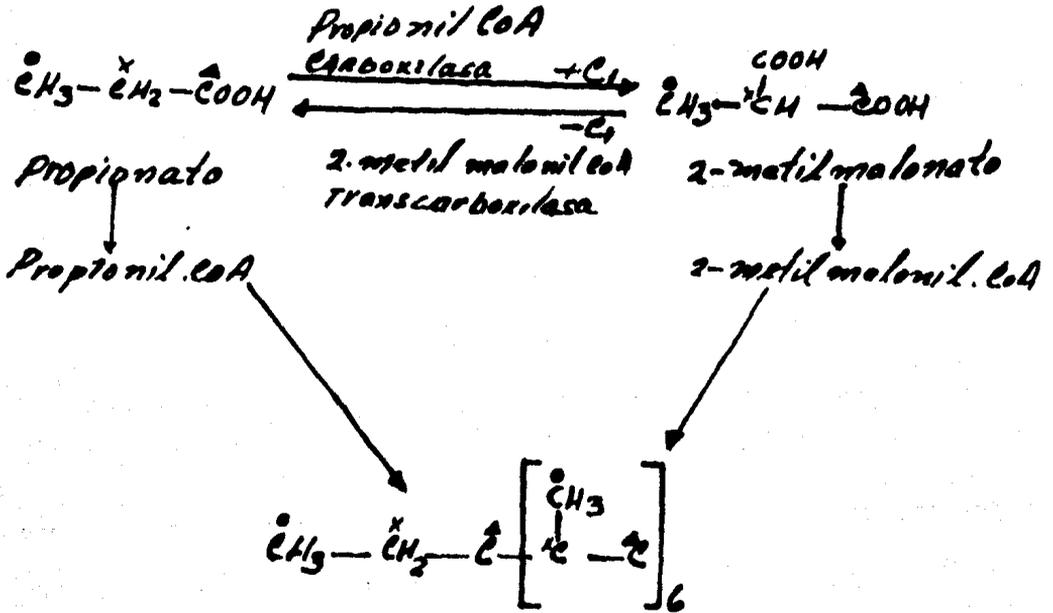
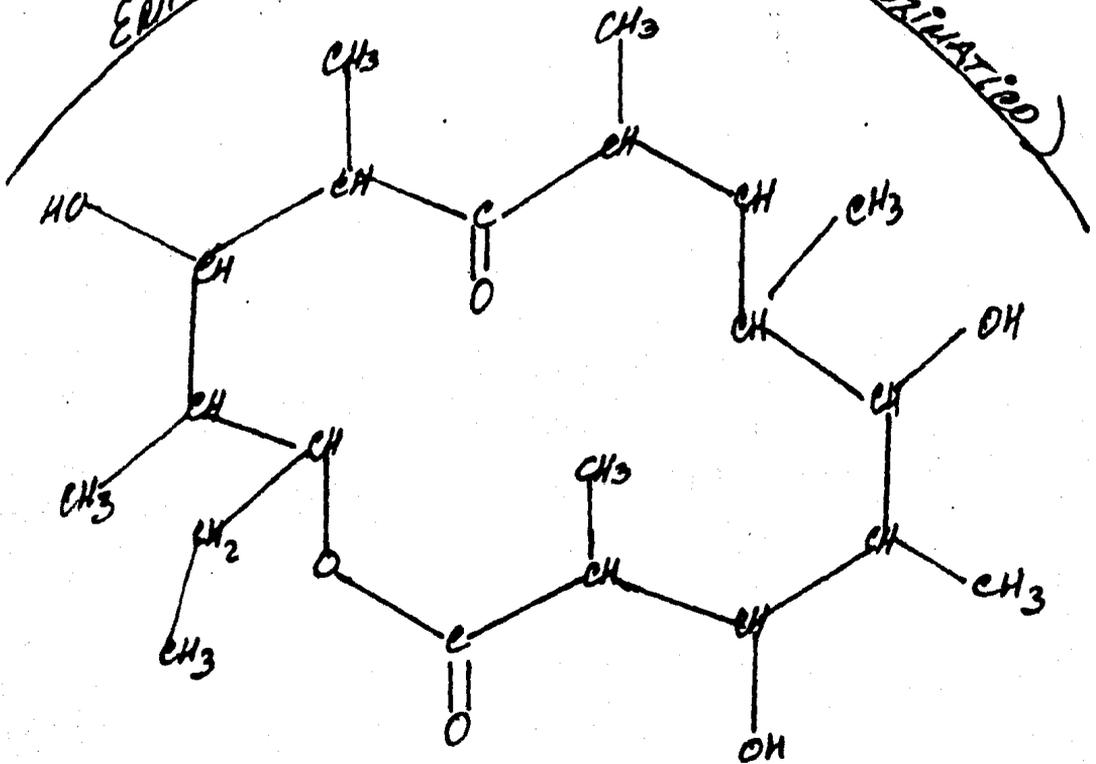


Fig. 12

(17)

FORMACION DE LA LACTONA.

ERITRONOALDO SINTETASA (SISTEMA ENZIMATICO)

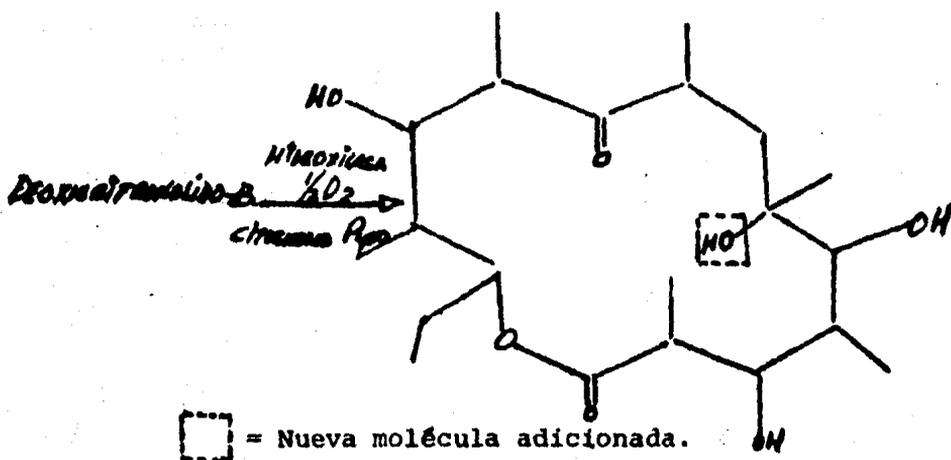


6-DEOXYERITRONOLIDO-B

(41)

Fig. 13

FORMACION DEL ERITRONOLIDO-B⁽¹⁷⁾



C.3.- Formación de los azúcares y su incorporación de la Molécula de la Lactona.

La revelación de estudios sistemáticos sobre la formación de azúcares que constituyen la eritromicina indican que ellos se derivan de la D-glucosa una fuente de nitrógeno y grupos S-metilos activados, sin embargo existen conclusiones que difieren acerca del origen de los grupos metilos; ⁽¹⁸⁾ el mecanismo de incorporación de estas moléculas al azúcar neutro L-micarosa y al azúcar D-desosamina no es del todo claro. Se han postulado mecanismos por analogía con algunos sistemas de formación de deoxiazucres, aunque es posible que existan rutas metabólicas alternativas.

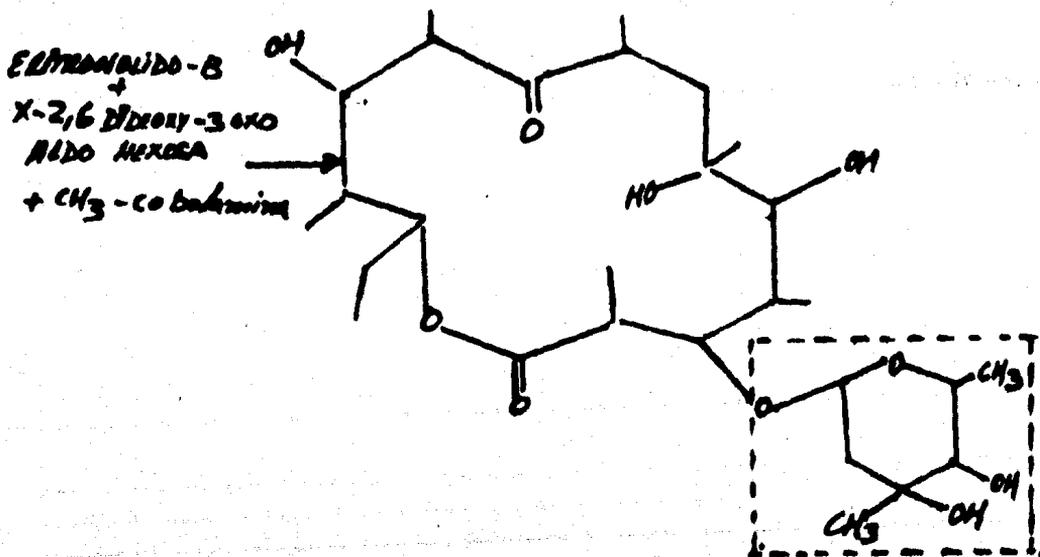
Se ha comprobado la presencia del 3 (O)micarosileritronólido-B ó 3(L)micarosiloxi-(L), 6(D)11(L) trihidroxieritronólido-9-ona, como un intermediario en la biosíntesis de la eritromicina, ver fig.14, tal producto podría ser formado por una glicosilación directa en la que el aceptor es el eritronólido-B y el donador es una L-micarosa en forma activada, aunque también podría pensarse en un precursor de la L-micarosa que intervenga en dicha reacción y que nos lleve a pensar que tal biosíntesis no es tan sencilla, y así se ha planteado que la glicosilación del eritronólido podría ser como sigue:

X-2,6 dideoxi-3oxoalohexosa + eritronólido-B y posteriormente la metilación en C-3.

Fig.14

(17)

BIOSÍNTESIS DE 3(O) MICAROSILERITRONOLIDO-B



C.4.-Incorporación de la D-desosamina en 3(0)Micarosileritronólido-B.

