

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCION DE BIOMASA DE *Nocardia brasiliensis*
HUJEG-1 A ESCALA PILOTO PARA LA
OBTENCION DE PROTEASAS CASEINOLITICAS.**

POR

CATALINA RIVAS MORALES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

**SEPTIEMBRE, 1998
MONTERREY, NUEVO LEON. MEXICO.**

TD
QR82
.N6
R5



1080080366

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCION DE BIOMASA DE *Nocardia brasiliensis*
HUJEG-1 A ESCALA PILOTO PARA LA
OBTENCION DE PROTEASAS CASEINOLITICAS.

POR

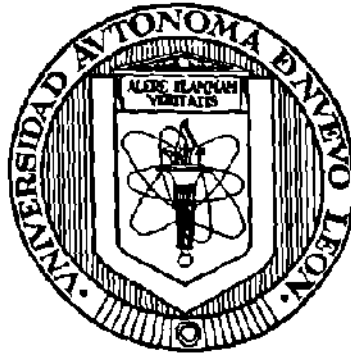
CATALINA RIVAS MORALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

SEPTIEMBRE, 1998
MONTERREY, NUEVO LEON, MEXICO.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 A ESCALA PILOTO
PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEASAS CASEINOLÍTICAS.

Por

CATALINA RIVAS MORALES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología Médica

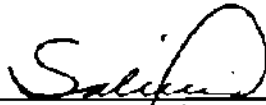
Septiembre, 1998.

Monterrey, Nuevo León. México.




**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA
DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 A ESCALA PILOTO PARA LA
OBTENCION DE PROTEASAS CASEINOLITICAS**

Aprobación de la Tesis:



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

Presidente



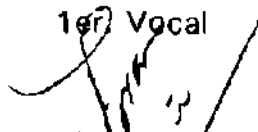
DR. GERARDO VELAZCO CASTAÑON

Secretario



DR. LUIS J. GALAN WONG

1er. Vocal



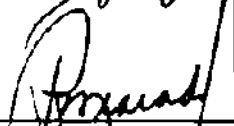
DR. HIRAM MEDRANO RENDON

2do. Vocal



DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ

3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA

Subdirector

De Investigación y Estudios de Posgrado

**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA
DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG- I A ESCALA PILOTO PARA LA OBTENCIÓN
DE PROTEASAS CASEINOLÍTCAS.**

Presentado por : Q.F.B. MC. Catalina Rivas Morales

Este trabajo se realizó en los Departamentos de *Inmunología y Microbiología* de la Facultad de Medicina y Departamento de *Microbiología e Inmunología*, Planta de Fermentaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona y la coasesoría de: Dr. Luis J. Galán Wong, Dr. Hiram Medrano Roldán y la Dra. Herminia Martínez Rodríguez. Apoyado parcialmente por CONACYT y Universidad Autónoma de Nuevo León.



**Dr. Mario César Salinas Carmona.
Asesor Doctoral.**

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

**Ignacio Rivas Flores
Justina Morales de Rivas
Con amor y eterna gratitud.**

A MI ESPOSO:

**Q.F.B. y Lic. Manuel Leos Leos
Con amor.**

A MIS HIJOS:

**Manuel,
Catalina y
Francisco Fernando.
Con cariño.**

In memoriam

Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla
A mi maestro, quien me brindó su
apoyo y confianza para
iniciar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

**A la Universidad Autónoma de Nuevo León,
por el apoyo brindado en los Programas:
“Apoyo de Tesis de Posgrado” 1997 y
“Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica”
(PAICYT) 1998.**

Y

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por la beca otorgada para la realización del Doctorado,
inscrito en el Padrón de Posgrados de Excelencia y
apoyo parcial de los proyectos: 2453-PM y 25653-M.**

A MIS ASESORES:

Dr. Mario César Salinas Carmona, por su asesoría, apoyo e interés brindados.

Dr. Luis J. Galán Wong, por el apoyo y la revisión del escrito.

Dr. Hiram Medrano Roldán, por su asesoría y entusiasmo.

Dra. Hermina Martínez Rodríguez, por su asesoría y sus acertados consejos.

Dr. Gerardo Velazco Castañón, por la evaluación del trabajo y sugerencias.

A la maestra M.C. Alicia Suárez, por sus enseñanzas y afecto.

Al Director de la Facultad de Ciencias Biológicas, M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez, por el apoyo y confianza para realizar el presente trabajo.

A la Lic. Martha Santoyo Stephano, por su amistad y colaboración en el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A Manuel Leos Rivas, por el cariño y colaboración en el uso de los diferentes programas computacionales utilizados en el presente trabajo.

Al Dr. Carlos E. Hernández Luna, por su amistad y su colaboración en el análisis de los resultados obtenidos en las determinaciones enzimáticas.

A MC Lucia Palacios Cortéz, Norma A. Villarreal Valdés y S. Yesenia Silva Belmares y a QBP Diana Flores, por su amistad y colaboración en el escalamiento del proceso.

Biol. Jaime Treviño Neavez, por la realización de parte de las figuras presentadas en éste trabajo.

QFB Ma. Elena Cantú Cárdenas del Depto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas, por el préstamo de los depósitos del fermentador.

A la Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán y M.C. Carlos García Díaz, por su amistad y las determinaciones de proteínas de las fuentes de nitrógeno.

A M.C. Mayra Covarrubias, Dr. Salomón Martínez Lozano, M.C. María Luisa Rodríguez Tovar, Biol. Eufemia Rubio, Q.I. Esperanza Castañeda, por su amistad y apoyo.