La D-desosamina es un aminoazúcar que viene de algún nucleósido fosfoderivado de glucosa, los grupos N-metil de los grupos metil de la metamina y los átomos de nitrógeno parecen venir de una fuente no conocida de nitrógeno.

En realidad existe poco conocimiento de la reacción enzimática por medio de la cual la desosamina se transfiere al 3(0)micarosileritronólido-B para la producción de la eritromicina D fig. 15 aunque existe la certeza de que realmente el 3(0)micarosileritronólido-B es el sustrato aceptor de la desosamina: la reacción se efectúa en orden de adición primero de la micarosa al eritronólido-B y posteriormente la D-desosamina lo cual es sostenido por trabajos en los que por medio de tratamientos ácidos de la eritromicina B se obtiene la 5(0)-⁽¹⁷⁾(D)Desosaminileritronólido-B y este compuesto se probó como precursor para la producción de eritromicina B más sin embargo la reacción no procede.

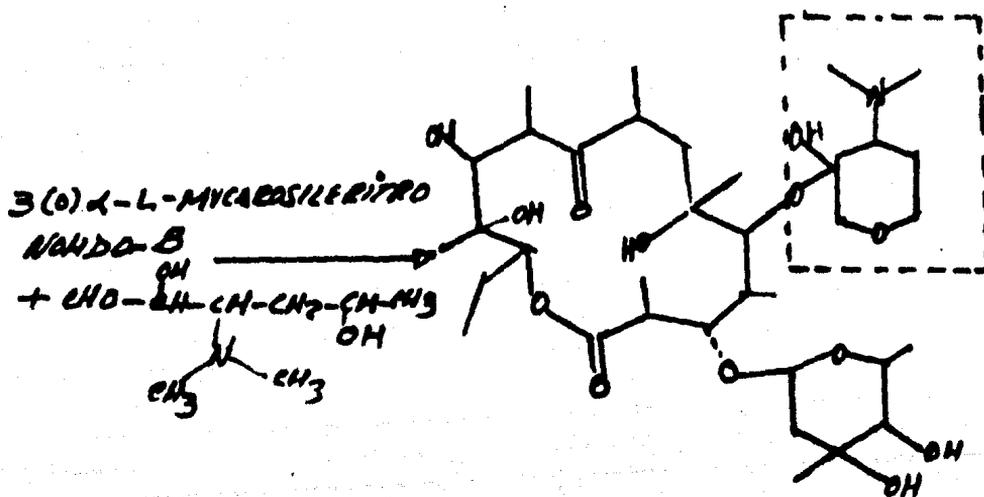
C.5.Transformación de la Eritromicina D en Eritromicina B y en Eritromicina A.

Los trabajos efectuados sobre la eritromicina D sugieren que dicha eritromicina es el sustrato adecuado para la hidroxilación en el anillo del eritronólido en posición de carbón 12, probablemente en este carbón ocurra la misma reacción

que en carbón 6 y que la misma enzima sea involucrada aunque hasta ahora solo se obtuvo evidencia para la hidroxilación en carbón 6.

La eritromicina A, fig 16 y fig 17, se obtiene gracias a la metilación de la eritromicina C lo cual ocurre teniendo presente la S-adenosil-L-metionina--SAM--y la actividad de C-(O)metiltransferasa, con una irreversibilidad de reacción, se cree que la misma (O)metiltransferasa es la que actúa para la metilación de la micarosa de la eritromicina D para obtener la eritromicina B, ver fig.16 sin embargo tal (O)metiltransferasa es inhibida por los productos de eritromicina A y eritromicina B así como por S-adenosil-homocisteína empero la elaboración de la eritromicina se efectúa por algún mecanismo del Streptomyces que le permite tal producción.

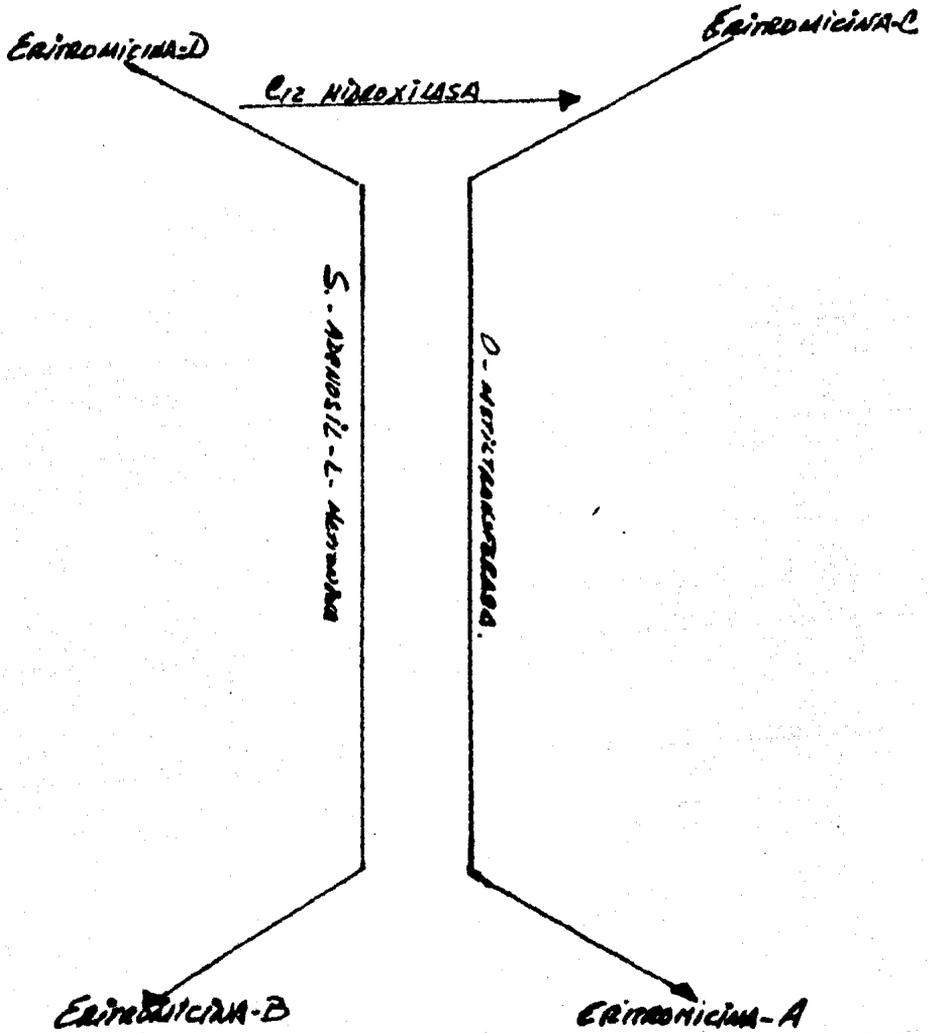
Fig 15 (17)
BIOSINTESIS DE ERITROMICINA D



(45)

Fig. 16

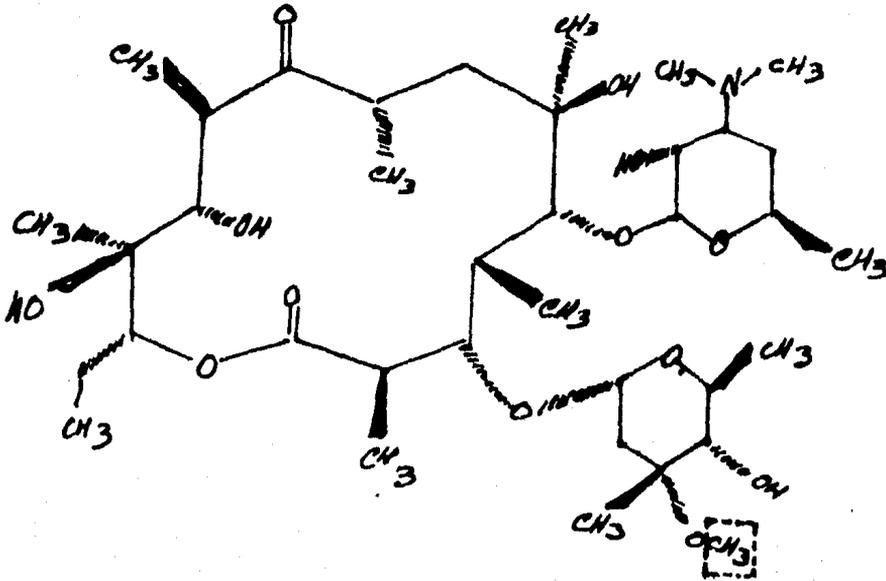
ETAPA FINAL DE LA BIOSINTESIS
DE LAS ERITROMICINAS. (17)



(46)

Fig 17

ERITROMICINA A



Todo este planteamiento sobre la biosíntesis de la eritromicina basado en evidencia experimentales tienen obviamente detalles imprecisos, así se cree que la sintetasa de la lactona se asemeja a la sintetasa de los ácidos grasos pero es necesario verificar estos datos, así también se hacen postulados para la síntesis de los azúcares micarosa y desosamina con analogía en las biosíntesis de deoxiazúcares. Aun así es importante reconocer que contamos con una riqueza de información y estudios avanzados que permitirán cada vez a la industria de antibióticos manipular algunas etapas de la biosíntesis en favor de la economía industrial.

D.- Análisis de Aminoácidos.

Con el propósito de plantear la información necesaria para analizar las muestras problemas se reseñan los métodos analíticos consultados.

Muchos avances se han logrado en la química analítica gracias a los estudios de los comportamientos y de las propiedades físicas y químicas de las mezclas problemas; cada vez que se tiene una mezcla más compleja o de propiedades físicas y químicas tan parecidas, se plantea más difícil su separación, por lo que es necesaria la utilización de métodos que sean más adecuados y que nos den la mayor información sobre el problema.

Para el análisis de mezclas de aminoácidos se han trabajado una serie de métodos analíticos con conocimiento fundamentales de la solubilidad relativa y del comportamiento ácido básico de los aminoácidos. de ello hace uso la cromatografía.

La cromatografía de aminoácidos tuvo sus inicios en 1914 con Martín y Singe⁽¹⁹⁾ pero no fue sino hasta 1958 que se tomaron más en cuenta y se empezó a hacer uso de las técnicas cromatográficas.

D.1.- Cromatografía de Reparto.

Los métodos de reparto se basa en diferencias de solu

bilidades de un soluto en dos fases inmiscibles en equilibrio a una temperatura determinada. (19) Esta separación de componentes se consigue por medio de un gran número de etapas de reparto separadas, de dimensiones microscópicas, es decir el principio de la cromatografía depende de que durante el paso por un proceso cromatográfico se multipliquen muchas veces -- las diferencias pequeñas del coeficiente de reparto de cada uno de los componentes de la mezcla. Para esta separación es necesario contar con una fase estacionaria que, si es líquida debe estar sostenida en material sólido e inerte, si la fase-móvil es un líquido, el método será cromatografía líquido-líquido, si se trata de un gas será cromatografía gas-líquido - (CGL).

En general la utilización de la cromatografía gas-líquido nos brinda ventajas como:

- 1.- La resolución que se obtiene para mezclas complejas es muy aceptable.
- 2.- Los resultados se obtienen con rapidez.
- 3.- La precisión obtenida en los resultados es bastante buena.

Sin embargo se presentan también algunas desventajas como son:

- 1.- El costo del equipo que representa una inversión fuerte, pero que resulta o puede ser amortizable a largo plazo.

2.- El manejo del cromatógrafo debe hacerlo una persona debidamente capacitada; como ejemplo del trabajo realizado con esta técnica tenemos:

Anne M. Lewis⁽²⁰⁾ trabajó sobre análisis de aminoácidos por CGL utilizando un cromatógrafo de gases con columnas empacadas con carbowax 4000, trabajo en el cual las muestras a analizar están precedidas por una precipitación de proteínas, filtración y después una purificación por resinas de intercambio iónico; posteriormente se llevan a un equipo para formar los derivados de los aminoácidos y obtener así los n-propil, n-acetil esterés, que después pasaran al cromatógrafo de gases; otros autores han trabajado sobre procedimientos similares⁽²⁰⁾, la resolución se lleva a cabo con una temperatura de 230°C y con una corriente de helio como fase móvil.

Limitantes.- Por este método los aminoácidos básicos, arginina e histidina se pierden debido a que estos no pueden ser acetilados bajo las condiciones en que se trabaja la mezcla, tampoco se pueden obtener datos sobre cisteína y triptofano ya que son lábiles a varios factores utilizados en el procedimiento para la formación de derivados.

D.2.-Cromatografía en Capa fina.

La cromatografía en capa fina es un método analítico del que se vale también la química analítica para obtener datos necesarios de los componentes de una mezcla compleja, su-

principio está basado en que las fibras de celulosa o de sílica gel sirven para soportar la fase estacionaria; la separación de los componentes de la mezcla se efectúa debido a la distribución de estos entre la humedad de las fibras y el disolvente que fluye sobre ellas.

Existen trabajos sobre separación de derivados de aminoácidos ⁽²¹⁾ usando el reactivo de cloruro de dansilo ó cloruro de 5 sulfonil-1 dimetilaminonaftalen para producir así los 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfonilaminoácidos; para la obtención de tales derivados se practica una extracción de los aminoácidos de fluidos biológicos, se purifica por resinas de intercambio iónico y posteriormente se forman los derivados antes mencionados; los autores de este informe hacen cromatografía bidimensional en capa fina probando siete sistemas de eluyentes en dos dimensiones hasta obtener los resultados deseados para el buen desarrollo de las muestras en las placas; la identificación de cada compuesto se hizo mediante el uso de estándares y así los derivados fluorescentes se cuantificaron con el uso del fluorómetro.

Limitantes.- La limitante de este método es en definitiva la obtención como rutina de los dansil derivados para trabajar, aunque algunas empresas pueden permitirse practicar este método,

D.3.-Cromatografía con Resinas de Intercambio Iónico.

Las resinas de intercambio iónico con su aplicación en la cromatografía constituyen una técnica versátil de separación en la química analítica, representan para ésta un medio de gran valor para la resolución de mezclas iónicas complejas, recuperación de metales, eliminación de impurezas e interferencias de electrolitos. Es así, una técnica que vino a aliviar la resolución de mezclas de aminoácidos en diferentes fluidos biológicos.

Las resinas de intercambio iónico son polímeros de estireno ⁽²²⁾ que exhiben sitios activos para un potente intercambio de iones, presentan ellas un número de grupos funcionales por unidad de volumen de resina que determina su capacidad de intercambio, lo que se efectúa básicamente por atracción electrostática. Estos polímeros son altamente resistentes al ataque de ácidos y álcalis fuertes, agentes oxidantes y reductores son completamente insolubles en la mayoría de disolventes comunes. En la actualidad se encuentran comercialmente disponibles en una serie tamaño de partículas que fluctúan entre 1μ y 2 mm, lo que permiten una buena selectividad de estas de acuerdo al desarrollo a nivel laboratorio o a escala industrial que se requiera.

La cromatografía por resinas de intercambio iónico es un método muy útil basado en las propiedades ácido-básicas

de los aminoácidos a separar, con tal propósito se hace - uso de las resinas mencionadas; para la separación de los aminoácidos en análisis es necesario una diferencia de carga en ellos y deben tomarse en cuenta ciertos factores como son el pH del eluyente, velocidad del flujo del mismo, tamaño de partículas de resina, su peso equivalente y cantidad de puen-
tes existentes en el polímero. En estas propiedades de las resinas está basada el trabajo del analizador automático de aminoácidos de Moore y Stein ⁽²³⁾, que consta de:

1.- Una parte del aparato en el que se encuentran columnas cargadas con resinas para la separación por intercambio iónico de los aminoácidos.

2.- Equipo para la detección de aminoácidos separados, por la formación de complejos coloridos debido a la adición de ninhidrina que permite determinar su intensidad de color proporcional a la cantidad de aminoácidos presentes.

3.- Registro automático de los componentes mediante gráficas o aminograma.

El autoanalizador de aminoácidos es eficiente para la resolución del problema en cuestión por su precisión y práctico manejo debido a que está totalmente integrado; sin embargo no es muy común de utilizar por su alto costo.

Existen otros analizadores de aminoácidos sin embargo

se puede considerar que representan modificaciones del método de trabajo de Moore y Stein; tales trabajos han arrojado datos muy precisos y confiables. A continuación hablaremos sobre algunos de ellos.

(24)
 J. Michel trabajó en la formación de dansil aminoácidos y separación de éstos por cromatografía de líquidos de alta presión por fase reversa; se utilizó un equipo con columnas de bondapak C-18, usando un gradiente lineal de los eluyentes seleccionados según el grado de polaridad requerido, se tomaron en cuenta otros factores como efecto de pH del buffer que se utiliza para eluir las columnas y gradiente de velocidad del flujo de los mismos. Los dansil aminoácidos presentan cierta fluorescencia que registran absorbancia en 250 nm, con luz UV, tales que permiten determinar las concentraciones de ellas en la mezcla.

Limitantes.-La limitante en este método es como se dijo antes, la obtención de los dansil derivados usados como estandar.

Se ha trabajado también con equipo de cromatografía de líquidos de alta presión con adaptación de una línea para la adición de fluoresceína ⁽²⁵⁾, a la salida de los componentes ya separados y que reaccionan con el compuesto antes dicho y registran cierta fluorescencia proporcional a la concentración de los aminoácidos presentes que pueden ser cuantificados con un fluorómetro.

Limitantes.- Sin embargo el trabajo por éste método implica cierta desventaja como es la adaptación al equipo de cromatografía de aditamentos a la línea de salida de los componentes de la mezcla; con esta modificación resultaría ya un equipo muy sofisticado y de alto costo.

D.4.- Método de Análisis Desarrollado.

Para el análisis de las muestras problema en nuestro trabajo se han empleado una serie de procedimientos que consisten, primero en una hidrólisis ácida de las harinas de muestra después una separación de aminoácidos mediante el uso de resinas de intercambio catiónico y posteriormente una cuantificación de los aminoácidos por la formación de bases de Schiff con el grupo aldehído del p-dimetil amino benzaldehído -PDAB y grupo amino de los aminoácidos.

Los aminoácidos, con el método propuesto reaccionan con el PDAB y dan una sola estructura cromófora que permiten cuantificarlos a una sola λ_{max} de 414 nm lo que resulta una ventaja en cuanto a la manipulación. Para la formación del derivado, ver Fig. 18; la metodología no es sofisticada y se obtienen resultados satisfactorios.

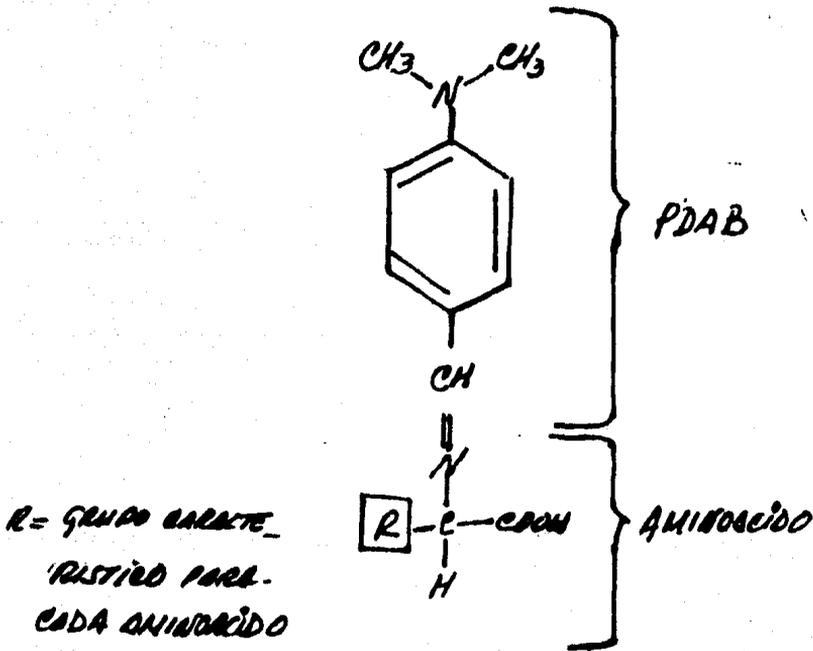
Fig. 18

DERIVADO DEL AMINOACIDO

(55)

Fig 18.