A mis compañeras de Microbiología: M.C. Concepción Melgoza C., M.C. Agustina de los Santos Vega, Q.F.B. Wendy Escalante, L.Q.C. Ma. Guadalupe Rodríguez y L.Q.C. Adriana Pizaña, por su amistad y compañerismo

A mis compañeros de Inmunología: Dra. Angeles Castro, M.C. Alma Ramos, M.C. Isabel Perez, M.C. Ernesto Torres, M.C. Velia Vazquez, y Dr. Angel Licon, por su amistad y compañerismo

A mis compañeros del Depto de Bioquímica de la Fac. de Ciencias Biológicas: Q.B.P. Lilia Miranda, Dra. Leticia Haward, M.C. Adriana Nuñez, M.C. Graciela García, Ing. Felix Barrera, Q.B.P. José Garza, QBP Juan Antonio Rodríguez A, M.C. Eduardo Martínez Vega. por su amistad y óptimo ambiente de trabajo

Al personal Secretarial y Técnico de los Deptos de Microbiología e Inmunología y Postgrado de la Facultad de Medicina y Facultad de Ciencias Biológicas.

A MIS GRANDES AMIGAS:

Dra. Azucena Oranday Cardenas y Dra. María Julia Verde Star
por su sincera amistad, apoyo y estímulo
para culminar éste proyecto.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	
1. INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes	
1.1.1. Nutrientes y condiciones de cultivo	4
1.1.2. Microorganismos de importancia industrial	14
1.1.3. Obtención de enzimas	19
1.1.4. Producción, purificación e identificación de enzimas	22
1.1.5. Respuesta inmune	25
1.2. Objetivos	29
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1. Origen de los reactivos	30
2.2. Material biológico	30
2.3. Medios de cultivo	
2.3.1. Medio de cultivo para mantenimiento de la cepa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	30
2.3.2. Medios de cultivo para la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel fermentador	33

2.4. Esterilización de:	
2.4.1. Medios de cultivo, ácidos, bases y antiespumante	33
2.4.2. Material de vidrio y filtros de aire	33
2.4.3. Aire	33
2.5. Preparación de Inóculo de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a:	
2.5.1. Nivel matraz	34
2.5.2. Nivel fermentador	34
2.6. Obtención de la biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a:	
2.6.1. Nivel matraz	35
2.7. Cinética de crecimiento a nivel matraz	
2.7.1. Cinética de crecimiento en el medio de cultivo seleccionado	36
2.7.2. Peso húmedo	36
2.7.3. Peso seco	37
2.7.4. Azúcares reductores	37
2.7.5. pH	
2.7.6. Velocidad específica de crecimiento (μ) y Tiempo de duplicación (t_d)	38
2.8. Determinación del coeficiente de rendimiento celular	38
2.9. Obtención del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	39
2.9.1. Eliminación de Lípidos de la célula bacteriana de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	40
2.9.2. Ruptura celular tipo:	

2.9.2.1. Corte sólido	40
2.9.2.1. Corte líquido	41
2.10. Determinación de proteínas totales método de Bradford	
2.10.1. Curva de calibración con albúmina sérica bovina	42
2.10.2. Contenido de proteínas de los extractos celulares de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	42
2.11. Análisis de los extractos celulares de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	
2.11.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS -PAGE)	42
2.11.2. Tinción con azul de Coomassie	43
2.11.3. Tinción con Nitrato de Plata	43
2.11.4. Determinación de la actividad caseinolítica	
2.11.4.1. Técnica de Mc Laughlin y Faubert	44
2.11.4.2. Técnica de Montville	45
2.12. Parámetros de importancia económica en la fermentación	
2.12.1. Concentración de oxígeno disuelto	45
2.12.2. Consumo de energía de mezclado	46
2.12.3. Medición de tiempo de mezclado	46
2.12.4. Demanda de oxígeno (N_a)	46
2.12.5. Coeficiente de respiración (Q_{O_2})	47
2.12.6. Coeficiente de transferencia de oxígeno KLa	
2.13. Fermentación	
2.13.1. Obtención de biomasa a nivel fermentador	47

2.13.2. Condiciones de operación de la fermentación	49
2.13.3. Cinética de crecimiento a nivel fermentador.	49
2.13.4. Recuperación de biomasa del fermentador	50
3. RESULTADOS	
3.1. Selección de medios de cultivo para la obtención de biomasa, proteínas totales, actividad caseinolítica a nivel matraz.	51
3.2. Producción de enzimas extracelulares de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	53
3.3. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	55
3.4 Efecto de relación de la concentración carbono – nitrógeno en la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	57
3.5. Efecto de diferentes sales minerales en la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en el medio de cultivo No. 4.	59
3.6. Efecto de la temperatura y velocidad de agitación en la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	60
3.7. Cinética del pH en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	60
3.8. Cinética de crecimiento de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel matraz en el medio de cultivo No. 5C – 4	61
3.9. Determinación de la masa molecular de los componentes de los extractos celulares de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	63
3.10. Producción de biomasa de <i>Nocardia brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel fermentador	64
3.10.1. Cinética de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel fermentador	65

3.10.2. Cinética de consumo de oxígeno en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1	66
3.11. Relación de la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel matraz y fermentador.	68
4. DISCUSION	69
5. CONCLUSIONES	77
6. BIBLIOGRAFIA	78
7. LISTA DE ABREVIATURAS	87
8. APENDICES	
8.1. Apendice A. Reactivo DNS	90
8.1. Apendice B. Gel de corrimiento	90
8.2. Apendice C. Gel de Empaquetamiento	91

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cinética en la producción de los antibióticos Benzanthrinas A y B de <i>N. lurida</i>	13
2	Cinética en la producción de los antibióticos Actinoidin A y A ₂ a partir de <i>Nocardia</i> sp (SK&F-AAJ-193).	15
3	Cinética en la producción del antibiótico PC-766B. a partir de <i>N. brasiliensis</i> (SC-4710).	18
4	Escalamiento de la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	35
5	Obtención del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	39
6	Controles del fermentador Modelo M19-1410 New Brunswick Scientific.	48
7	Parámetros en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en diferentes medios de cultivos, utilizando solamente los componentes hidrosolubles del medio de cultivo	52
8	Hidrólisis caseinolítica de los extractos de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en los medios de cultivo 1, 4, 5 y 6	54
9	Parámetros en el medio de cultivo No. 5 con diferentes proporciones de peptona de colágena.	57
10	Biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 con diferentes proporciones de las fuentes de carbono y nitrógeno.	58
11	Biomasa de la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a diferentes condiciones a nivel matraz	60
12	Cinética de pH en la producción biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a diferentes condiciones en el medio de cultivo 5C- 4 a nivel matraz.	61
13	Cinética de la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en el medio de cultivo 5C- 4 a nivel matraz.	62