ESTRUCTURA DEL DERIVADO DE
AMINOACIDOS.



IV.- PARTE EXPERIMENTAL.

PARTE EXPERIMENTAL.

Se propone un método para encontrar las variaciones de la cantidad de aminoácidos, agrupados por gradiente de pK , existentes entre diferentes harinas de soya; con estos datos y con los obtenidos de la producción de eritromicina, se busca una relación que permita manejar adecuadamente las adiciones de nutrientes durante el proceso fermentativo de obtención del antibiótico.

El desarrollo de la parte experimental comprende tres etapas sucesivas; primeramente se efectúa el tratamiento de las muestras de harina mediante una hidrólisis ácida separando por filtración los aminoácidos solubles.

En la segunda etapa se efectúa la elución de los aminoácidos en tres grupos correspondientes a los ácidos, los neutros y los básicos, mediante el uso de columnas de cromatografía de resinas de intercambio iónico; se considera que la resina actúa de tal manera que entra en contacto con los iones a intercambiar en una serie de etapas en equilibrio consecutivas, operación en que los iones intercambiables $R-CH - COOH$ encuentran miles de sitios activos por cm. de columna; ^{+ NH₃} la atracción electrostática es menor para los ácidos, mayor para los neutros y aún más para

los básicos; debido a ésto es posible eluir separadamente de la columna a los grupos antes mencionados.

Como medio de control para identificar los componentes de los grupos eluidos se hizo cromatografía en capa delgada.

En la última etapa se forman los derivados con el PDAB, tales derivados son compuestos coloridos que absorben luz en la zona del espectro visible y se leen a una λ_{max} de 414 nm, para cuantificarse; ver en la fig.19 el registro del derivado obtenido.

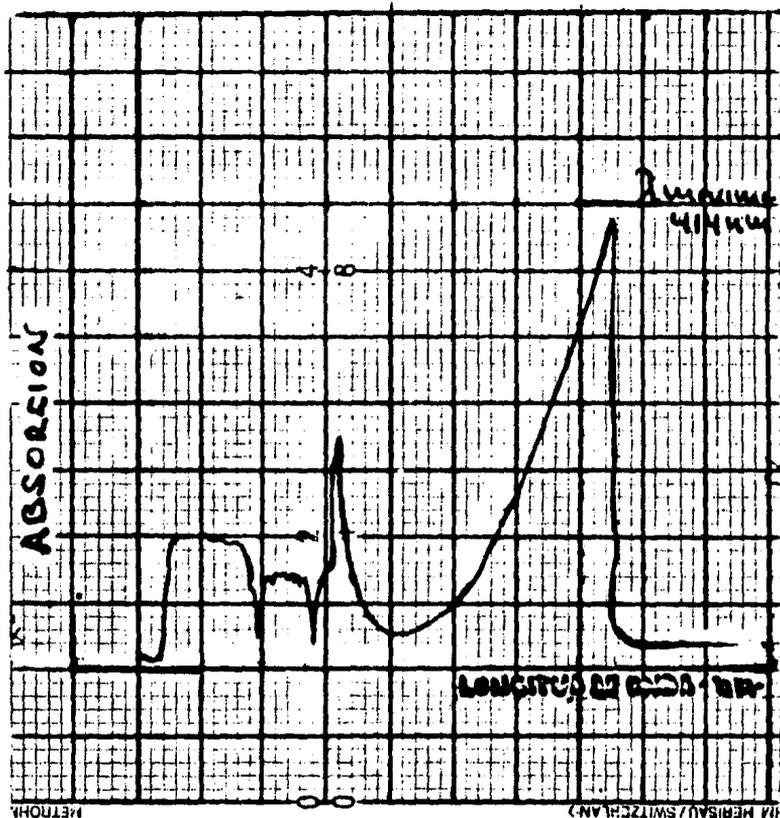
La curva estandar que se usa para obtener las concentraciones de los derivados de aminoácidos problemas se obtiene tratando la tirosina con el PDAB, en la fig.20 se esquematiza el proceso.

La tirosina se utilizó para formar la curva Standard debido a que es uno de los aminoácidos mas solubles en agua y que ademas estaba disponible en el lugar del trabajo.

(58)

Fig. 19

REGISTRO DEL DERIVADO DE AMINOACIDO TIROSINA



Curva Spectral del derivado de tirosina —Longitud de onda contra Absorción— en el registro se pueden ver los picos de absorción.

Rango del espectro probado de 270- 600 nm

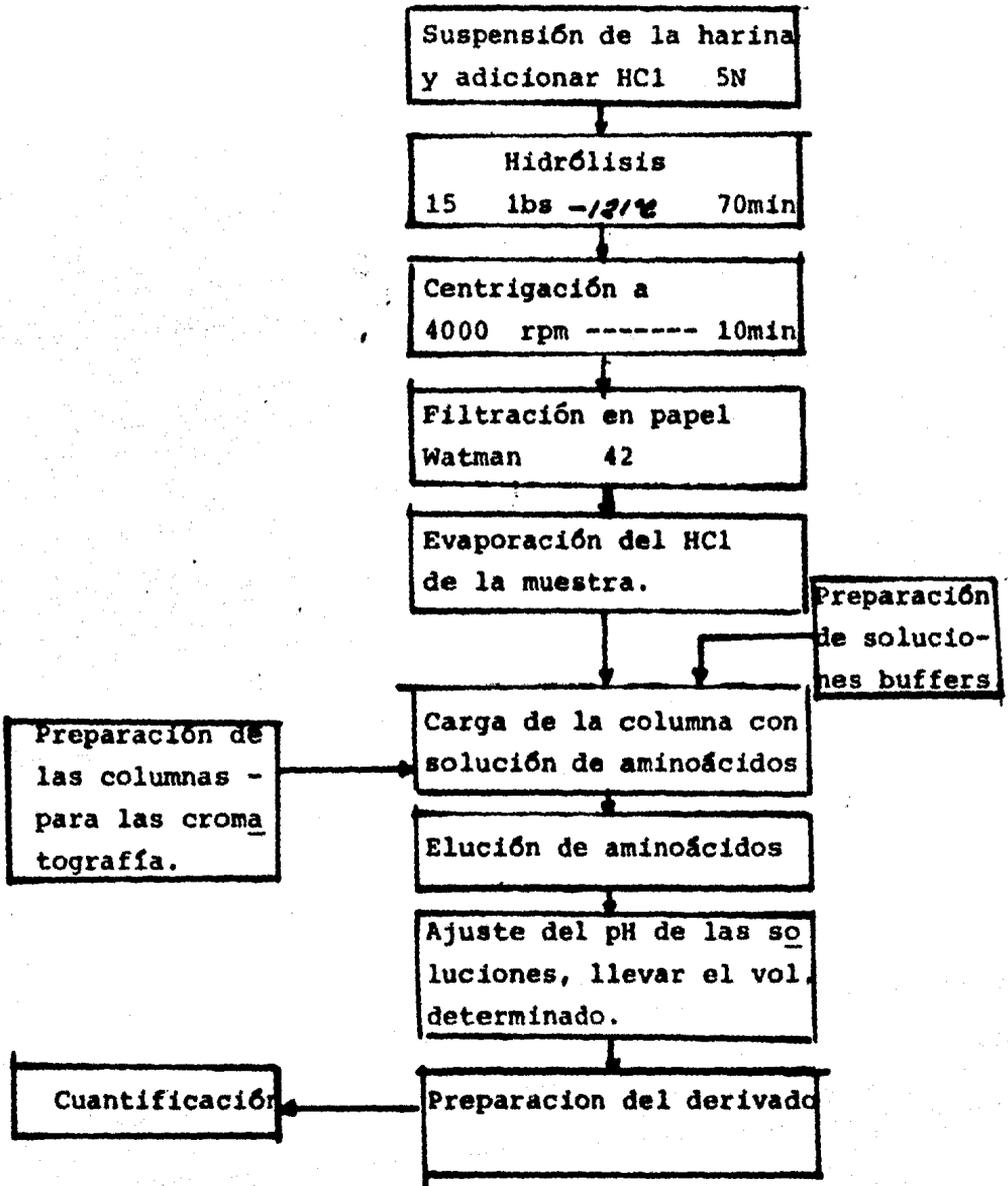
Velocidad de corrimiento del registro 50 nm/min

Dilucion de la muestra.- 1:1000

Lóngitud de onda maxima optima encontrada .- 414 nm

Fig. 20

DIAGRAMA DE FLUJO DEL METODO DE TRABAJO
PARA LA CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS



M A T E R I A L

Muestras

Harina de Soya Desgrasada Cruda
 Harina de Soya Standar
 Harina de Soya Tostada
 Harina de Soya Proto Veg
 Harina de Soya

Claves de Proveedor

HSDC
 H11543
 HST
 HSPV
 H11751

Reactivos

Acido Clorhidrico concentrado
 Acido Clorhidrico 5N
 ACido Tricloroacetico
 Carbonato de Potasio
 Acetato de sodio Q.P.
 Acido Acetico glacial
 Metanol. Absoluto
 Acido Sulfurico Concentrado
 Etanol R.A.
 P-dimentil amino Benzaldehído
 Acido Sulfúrico 0.02N
 Mischindikator de Merck
 Acido Borico
 Resina No. 1 de Merck fuertemen-
 te ácida, capacidad de 4 mili-
 equivalente/ml
 Agua desionizada
 Hidroxido de Sodio 10 N
 Patrones de Aminoácidos.