14	Electroforesis en gel SDS – PAGE en gradiente 8.75 – 18.0% de los extractos de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1.	63
15	Obtención de la biomasa de de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en un fermentador de 14 litros.	64
16	Cinética de crecimiento de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en el medio de cultivo 5C-4 a nivel fermentador.	66
17	Cinética de consumo de oxígeno en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en el medio de cultivo 5C-4.	67
18	Ecuación de Lineweaver – Burk sobre la cinética del consumo de oxígeno en la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en el medio de cultivo 5C-4.	67

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Efecto de la temperatura y el volumen del medio de cultivo sobre la producción de los antibióticos Benzanthrinas A y B en matraz con agitación.	12
2	Efecto de la agitación y volumen del medio de cultivo sobre el rendimiento de los antibióticos Benzanthrinas A y B en un fermentador NBS de 14 litros.	12
3	Medios de cultivo para la producción del antibiótico A10255 a partir de <i>Streptomyces gardneri</i> .	20
4	Composición de los medios de cultivo en la para la Producción de de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1.	32
5	Parámetros en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1 en diferentes medios de cultivo a 37°C / 200rpm.	53
6	Parámetros en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1 en diferentes medios de cultivo (componentes hidrosolubles).	53
7	Producción de enzimas caseinolíticas extracelulares de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1 en diferentes medios de cultivo.	54
8	Composición del medio de cultivo No. 5 con diferentes fuentes de nitrógeno.	55
9	Parámetros determinados en el medio de cultivo No. 5 con diferentes fuentes de nitrógeno.	56
10	Modificación en la proporción de peptona de colágena en el medio de cultivo No. 5C.	56
11	Parámetros determinados en el medio de cultivo No. 5 con diferentes proporciones de peptona de colágena.	56

12	Parámetros determinados en la relación porcentual C -N en el medio de cultivo 5C-4 en la producción de biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1.	58
13	Modificación en la composición del medio de cultivo No. 4.	59
14	Parámetros determinados en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1 en el medio de cultivo No. 4 con diferentes sales.	59
15	Biomasa de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG -1 en el medio de cultivo No. 5C-4 a condiciones diferentes de temperatura y velocidad de agitación.	60
16	Parámetros determinados en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel fermentador.	65
17	Comparación de los parámetros en la producción de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 a nivel matraz y fermentador.	68

RESUMEN

Catalina Rivas Morales

Fecha de Obtención del Grado: Septiembre de 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 A ESCALA PILOTO PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEASAS CASEINOLÍTICAS.

Número de Páginas: 91

Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología Médica


Area de Estudio: Microbiología Médica

Propósito y Método de Estudio: *N. brasiliensis* HUJEG - 1 produce proteasas caseinolíticas que probablemente participen en los mecanismos de patogenicidad. El objetivo del presente trabajo, es investigar los requerimientos nutricionales, las condiciones fisicoquímicas y biológicas para el desarrollo óptimo de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto y la producción de proteasas caseinolíticas intracelulares. Se diseñaron medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales; se seleccionó el medio de cultivo que proporcionó mayor cantidad de biomasa en peso seco, proteínas totales y actividad caseinolítica a nivel matraz y en este medio se probaron diferentes condiciones de temperatura y velocidad de agitación, posteriormente se aumentó la escala de la producción de biomasa a nivel fermentador .

Contribuciones y Conclusiones: El medio de cultivo diseñado está constituido a base de: glucosa, peptona de colágena, extracto de levadura, NaCl, CaCO₃ ajustados a pH 7.0 y las condiciones óptimas fueron temperatura 30°C y velocidad de agitación 250 r.p.m. a nivel matraz; el tiempo de duplicación (td) y la velocidad de crecimiento (μ), disminuyó aproximadamente el 50 % a nivel fermentador. El medio de cultivo diseñado presentó 4.5 veces más peso seco, 3.5 veces más de proteínas totales, 4.9 veces más de actividad caseinolítica y un costo 27 veces menor, respecto al testigo (BHI) a nivel matraz. Para incrementar los rendimientos a nivel fermentador, sería conveniente realizar pruebas a diferentes niveles de velocidad de agitación y aereación.




Dr. Mario Cesar Salinas Carmona
Asesor Doctoral



Dr. Luis J. Galán Wong
Coasesor



Dr. Hiram Medrano Roldán
Coasesor



Dra. Herminia Martínez Rodríguez
Coasesora

1. INTRODUCCION

Nocardia brasiliensis pertenece al orden Actinomycetales de la familia Nocardiaceae, es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta, parcialmente ácido resistente, forma filamentos ramificados extensos en la mayoría de los medios, mide alrededor de 1 µm de diámetro, se fragmenta después de 4 días de incubación y produce células bacilares y cocoides irregulares (49,51,81). Los organismos del género *Nocardia* son considerados como microorganismos saprófitos del suelo, son los responsables principales de la descomposición de material orgánico de plantas, crece en un rango de temperatura de 10 - 45°C y pH de 6.0 - 9.0, en presencia de 5% de NaCl, no es sensible a penicilina, el contenido de G + C del DNA varía de 67 - 68 moles % (81,50). La caracterización de los actinomicetos se basa en dos propiedades químicas: 1) La presencia del aminoácido dibásico en la pared celular, 2) La presencia del azúcar en la hidrólisis total celular. Según la composición de sus aminoácidos y azúcares se clasifican en diferentes tipos; en el grupo de organismos Tipo IV pueden ser separados en : a) Con ácidos micólicos como: *Corynebacteria*, *Micobacterias* y *Nocardiae* y b) Sin ácidos micólicos como: *Faenia*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Actinopolyspora*, *Amycolata*, *Amicolatopsis* y *Kibdelosporangium* (22). Las paredes celulares de *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* son muy similares cuyos constituyentes principales son : Meso - DAP (ácido 2,6, diaminopimélico), arabinosa y galactosa (9, 80,81).