Material de Laboratorio

Columna para cromatogra
 fía--0.55x 10⁶ CM.
 Capsulas de Conway

Aparatos

Espectrofotómetro Varian Modelo-634

M E T O D O S

Preparación de las Muestras.

Pesar 1 gr de harina de soya, disolver en 12 ml de agua en tubo con tapón de rosca, adicionar 8 ml de ácido clorhídrico 5N y llevar a cabo la hidrólisis en autoclave a 15 lbs de presión por 70 min; dejar enfriar y agregar 5 ml de ácido tricloroacético al 10%, reposar 15 min y centrifugar 10 min a 4000 rpm, filtrar en papel Whatman 42. Tomar una alícuota de 6 ml y adicionar 150 ml de agua destilada y evaporar al vacío en evaporador rotativo a 50°C, 0.125 atm; pasar el residuo a un matraz volumétrico de 50 ml aforando con agua desionizada.

Preparación de las Columnas.

Empacar las columnas para cromatografía con 2.63 ml de resina fuertemente ácida ($R-SO_3H$) en columnas de 0.55 de diámetro por 10 cm de largo, lavar la resina con agua desionizada y enseguida acondicionarla con solución buffer de ácidoacético-acetato de sodio 1N de pH 3.25 con flujo de 0.30 ml/min, lavar nuevamente con agua desionizada; hecho esto se procede a cargar las columnas con alícuotas de 5 ml de la muestra preparada previamente.

Preparación de Soluciones Buffer.

Solución buffer I: 0.2N de acetato y pH 3.25.- Disolver 0.4903 gr de acetato de sodio en 200 ml de agua, medir -- 10.98 ml de ácido acético en 20 ml de agua y ajustar con ésta la solución anterior a pH de 3.25 . Se lleva a 1 litro en --- matraz aforado con agua desionizada.

Solución buffer II: 0.2N de acetato y pH 4.25.-Disolver 3.87 gr de acetato de sodio en 200 ml de agua, medir ---- 8.649 ml de ácido acético en 20 ml de agua y ajustar con ésta la solución anterior a pH de 4.25 y aforar a 1 litro con agua desionizada.

Solución buffer III: 0.35N de acetato y pH 5.28.--- Disolver 22.041 gr de acetato de sodio en 200 ml de agua, -- medir 4.59 ml de ácido acético en 20 ml de agua y ajustar al igual que las soluciones anteriores a un pH de 5.28 aforando despues a 1 litro con agua desionizada.

Elución.

Grupo 1.- Eluir con 140 ml de buffer I en la columna con un flujo de 0.20 ml / min; recibir en un vaso de precipitado de 250 ml.

Grupo 2.- Eluir con 150 ml de solución buffer II -- con flujo de 0.20 ml /min, recibir en vaso de precipitado de 250 ml.

Grupo 3.- Eluir con 180 ml de buffer III con flujo de

(63)

0.50 ml/ min, recibir en vaso de precipitado de 250 ml.

Las tres soluciones anteriores se evaporan hasta 35 ml, se enfrían se ajustan a pH de 11 con NaOH 10 N y se llevan a matraces aforados de 50 ml respectivamente, aforando a la marca con agua desionizada.

Preparación del derivado.

Tomar una alícuota de 10 ml de las soluciones eluidas de los grupos correspondientes 1, 2 y 3 y llevar a matraces volumétricos a un aforo de 25 ml con metanol absoluto. Tomar 10 ml de las soluciones anteriores y hacer reaccionar cada una con 5 ml de PDAB previamente preparado como se indica posteriormente; esperar 10 minutos y leer al espectrofómetro contra un blanco a 414 nm.

Blanco.- Tomar 10 ml de metanol al 60% y hacerlo --reaccionar de igual manera que el problema, como se explicó anteriormente en preparación del derivado.

Solución de P-dimetil amino benzaldehído.- Pesar 1 gr de PDAB diluir con 50 ml de metanol al 60% en matraz aforado de 100 ml, agregar 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y aforar con metanol al 60%.

Curva Estandar.

Pesar 40 mg de tirosina, disolver en matraz aforado de 100 ml con buffer de 3.25 y llevar a volúmenes. Tomar alícuotas de 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5; 5; 5.5; 6; 6.5; y 7 ml y llevar matraces aforados de 50 ml; ajustar con metanol absoluto habiendo previamente logrado un pH de 11 con NaOH 10N. Tomar 10 ml y agregar 5 ml de PDAB; leer en el espectrofotómetro a 414 nm contra un blanco dejándolo reaccionar 10 minutos.

En la tabla 10 se dan los datos de la curva estandar.

Graficar absorción contra concentraciones (m.moles). Interpolar en la curva patrón las lecturas de los problemas para encontrar las concentraciones de las soluciones de aminoácidos.

En la tabla 5 se asigna un número a cada harina para su posterior identificación en las tablas.

Calculos:

FORMULA.

$$\text{mg de aminoácidos/gr de} = \left(\frac{\text{Lectura de Cruva}}{\text{Patron}} \right) \left(\frac{\text{Volumen}}{\text{Muestra}} \right) \left(\frac{\text{P.M}}{\text{Promedio}} \right) \left(\text{Factor} \right)$$

-Para un volumen de muestra de. - - - - - 25 ml

-P;M. Promedio.- Peso molecular Promedio

de los aminoácidos. - - - - - 136.75 gr/gr mol

*Factor.- Diluciones en la cromatografía - - - - - 208.3

Se refiere a los siguiente:

(65)

-De 25 ml de Hidrolizado de proteínas se toma 1 alicuota de 6 ml para liberar el exceso de ácido sulfúrico, trabajada la alicuota se lleva a un volumen de 50 ml.

-De los 50 ml de solución de aminoácidos se toman 5 ml para cargar la columna el eluyente se lleva a un volumen de 50 ml.

-De los 50 ml de la elución se toman 10 ml para la preparación del derivado de aminoácidos.

Determinación del Nitrógeno amoniacal en las muestras por el método de Conway.

Con la finalidad de conocer la aportación del nitrógeno presente en sales de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en las muestras, y que se toma como nitrógeno proteico al efectuar una determinación por método Kjeldalh, se decidió practicar en ellas una valoración del nitrógeno amoniacal con la adaptación del método de Conway.

El método para la valoración del nitrógeno amoniacal de las muestras se basa en la reacción que se efectúa entre una sal de amonio y una solución saturada de K_2CO_3 ; el amoniacal se desprende y **con** presencia de un indicador de nitrógeno se valora, esto se hace con una solución ácida de normalidad conocida. El indicador es de color rojo púrpura pero en presencia de nitrógeno cambia a color verde y en el punto final de la titulación vira nuevamente al rojo púrpura.

Para la determinación se utiliza una cápsula de Conway que consiste en un recipiente pequeño de vidrio que tiene dos cavidades concéntricas y totalmente separadas; ver Fig. 23; la cámara central es para el indicador y en la exterior se efectúa la reacción básica con lo que se libera el amoniacal; esta cámara tiene además una tapa de vidrio que debe evitar fugas del amoniacal a valorar.

Preparación de los reactivos.

1.- Acido sulfúrico 0,02 N. Se prepara una solución de ácido sulfúrico 0,02 N y se titula en presencia de anaranjado de metilo'

2.- Solución saturada de carbonato de potasio.- Se prepara una solución saturada de carbonato de potasio y se lleva a ebullición posteriormente para eliminar las posibles sustancias nitrogenadas.

3.- Mischindikator.- El indicador se prepara de la siguiente manera; en un matraz aforado de 500 ml colocar 300 ml de agua destilada, disolver en ésta 5 gr de ácido bórico, agregar 100 ml de alcohol etílico R.A. y adicionar 2.5 ml de Mischindikator de Merck y aforar con agua destilada.

Procedimiento.- Suspender 0.5 gr de harina en 10 ml de agua, en un matraz aforado de 100 ml, filtrar y lavar el papel filtro recogiendo los lavados y ajustar a la marca; tomar 0.4 ml y llevar a la cámara exterior de la cápsula, posteriormente tomar 1 ml de la solución indicadora de nitrógeno con pipeta volumétrica de 1 ml y depositarlo en la cámara central de la cápsula; se coloca 1 tapa de vidrio cubriendo la tercera parte de la cápsula.

(68)

Medir 1 ml de solución saturada de carbonato de potasio clocarlo rápidamente en el otro extremo de la cápsula evitando que se una la solución de la muestra. Tapar la cápsula.

En seguida agitar la cápsula para mezclar la muestra y el reactivo, dejar reposar 60 min y después titular con ácido sulfúrico 0.02 N hasta obtener vire del verde al rojo púrpura. En la tabla (11) se pueden apreciar los resultados obtenidos.

Calculos:

FORMULA

$$\text{mg de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 / 100 \text{ ml} = \frac{(\text{Vac}) (\text{Nac}) (\text{meq})}{\text{p.m.}}$$

Vac.- Volúmen de ácido sulfúrico 0.02 N.

Nac.- Normalidad del ácido sulfúrico.

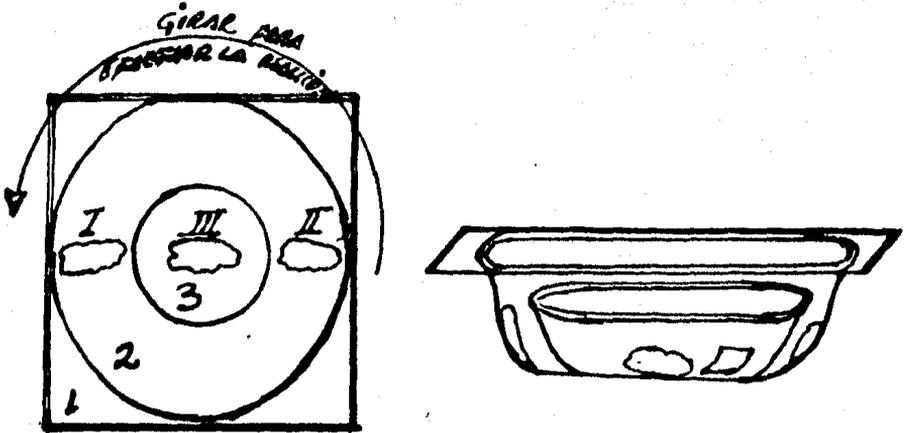
meq.- Miliequivalentes de sulfato de amonio.

p.m.- Peso de la muestra.