Las especies de nocardias causantes de la mayoría de las infecciones son: *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum* y *N. brasiliensis* para diferenciarlas las especies entre si

se realizan pruebas bioquímicas. Las infecciones que causan son: a) Nocardiosis localizada, b) Nocardiosis sistémica c) Infecciones linfocutáneas y d) Micetoma (58,59)

Micetoma es una infección crónica causada por bacterias aerobias y hongos verdaderos, afecta tejido cutáneo, subcutáneo, músculo y hueso, puede diseminarse a cavidad torácica, abdominal, etc., está caracterizada por lesiones inflamatorias deformantes no dolorosas y fistulas que drenan exudado seroso o purulento, los microorganismos emiten filamentos en los tejidos y se aglutinan en colonias más o menos compactas llamadas granos (2,39, 79). La distribución geográfica de actinomicetosis es endémica en países tropicales, constituye un problema de salud pública por la frecuencia, cronicidad, secuelas y costos socioeconómicos que ocasiona la enfermedad . Los micetomas se presentan con mayor frecuencia en la banda transversal que sigue el trópico de cáncer (entre 14° S y 33° N) principalmente en India, África, México, Venezuela y Brasil. En México se han reportado casos en los estados de: Morelos, México, Jalisco, Veracruz, Michoacán, Guerrero y Nuevo León. La distribución por sexo es 4:1 y edades de 16 - 30 y 31 - 40 años en hombres y mujeres respectivamente (2,29,80). En México el agente etiológico de micetoma es *N. brasiliensis* (86%), seguido por *A. madurae*, *S. somaliensis*, *A. pelletieri*, *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*. Entre los eumicetomas predominan *M. mycetomatis* y *M. grisea*.(3, 80,81)

A partir de la lesión de micetoma es posible el aislamiento e identificación del agente causal: por técnicas microbiológicas, análisis de ácidos micólicos, la relación del DNA y la resistencia a patrones de antibióticos (9, 30,48,7680,81,95). Además se han desarrollado técnicas para el inmunodiagnóstico y monitoreo de la acción

terapéutica en el paciente, tales como: inmunoelectroforesis, ELISA y Western-blot (36, 55, 78, 79).

N. brasiliensis produce proteasas caseinolíticas que probablemente participen en los mecanismos de patogenicidad. Se ha estudiado la inmunogenicidad de las proteasas y su posible efecto inductor en el micetoma experimental en ratones BALB/c y se determinó midiendo la respuesta de anticuerpos en el suero de los ratones, mediante un ensayo de ELISA contra la enzima (55). La producción de proteasas se realiza en pequeña escala y en medios de cultivo costosos; en esta investigación se pretende encontrar un medio de cultivo con óptimos coeficientes de rendimiento, alto contenido de proteasas caseinolíticas y además bajo costo.

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1 NUTRIENTES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los actinomicetos pueden crecer en muy diversos substratos; se desarrollan en un amplio rango de temperatura y son favorecidos por un pH ligeramente alcalino; por lo tanto, los nutrientes utilizados y las condiciones de cultivo son muy importantes para la producción de biomasa y metabolitos secundarios de estos microorganismos (81)

Los medios de cultivo se clasifican en químicamente definidos y complejos, dependiendo de si su composición es conocida o no. Es necesario un balance de componentes elementales para proporcionar los nutrientes requeridos para obtener la biomasa. Los microorganismos requieren para su crecimiento una fuente de energía y una de carbono, en la mayoría de las fermentaciones industriales una misma fuente provee ambas, es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas para la composición interna del organismo (H_2 , O_2 , C, N_2 , S, P, Mg, Mn, Ca, Fe, Co, Zn, Cu, Mo). La composición celular depende del tipo de microorganismo, por ejemplo bacterias, levaduras y hongos caen en el siguiente rango: carbón 45-55%, nitrógeno 6-14%, potasio 0.5 - 2%, fósforo 1-3%, magnesio 0.1-1%, azufre 0.02-1%, calcio 1% (% en peso seco). También están presentes minerales menores tales como cobre 0.1- 10 mg, fierro 1 - 10 mg, zinc 1 mg y manganeso 0 - 5 mg. La formulación del medio de cultivo debe considerar todos los elementos antes mencionados además de otros necesarios para

la producción de metabolitos especiales (antibióticos, enzimas, etc.). Los constituyentes se clasifican en grupos del A - D; el grupo "A" contiene todos los nutrientes necesarios excepto nitrógeno (Glucosa, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), el grupo "B" provee nitrógeno en forma de ion amonio, que es metabolizado por la mayoría de los microorganismos y el anión fosfato provee alguna capacidad buffer ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$). La función del grupo "C" un quelato cuya fórmula general es $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, proporciona el ion metal en solución, este también causa efectos tóxicos sobre todo cuando el inóculo es pequeño. La propiedad buffer de los componentes del grupo "D" es necesaria para mantener el pH (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4).

Los estudios cinéticos son necesarios para entender el comportamiento de cualquier fermentación y consisten en la estimación de las velocidades de síntesis celular, formación de productos y efectos del medio ambiente sobre éstas velocidades. El crecimiento unicelular de un cultivo estático a nivel matraz o fermentador, limitado por la cantidad de sustrato inicialmente, puede ser expresado en términos de la concentración celular X, la del sustrato limitante S y la del inhibidor I. En la cinética también deben considerarse las condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH, que se establecen al principio de la fermentación y estas varían durante su transcurso a menos que se controlen estrictamente, esto puede contribuir notablemente en el crecimiento celular y los metabolitos secundarios que se produzcan (4,56,73,86).

Cuando a un microorganismo se le proporcionan los nutrientes necesarios y las condiciones ambientales óptimas, realiza un conjunto de reacciones metabólicas, las

células crecen y/o producen algunos metabolitos de interés. La conversión de sustrato a biomasa determina el rendimiento del crecimiento celular, generalmente cuanto más oxidado está el sustrato menor es el rendimiento (56,73).