(69)

Fig. 21

CAPSULA CONWAY



1.- TAPA DE VIDRIO

I.- MUESTRA DE HARINA DE SOYA

2.- CAMARA EXTERIOR II.- REACTIVO DE K_2CO_3

3.- CAMARA CENTRAL. III.- INDICADOR-MISCHINDICATOR.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION.

TABLA 5

H A R I N A S

| Número asignado. | Clave de la harina. |
|--|---------------------|
| 1 <u>HARINA DE SOYA STANDAR</u> | H1143 |
| 2 <u>HARINA DE SOYA DESGRASADA CRUDA</u> | HSDC |
| 3 <u>HARINA DE SOYA TOSTADA</u> | HST |
| 4 <u>HARINA DE SOYA</u> | H11751 |
| 5 <u>HARINA DE SOYA PROTOVEG</u> | HSPV |

(21)

RESULTADOS Y DISCUSION

TABLA 6

LECTURAS DE ABSORCION Y MEDIAS OBTENIDAS EN EL ESPECTROFO-
METRO DE LOS GRUPOS DE AMINOACIDOS EN LAS HARINAS DE SOYA.

PRUEBA No. 1

| HARINAS | GRUPOS DE AMINOACIDOS. | | |
|---------|------------------------|---------|----------|
| | ACIDOS | NEUTROS | BASICOS. |
| 1 | 0.166 | 0.203 | 0.164 |
| 2 | 0.176 | 0.201 | 0.160 |
| 3 | 0.169 | 0.204 | 0.162 |
| 4 | 0.175 | 0.192 | 0.165 |
| 5 | 0.178 | 0.203 | 0.161 |

PRUEBA No. 2

| | | | |
|---|-------|-------|-------|
| 1 | 0.168 | 0.207 | 0.164 |
| 2 | 0.176 | 0.207 | 0.160 |
| 3 | 0.171 | 0.204 | 0.166 |
| 4 | 0.175 | 0.198 | 0.169 |
| 5 | 0.178 | 0.207 | 0.165 |

MEDIAS

| | | | |
|---|-------|-------|-------|
| 1 | 0.167 | 0.205 | 0.164 |
| 2 | 0.176 | 0.204 | 0.160 |
| 3 | 0.170 | 0.204 | 0.164 |
| 4 | 0.175 | 0.195 | 0.167 |
| 5 | 0.178 | 0.205 | 0.163 |

(12)

Media.- Media aritmética de las lecturas de la absorción por cada harina y por cada grupo respectivamente.

(73)

T A B L A 7

RELACION ENTRE CONCENTRACION DE GRUPOS DE AMINOACIDOS
Y PRODUCCION DE ERITROMICINA EN CADA HARINA

| HARINAS | ACIDOS | NEUTROS | BASICOS | RENDIMIENTOS DE ERITROMICINA DEL PROCESO FERMENTA TIVO. |
|---------|---------|---------|---------|--|
| | mg / gr | de | harina | mg/ml |
| 1 | 104.68 | 203.66 | 96.77 | 10775 |
| 2 | 131.31 | 202.95 | 86.16 | 6293 |
| 3 | 112.72 | 202.95 | 96.77 | 5953 |
| 4 | 123.97 | 179.09 | 104.68 | 5635 |
| 5 | 132.00 | 205.61 | 86.16 | 4553 |
| *6 | 111.50 | 152.00 | 116.60 | |

(74)

TABLA 8

RELACION ENTRE DIFERENCIAS DE CONCENTRACION DE CADA GRUPO DE AMINOACIDOS CON RESPECTO A LA MUESTRA STANDAR, Y LA PRODUCCION DE ERITROMICINA.

| ACIDOS | | NEUTROS | | BASICOS | | RENDIMIENTOS DE ERITROMICINA DEL PROCESO FERMENTATIVO. |
|-----------|------------|---------|------------|---------|------------|--|
| mg | Δc | mg | Δc | mg | Δc | mg/ml |
| 1.-104.68 | | 203.68 | | 96.77 | | 10775 |
| 2.-131.31 | 26.62 | 202.95 | 0.71 | 86.16 | 10.61 | 6293 |
| 3.-112.72 | 8.04 | 202.95 | 0.71 | 96.77 | 0 | 5953 |
| 4.-123.97 | 19.29 | 179.09 | 24.57 | 104.68 | 7.91 | 5635 |
| 5.-132.00 | 27.32 | 205.61 | 1.95 | 86.16 | 10.61 | 4553 |

(75)

TABLA 9

CONCENTRACION TOTAL DE AMINOACIDOS OBTENIDOS POR EL METODO
PROPUESTO Y CONCENTRACION PROTEICA POR METODO KJ. ELDAHL.

| HARINAS | CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS OBTENI DAS POR METODO PRO PUESTO. | CONCENTRACIONES PROTEICA POR ME TODO KJ ELDAHL. |
|---------|---|---|
| 1 | 407.11 | 453 |
| 2 | 420.11 | 480 |
| 3 | 412.44 | 477 |
| 4 | 409.74 | 441 |
| 5 | 431.75 | 490 |
| *6 | 385.00 | 500 |

*6.- Datos del análisis de una harina, proporcionados por un proveedor y que se anexa aquí a los resultados, - obtenidos, como un dato comparativo.

(26)

TABLA 10

CURVA STANDAR DEL DERIVADO DE AMINOACIDO

(DERIVADO DE TIROSINA)

| ABSORCION | m.MOLES X 10^{-8} |
|-----------|---------------------|
| 0.1275 | 0 |
| 0.139 | 4.43 |
| 0.145 | 6.63 |
| 0.151 | 8.84 |
| 0.157 | 11.00 |
| 0.162 | 13.20 |
| 0.167 | 15.00 |
| 0.175 | 17.40 |
| 0.181 | 19.80 |
| 0.187 | 22.00 |
| 0.193 | 24.30 |
| 0.199 | 26.50 |
| 0.205 | 28.70 |
| 0.210 | 30.90 |

(77)

TABLA 11

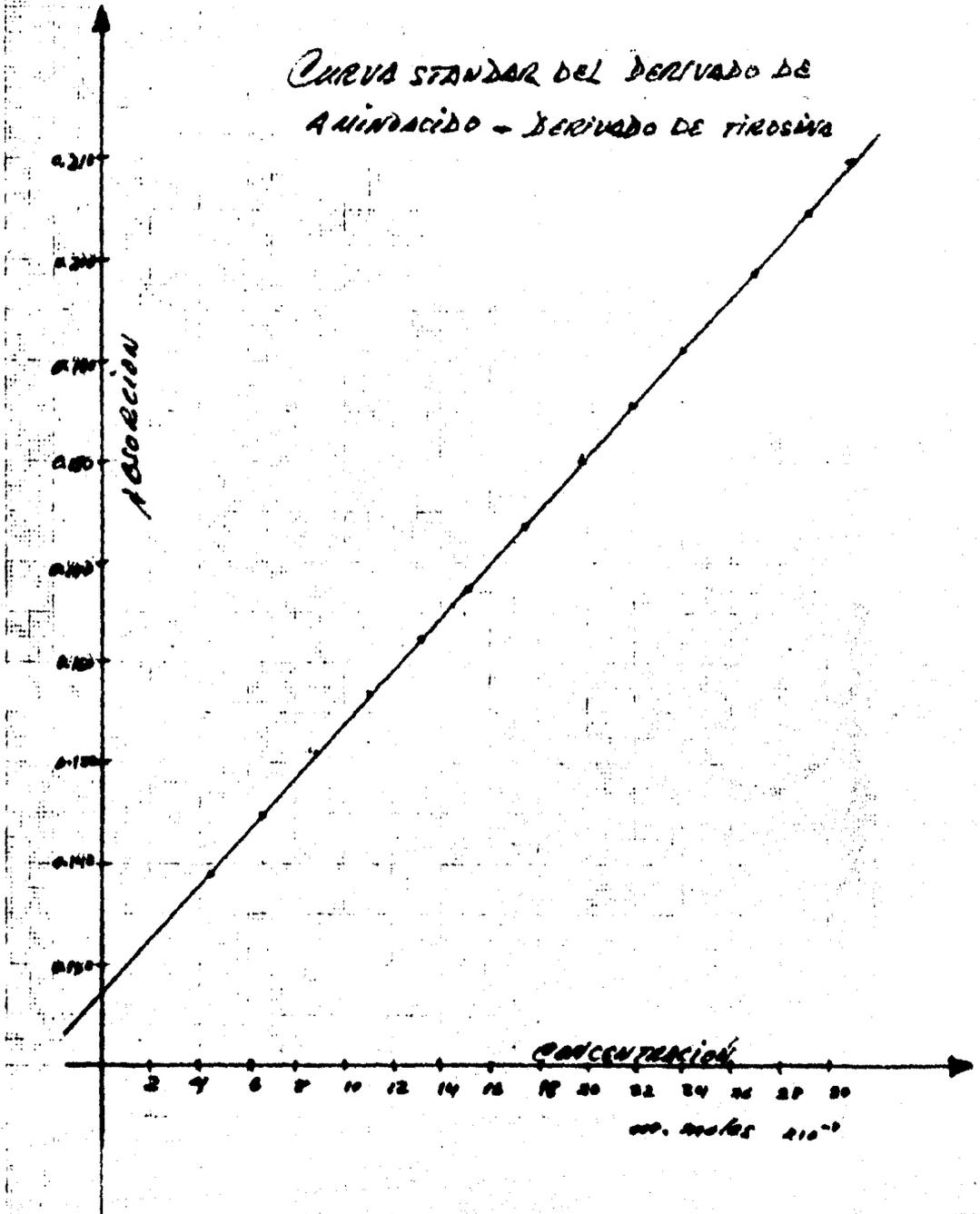
CONCENTRACIONES EN NITROGENO AMONICAL OBTENIDAS
EN LAS MUESTRAS POR EL METODO CONWAY.

| HARINAS | GASTO DE H_2SO_4 | $(NH_4)_2SO_4$ | N_2 |
|---------|--------------------|----------------|-------|
| | ml | mg | % |
| 1 | 0.012 | 15.8 | 0.336 |
| 2 | 0.011 | 14.0 | 0.308 |
| 3 | 0.015 | 17.0 | 0.364 |
| 4 | 0.011 | 14.0 | 0.300 |
| 5 | 0.011 | 14.0 | 0.300 |

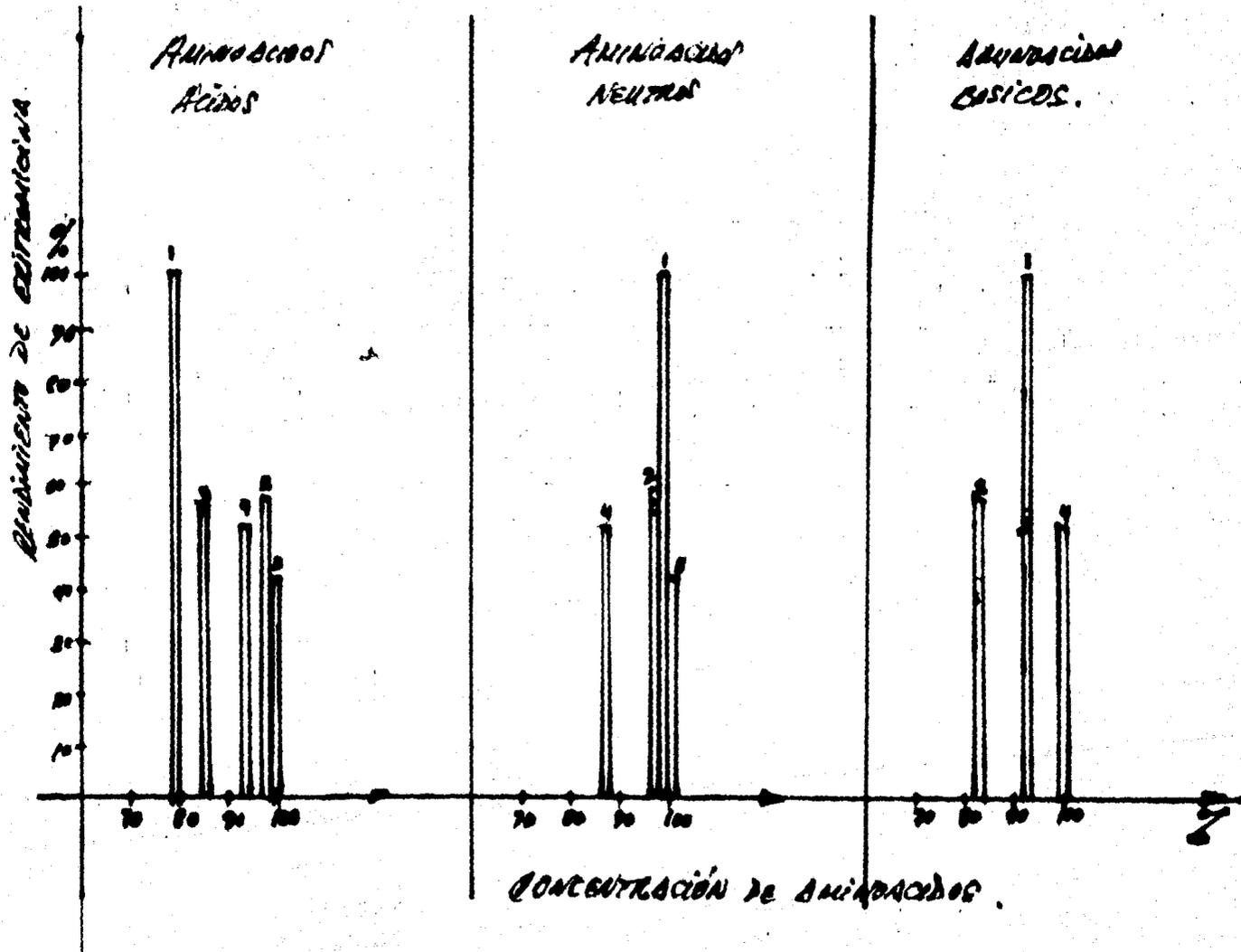
Como se puede ver en esta tabla los datos porcentuales de nitrógeno no son de valor significativo dentro de los valores del nitrógeno total obtenidas ya que fluctúan entre 0.308% a 0.364 %.

GRAFICA N° 1

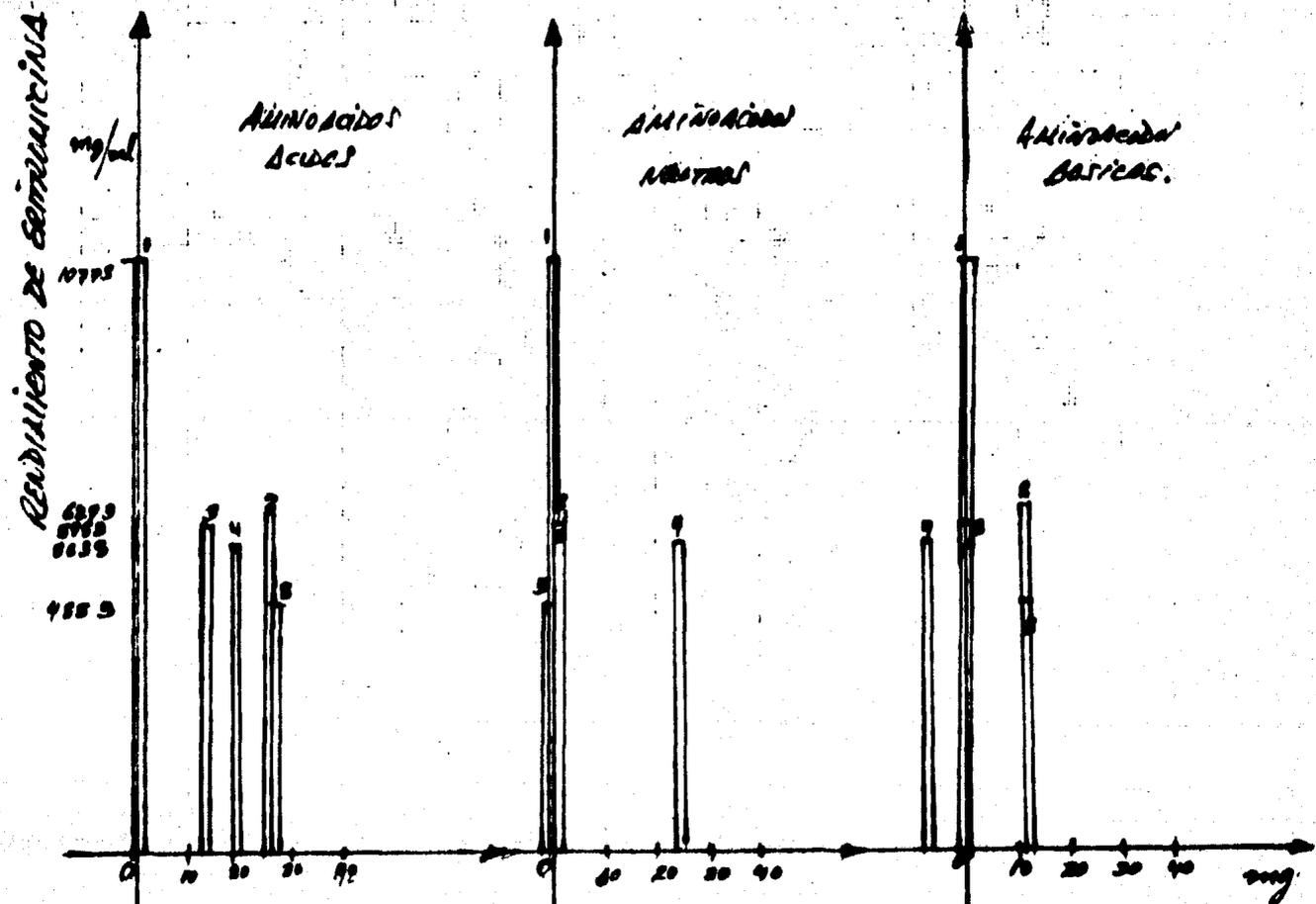
CURVA STANDARD DEL DERIVADO DE
AMINOCIDO - DERIVADO DE TIROSINA



GRAFICA Nº 2



GRAFICA Nº 3



AMINOACIDOS
ACIDOS

AMINOACIDOS
NEUTROS

AMINOACIDOS
BASICOS.

DIFERENCIAS DE CONCENTRACIONES DE AMINOACIDOS CON RESPECTO A LA MUESTRA ESTANDAR

D I S C U S I O N

El trabajo se desarrolló bajo las siguientes condiciones:

A las muestras de Harina de Soya se les practicó -- una hidrólisis acida a una temperatura de 121°C durante 70 - minutos, efectuándose una filtración posterior con el fin de separar materia residual e insoluble que pudiera interferir en la cromatografía de intercambio iónico. Posteriormente se lleva a cabo la evaporación del ácido clorhídrico, que de no efectuarse causaría efectos de competencia entre los iones - H^+ en solución y los grupos ionizados de los Aminoácidos causando un rendimiento bajo de captación de los mismos de parte de los grupos activos de la resina de intercambio iónico. Es importante también la eliminación del ácido clorhídrico para obtener el pH adecuado en los aminoácidos para ser cargados en la columna cromatográfica. Lo anterior condujo a tratar - las muestras con lavados sucesivos a presión reducida en rotavapor; obteniéndose así la muestra lista para la Cromatografía.