En un cultivo microbiano se presentan diferentes fases de crecimiento: I Lag o de retardo, II aceleración del crecimiento, III crecimiento exponencial, IV desaceleración, V estacionaria y VI declinación; estas fases reflejan cambios en la biomasa y en el medio ambiente. Después de un periodo lag el crecimiento ocurre a la máxima velocidad y finalmente cesa, como resultado del balance entre los siguientes factores: carencia de un nutriente, acumulación de un producto inhibitorio o algún cambio fisicoquímico en el medio ambiente (56,73,86)

Cuando el crecimiento de un cultivo está limitado por la cantidad inicial de sustrato, la curva de crecimiento puede expresarse en términos de parámetros de crecimiento; la ecuación de Monod describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento μ y la concentración del nutriente limitante S, en el cultivo.

Ecuación de Monod :
$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad \mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

La concentración celular X, se puede determinar por diferentes métodos : el número de células y la masa celular , dependiendo de las características físicas de los microorganismos, principalmente su tamaño. Para microorganismos miceliales se determina por peso seco (56,73, 86).

En la fermentación se estudian los efectos de los siguientes factores: velocidad de agitación, aereación, pH y temperatura; en muchos casos los instrumentos están conectados a una computadora y estudiar la dinámica de los cultivos. Un proceso de fermentación, comprende, además de las reacciones bioquímicas efectuadas por un microorganismo y/o por enzimas, las características físicas y de operación del recipiente donde se va a realizar el proceso y las operaciones que se efectúan antes y después de la fermentación. El escalamiento de procesos es una tarea interdisciplinaria que requiere del uso combinado e integrado de conceptos y métodos de Ingeniería Química y Fisiología Microbiana. (14,16,73,89).

El manejo de poblaciones microbianas puras, requiere que los procesos sean operados sin contaminación, para lograrlo es necesario un alto grado de limpieza y que las operaciones sean asépticas. La esterilización, es decir la eliminación o destrucción de todas las entidades vivas de los materiales que van a ser usados en el proceso, se puede llevar a cabo por agentes físicos (calor, filtración y radiación) o químicos (derivados clorados, metales pesados, derivados fenólicos, alcoholes, peróxido de hidrógeno, etc.). Un proceso típico de fermentación es susceptible a contaminarse de muchas maneras, las más comunes son: a) el medio de cultivo, b) el inóculo y el proceso de inoculación, c) el suministro de aire, d) la adición de nutrientes, antiespumantes, etc. durante el proceso, e) el fermentador mismo (por el diseño defectuoso de los sellos del reactor o falta de mantenimiento apropiado) (72,73).

La toma de **substratos, excreción de productos y el curso del metabolismo intracelular**, dependen del control combinado de los **antecedentes** genéticos de la célula y las condiciones del medio ambiente (56)

La temperatura es uno de los factores **más importantes** que afectan al crecimiento y a la supervivencia microbiana, puede afectar en **2 formas** muy diferentes. A medida que la temperatura sube, las reacciones enzimáticas **son más** rápidas y el crecimiento también, sin embargo, por encima de una cierta **temperatura**, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden **dañarse irreversiblemente**. El efecto de la **mínima temperatura no se conoce lo suficiente**, ésta **puede** afectar en la fluidez de la membrana citoplasmática, quizá a una **temperatura muy baja**, impide el transporte adecuado de los nutrientes, así como la formación de **gradientes** protónicos (56,59).

Otro factor es el pH, cada **microorganismo** tiene un pH óptimo; independientemente de las condiciones externas (**pH extracelular**), el pH intracelular debe permanecer cercano a la neutralidad, con la **finalidad de impedir** la destrucción de macromoléculas lábiles en condiciones **ácidas o alcalinas**. En un medio de cultivo, con medio no renovado, el pH puede cambiar durante el **crecimiento** como consecuencia de las reacciones metabólicas, por ello se emplean **amortiguadores** para mantener constante el pH del medio de cultivo, estos dependen del **microorganismo**. El pH es controlado dependiendo del tipo de organismo: para hongos **4.5 - 7.0**, levaduras **4.5 - 6.0** y bacterias **6.0 - 7.5** (4,5,16, 59, 64,73).

Todos los microorganismos requieren agua y la disponibilidad de ella es un factor importante en el crecimiento microbiano. La disponibilidad del agua depende no solo del contenido de esta en el medio ambiente, sino también de la concentración de solutos en ella, si el agua está asociada a los solutos no está disponible para el microorganismo. La disponibilidad de agua se expresa generalmente en términos físicos como actividad de agua (a_w), es la razón entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor a la misma temperatura del agua pura. El agua difunde de una región de baja concentración de solutos, a otra de mayor concentración de solutos (ósmosis). Los solutos que se acumulan en el citoplasma para ajustar la actividad de agua, no deben ser inhibitorios para la bioquímica celular; estos compuestos, son muy solubles en agua e incluyen diversos azúcares, polialcoholes, aminoácidos y derivados, los productos que se acumulan en el citoplasma para ajustar su actividad de agua. (4,56,59)

Para el crecimiento de muchos microorganismos aeróbios es necesario suministrar mucho aire debido a la baja solubilidad del oxígeno y el que es utilizado durante el crecimiento microbiano no es reemplazado siempre por difusión del aire, además, la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO_2 establece una demanda de oxígeno que es esencial satisfacer a través de la aereación y mezclado del cultivo (4, 59,73).

El sistema de agitación en un fermentador tiene cuatro funciones básicas: a) asegurar la homogeneidad del cultivo, es decir el macro-mezclado, b) promover la transferencia de masa en la interfase, es decir el micro -mezclado, c) promover la

transferencia de calor y d) proveer un área de interfase suficiente entre gas-líquido-sólido para la transferencia de masa. En una fermentación aereada, la transferencia de oxígeno al medio de cultivo debe cubrir la demanda del microorganismo, el suministro de oxígeno es adecuado si es mayor que la demanda por el microorganismo. (5,16,28,40,65,66)

1.1.2. MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA INDUSTRIAL

Couch y Ross (1980), recomendaron para la producción de *Bacillus thuringiensis* fuentes naturales de nitrógeno como: Harinas de pescado, semilla de algodón, soya, líquido de remojo de maíz, levadura autolizada y caseína. Como fuentes de carbono productos de maíz hidrolizado tales como almidón y dextrosa. El uso de éstas permite disminuir los costos de producción (21). Salama y cols. (1981), para la producción de *Bacillus thuringiensis* utilizaron varios subproductos industriales como: Harinas de pescado y de semilla de algodón, levadura de forraje, sangre de res, subproductos secos de ave, líquido de remojo de maíz, suero de queso, líquido de la centrifugación final de la producción de almidón de maíz; leguminosas tales como: habas, frijol de soya, garbanzo, judías, cacahuete y lentejas; éstas fueron incorporadas a un medio base constituido por: glucosa 6.0 g/L, extracto de levadura 2.0 g/L, K_2HPO_4 4.3 g/L, $CaCO_3$ 2.0 g/L y sales minerales 2.0 g/L (75).

Boeck y cols. (1983), obtuvieron un antibiótico análogo de la Vancomicina, N-Dimetilvancomicina (NDU), que fue producido por un microorganismo aislado de suelo colectado en Yucatán, México. Este microorganismo, se le designó como NRRL

15232, que fue identificado como *N. orientalis*. La producción de antibiótico disminuye por la adición de ortofosfato al medio de cultivo o leucina, estos son precursores de la aglicón, estimula la biosíntesis de N - dimetilvancomicina. Para la producción del antibiótico probaron diferentes fuentes de carbono tales como: glucosa, fructosa, galactosa, manosa, lactosa, sacarosa, dextrinas de papa, almidón soluble, almidón de maíz y glicerol y diferentes fuentes de lípidos tales como: aceite de maíz, aceite de soya refinado y metil oleato. Las mejores fuentes fueron dextrinas de papa, almidón soluble y aceite de soya refinado, los cuales produjeron 180, 166 y 139 $\mu\text{g/mL}$. de antibiótico respectivamente. Observaron el efecto de la temperatura sobre la biosíntesis del antibiótico (NDU) a 25, 28, 30 32, 34 y 37°C; determinaron que a 32 - 34°C obtenían mayor concentración de antibiótico 188 - 197 $\mu\text{g} / \text{mL}$. y un volumen celular de 9.0 % a las 120 h. (12).

Therriault y cols. 1986. Obtuvieron dos antibióticos Benzanthrinas A y B (quinonas), a partir de *N. lurida* estos antibióticos fueron obtenidos utilizando como medio de cultivo glucosa, levadura entera, peptona y CaCO_3 , estos antibióticos se detectaron a las 66 h en agitación durante un periodo de fermentación de 66 - 162 horas en un fermentador de 14 L. Se probaron diferentes fuentes de nitrógeno; peptona, lactoalbumina, harina de pescado, peptona de carne, extracto de carne, frijol de soya a diferentes temperaturas, las peptonas líquidas fueron las que produjeron mayor concentración de antibiótico a 24°C a las 66 h. mayor (170 mg /L) de Benzanthrina A y B (60 mg/L) (Tabla No.1). También probaron diferentes velocidades de agitación (TablaNo. 2) y aereación (0.5 y 1.0 VVM.) y las condiciones óptimas fueron 300 r.p.m. y 0.5 VVM con un volumen de células de 10 % a las 162 h. (Figura No.1) (88).

Tabla No. 1

Efecto de la temperatura y el volumen del medio de cultivo sobre la producción de los antibióticos Benzantrinas A y B en matraces con agitación

Temperatura °C	Volumen del medio ml	Edad h.	Benzantrina A mg/L	Benzantrina B mg/L
24	50	42	<1	<1
24	50	66	170	60
24	50	90	2	<1
24	50	114	<1	<1
28	50	42	17	1
28	50	66	<1	<1
28	50	90	<1	<1
28	50	114	<1	<1
30	50	42	<1	<1
30	50	66	4.3	<1
30	50	90	<1	<1
30	50	114	<1	<1
24	100	42	<1	<1
24	100	66	<1	<1
24	100	90	<1	<1
24	100	114	<1	<1

Theriault R *et al.* (1986) J. Antibiotics Vol. XXXIX No. 11 1509 - 1514.

Tabla No. 2

Efecto de la agitación, aereación y volumen del medio de cultivo sobre el rendimiento de los antibióticos Benzantrinas A y B en un fermentador NBS de 14 litros.

Volumen del Fermentador L	Agitación r.p.m.	Aereación VVM	Edad h	Benzantrina A mg / L	Benzantrina B mg / L
10	300	1.0	162	20	11
7	300	1.0	162	4	2
10	300	0.5	66	42	19
7	300	0.5	66	70	<1
10	150	1.0	114	17	17
7	150	1.0	114	23	10
10	150	0.5	114	<1	<1
7	150	0.5	114	<1	<1

Theriault R *et al.* (1986) J. Antibiotics Vol. XXXIX No. 11 1509 - 1514.