En cuanto al método cromatográfico que se trabajó - puede decirse que la resina utilizada presenta una buena capacidad de intercambio iónico debido a la fuerte disociación

(22)

del grupo funcional (H-SO_3) que da al polímero una eficiente aceptación del catión del aminoácido por lo que tiene lugar un rápido intercambio iónico y que a la vez permite también recuperar rápidamente los iones cargados en la resina.

La resina se trabajó en la forma sal-acido ya que de esta manera hace la función de un buffer que mantiene el pH adecuado, en este caso la resina se acondicionó con un buffer para mantener el pH en 3.25, esta es la acidez determinada para eludir el primer grupo de aminoácidos después de lo cual se utilizarán diferentes buffers según el grupo a eluir.

Se trabajó un volumen de resina basado en su capacidad de intercambio iónico que es de 4 miliequivalentes/ml, considerado como el óptimo para captar las cantidades de aminoácidos que se puedan encontrar en una harina de soya, tomando en cuenta su proporción protéica y de acuerdo también a su concentración y acidez presenta; el volumen de resina está calculado con un exceso del 40%.

Las columnas se adaptaron y se hicieron con buretas de laboratorio de un diámetro de 0.55 cm.

La elución, se llevó a cabo con soluciones buffers a

un pH alrededor del punto isoeléctrico de cada grupo de aminoácidos.

La velocidad de elución se estableció tomando en cuenta que el eluyente debe estar en contacto con la resina-- el tiempo óptimo para lograr así al máximo la eficiencia de la columna.

Los buffers tienen una fuerza iónica tal que permite un rápido intercambio de sus cationes con el sistema-- -- -- (CH₃-COO-H/CH₃-COO-Na), sin embargo estos no deben sustituir drásticamente los cationes de la resina, ya que la columna se descarga sin dar la resolución correcta de los iones problemas en ella.

Es importante también no trabajar con altas concentraciones de buffers, ya que se pueden dañar los puentes en la molécula de poliestireno.

Reacción con el PDAB.- Se utiliza el PDAB como reactivo, el cual con su grupo aldehído y el amino del aminoácido dan lugar a la formación de una base de schiff, obteniéndose una ligadura conjugada en el derivado del aminoácido, tal estructura cromófora que es la misma para todos los aminoácidos es la responsable de la intensidad de la coloración por lo que presenta cierta absorción en la región del espectro visible - que puede cuantificarse a la misma 414 nm para todos los aminoácidos.

obteniéndose buenos resultados en el trabajo analítico.

Así también ha de decirse que el reactivo en cuestión no presenta riesgo alguno para el analista a diferencia -- del compuesto comunmente utilizado para el mismo propósito - - en otros trabajos, la-ninhidrina-; siendo también de fácil - - disponibilidad en el comercio.

De esta manera, las razones antes expuestas sirven como base para obtener un juicio que nos permite plantear la -- secuencia analítica que se utiliza en este caso para el análi-- sis de aminoácidos.

Respecto a los resultados obtenidos; éstos se presentan en tablas, agrupados de tal manera que se puedan apre- - ciar las variaciones de las 5 harinas trabajadas.

En la tabla 6 se presentan las lecturas de absor-- ción de los tres grúpos de aminoácidos de las harinas, de - -- las pruebas 1 y 2; se muestran también las medias aritmétic - -- cas de dichas lecturas, siendo estas las que se utilizan - - -- para obtener las concentraciones problemas en la curva pa- - - trón.

Las tablas 7 y 8 se explican mediante las graficas 2 y 3, la 2 muestra las concentraciones de cada grupo de aminoácidos y la 3 las diferencias de concentraciones con respecto a la harina standar contra la producción de eritromicina; como - puede verse en esta gráfica en las 2 variables estudiadas no se

(85)

aprecia un comportamiento proporcional significativo que permita establecer una dependencia de las concentraciones de aminoácidos con la producción de eritromicina en el proceso fermentativo.

En la tabla 10 se pueden apreciar las variaciones de los datos de las concentraciones protéicas de cada harina obtenidas por el método de Kjeldahl y de las concentraciones de los aminoácidos totales por el método propuesto, con el cual se puede decir que la recuperación del compuesto en análisis es aceptable ya que tal recuperación es del 90% con respecto a la concentración total proteico que da el método Kjeldahl.

V.-CONCLUSIONES

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

Los valores resultaron ser aceptables en cuanto a la recuperación de los aminoácidos en las harinas, comparando el método propuesto en este trabajo, con el método-Kjeldahl, éstos guardan una buena relación con datos de problemas obtenidos con otras técnicas; sin embargo los valores de aminoácidos de cada grupo no tienen una relación clara con la producción de eritromicina; posiblemente de alguna manera un mejor equilibrio de concentraciones entre los grupos de aminoácidos como se aprecia en la harina Standar podría influir o regular la fase de crecimiento de la población microbiana o podría ser un factor óptimo de desarrollo de capacidad de biosíntesis del metabolito secundario, la eritromicina.

Este estudio puede ser útil para integrarlo a un sistema de cromatografía de líquido de alta presión ya que simplifica el trabajo analítico necesario para lograr una buena resolución de una mezcla de aminoácidos en tal cromatografía.

B I B L I O G R A F I A.

- 1.- Rainbow, c. and Rose, A.H.: Biochemistry of Industrial -- Microorganisms., Academic Press, London New. York, 279---285, 1969.
- 2.- Aharonowitz Yair.: Antibiotic Production, Proteolysis and Sporulación, Ann. Rev. Microbiol., 34, 217-219, 1980.
- 3.- Klare, S, Markley.: Soybean Products., Interscience Publishers Inc. Company., I, 292-293, 1970.
- 4.- Smith, Allan, Kand Circle, Sidney, J.: Soybeans., Vol I, - Proteins., The Avi Publishing Company, Inc., 73-75, 1972.
- 5.- Ramírez Hernández y Castillo, A.: Posibilidades de una -- Mejor Utilización de la Soya para Consumo Humano., Inn .- Pronal Conacyt., 1977.
- 6.- Alden, Don.: Soybeans Processing From Beans to Ingredi--- ents., J. Am. Oil. Chemists. Soc., 52, (12), 244-246, 1975.
- 7.- Methods of analysis of the association of official analytical chemists; 13a. Edición, William Horwitz, Editor - - 1980.
- 8.- Becker, Kenneth, W.: Processing of Oilseeds to Meal and -- protein Flakes.: J. Am. Oil. Chemists'. Soc., 48, 301, 1971.
- 9.- Rakes, Joseph, J.: The Beans.: J.A. Oil. Chemists'. Soc.; 53, 313-314, 1976.

- 10.- Demian, Arnold, L. and Solomaon, Nadine, A.: Industrial Microbiology., Scientific. Am. 245, (3), 42, 1981.
- 11.- Phaff, Herman, J. Industrial Microorganisms., Scientific. A.m., 245, (3), 64, 1981.
- 12.- Zahner, H, y Werner K. Maas.: Biology of antibiotics Vol. 4 Heidelberg Acience library; springer verlag; New York,- Heidelberg Berlin, 10, 1972.
- 13.- Aharonowitz Yair., and Coen Gerald.: The Microbiological- Production of Pharmaceuticals, 245, (3) 106, 1981.
- 14.-Eveleigh, Douglas, E.: The Microbiological Production of - Industrial Chemicals., 245, (3), 120, 1981.
- 15.- Casida, L.E. Jr.: Industrial Microbiology., 3ra.Ed, John- Wiley and Sons Inc. 171, 1968.
- 16.- Litter Manuel.: Farmacologia., 5 Edición, Ed. El Ateneo.- 1630- 1631, 1975.
- 17.- Corcoran, John W.: Biosintesis, Vol.IV, Antibiotics., -- Springer- Verldg. Berling New York, 132- 172, 1981.
- 18.- Maun J.: Secondary Metabolism; Oxford chemia try series,- Oxford University Press, 8, 21, 71, 1978
- 19.- Abott David y Andrews, R.S.: Introducción a la Cromatogra_{ff}a, Secc.1., Ed Alhambra., 3-13, 1973.
- 20.- Lewis, Anne, M. Waterhouse, Christine an Laurence, S. --- Jacobs.: Whole-Blood and Plasma Amino Acid Analysys; Gas- Liquid Chromatography., Clin. Chem., 26, (2), 271-276, 1980.

- 21.- Crowshaw, K, Jessup Sheila and Ramwell.P.W.: Thin Layer Chromatography of 1-dimetil amino naphtalene 5 sulfonil Derivatives of Amino Acids Present in Superfussates of-Cat Cerebral Cortex., *Biochem. J.* 103, (79) 1967.
- 22.- Berg, Eugene W.: Physical and Chemical Methods of Separations., Mc. Graw Hill Book Company., 177-179, 1973.
- 23.- Spackman, D.H.;Stein, W.H., and Moore,S.: Automatic Recording Apparatus for use in the Chromatography of -- Amino Acids., *Anal. Chem.*, 30, 1192-1205, 1958.
- 24.- Wilkinson, J. Michael.: The separations of Dansil Amino acids by Reversed Phase High Preformance Liquid Chromatography., *J. Chrom. Sc.* 16, 547-549, 1978.
- 25.- Voerter, Wolfgang and Zech, Karl.: High Performance Liquid Chromatographic., Analysis of Aminoacids and Peptide Hormone Hydrolysates in the picomole Range., *J.Chrom* 112, 643-649, 1975.
- 26.- Webb, F.C.: Ingenieria Bioquímica., Editorial Acribia - Zaragoza España., 688 y 700., 1970.
- 27.- Tabla de la Asociación Americana de la Soya.