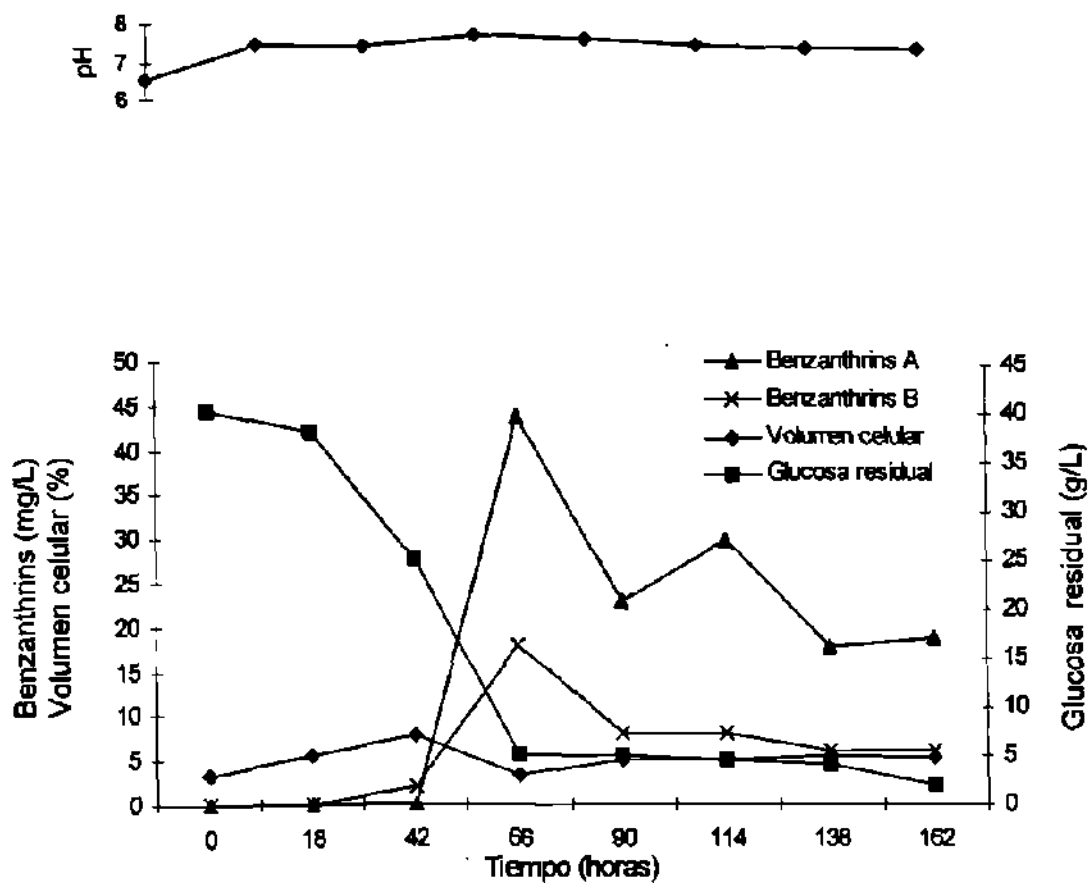


Figura No. 1 Cinética de la producción de antibióticos Benzanthrins A y B a partir de *N. lurida*. Theriault R. y cols. (1986) J. Antibiotics Vol. XXXIX No. 11 p 151

Dingerdissen J.J. y cols. (1986), obtuvieron un antibiótico Actinoidin A₂, a partir de *Nocardia* sp.(SK&F-AAJ-193), éste nuevo glicopéptido difiere de Actinoidin A por la presencia de rannosa en lugar de acosamina. Este análogo es aislado

utilizando resina Dianion HP - 20 seguida por una columna de un glicopéptido específico (Affigel-10-DAlaDAIa). La purificación fue realizada usando una columna cromatográfica de intercambio iónico. Para el escalamiento a 550 L, el primer inóculo fue transferido a 10 L en un medio constituido por: almidón 1.5%, sacarosa 0.5%, glucosa) 0.5%, líquido de remojo de maíz 0.5%, harina de soya 0.75%, K_2HPO_4 0.015%, NaCl 0.05%, $CaCO_3$ 0.15%, suplemento de minerales 5.0 ml/L ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaB_4 \cdot 7H_2O$, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ en un fermentador de 14 L el cual fue mantenido a 28°C, aereado a 4 L/min. y agitado a 250 r.p.m., al tercer día fueron transferidos 5L de éste inóculo a 50 L del mismo medio de cultivo en un fermentador de 75 L. El tercer inóculo fue incubado a 28°C, aereado a 25 L/min. y agitado a 250 r.p.m. Después de tres días de incubación 50 L del inóculo fueron transferidos a 500 L del medio de producción el cual estaba constituido por: glucosa 2.0%, harina de soya 1.0%, extracto de levadura 0.1%, $CaCO_3$ 0.1%, $CoCl_2$ 0.0001%, ajustados a pH 7.0, en un fermentador de 750 L, la fermentación se llevó a cabo a 28°C, aereada a 150 L/min. y agitada a 120 r.p.m., la producción máxima de Actinoidin A₂ fue de 124 µg/ml. y determinada por HPLC (Figura No. 2). Este antibiótico mostró actividad biológica contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococci* coagulasa negativos, sin embargo, este es menos potente que Actinoidin A. (23,24).

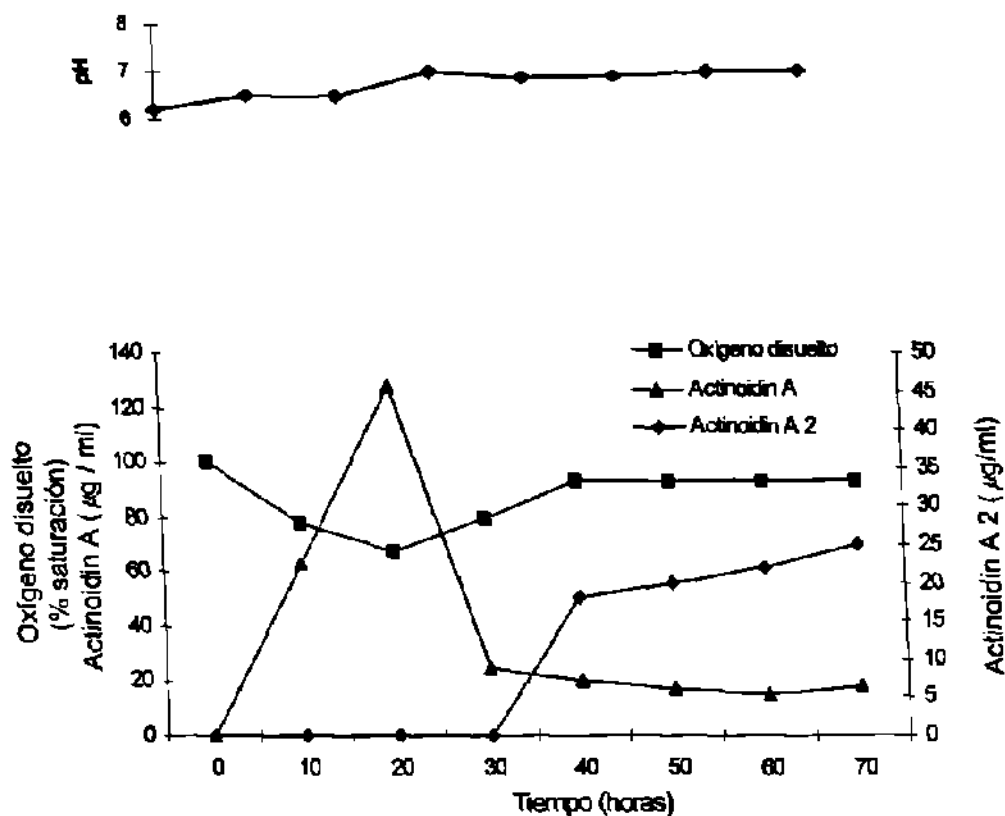


Figura No. 2 Cinética de la producción de antibióticos Actinoidin A y A₂ a partir de *Nocardia* sp (SK&F-AAJ-193) Dingerdisen y cols. (1987) J. Antibiotics Vol. XL No. 2 p 168

Lemmer Hilde y cols. (1987), determinaron tres tipos de sinergismo en actinomicetos en lodos activados, la biocianosis puede ser incrementada por otras bacterias de lodos, se produjo biomasa de dos cultivos de cepas de *Nocardia amarae*, con *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavobacterium* sp., se compararon los cultivos. *N. amarae* creció junto con *Alcaligenes* sp, mostró incremento en la producción de biomasa, utilizando un medio de cultivo a base de fructosa 1.0%, peptona 1.0%,

extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.7% , a 28°C por 336 h , esta fue monitoreada a 48, 96 y 336 h como peso seco . (53).

Rivas-Morales y cols. (1988), utilizaron once diferentes medios de cultivo para la propagación de siete cepas nativas de *B. thuringiensis*. Se diseñaron medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno; los constituyentes utilizados fueron melaza de caña de azúcar, glucosa, harinas de soya y maíz, líquido de remojo de maíz, agua de cocimiento de levadura, extracto de levadura, y sales minerales. Se seleccionó el medio de cultivo No. 4 para la propagación de *B. thuringiensis*, cuya composición es: melaza 0.5 %, harina de soya 1.0%, agua de cocimiento de levadura 3.0% y CaCO₃ 0.1%. En este medio de cultivo los extractos obtenidos mostraron mayor toxicidad que el resto de los extractos obtenidos en los otros medios probados, sobre larvas del 4º estadio de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens quinquefasciatus* (74)

Maiese W.M. y cols. (1990), obtuvieron un nuevo antibacteriano, le designaron Simaomicin α (LL.D42067 α), fue aislado de cultivo de la fermentación de una cepa de un actinomiceto , basándose en las características de cultivo, fisiológicas, morfológicas y características químicas, el cultivo LL-D42067 fue identificado como una nueva subespecie de *Actinomadura madurae*, la fermentación primeramente se realizó en matraces utilizando como medio de cultivo extracto de levadura 0.5%, N-Z amina tipo A 0.5%, dextrina 2.0 %, glucosa 1.0% y CaCO₃ 0.1%, el proceso se realizó a 32°C a 210 r.p.m. por 48 h, de ésta se tomó una alícuota de 100 mL. para inóculo y posteriormente se realizó en fermentadores de 12 L con el mismo medio a 32°C por 48

h. a 450 r.p.m. (aereación 1.0 VVM), el contenido del fermentador se transfirió a un fermentador de 410 L conteniendo 300 L. de medio de cultivo (aereación 0.75 VVM., 250 r.p.m. por 48 h.), posteriormente se transfirió a un fermentador conteniendo 3,000 L. de medio de cultivo, constituido de dextrinas 3.0%, glucosa 0.5%, Nutrisoya 1.5%, líquido de remojo de maíz 0.5%, CaCO_3 0.5% y antiespumante 0.3%, esta fermentación se corrió a 28°C por 144 h. a 450 r.p.m. (aereación: 0.66 VVM) se ajustó el pH a 6.8 - 7.0. La producción de antibiótico fue monitoreada por difusión en agar utilizando discos de papel con *Bacillus subtilis* y por HPLC, se obtuvieron 28 µg/ml y un volumen celular de 7.6 mL. / 10 mL. Simaomicin α demostró potente actividad contra bacterias Gram positivas y fue activo *in vivo* contra una variedad de especies del género *Eimeria* que causan coccidiosis en pollos. (57)

Kumagai K. y cols. (1992), obtuvieron de un aislado de suelo, un actinomiceto SC - 4710 *N. brasiliensis* que produce un nuevo antibiótico PC-766-B, éste es un macrólido de 16 miembros. El análisis revela que ésta célula SC - 4710 tiene las características: pared celular de tipo IV, todos los patrones de azúcares Tipo A, fosfolípidos Tipo PII, menaquinonas MK - 8(H_4), ácidos grasos con cadenas saturadas e insaturadas, ácido tuberculoesteárico y ácidos micólicos. La cepa fue identificada como *N. brasiliensis* (Lindenberg) Pinoy. Para la fermentación se utilizó el medio de cultivo constituido por: glicerol 5%, harina de soya 3%, CaCO_3 0.4%, pH 7.2 a 27°C con un flujo de aire de 7.5 L. por min. a 150 r.p.m.(Figura No. 3). Se obtuvo una concentración de 440 µg/mL de PC-766B durante 10 días, aproximadamente el 95 % del antibiótico fue encontrado en la fracción celular. El antibiótico presenta actividad biológica contra

bacterias Gram positivas, algunos hongos y levaduras, también presentó actividad antitumoral contra células murinas *in vitro* e *in vivo* y una actividad inmunitaria débil *in vitro* contra $ATPase Na^+ K^+$. Se obtuvo un peso húmedo de 0.25 g/mL. (44)

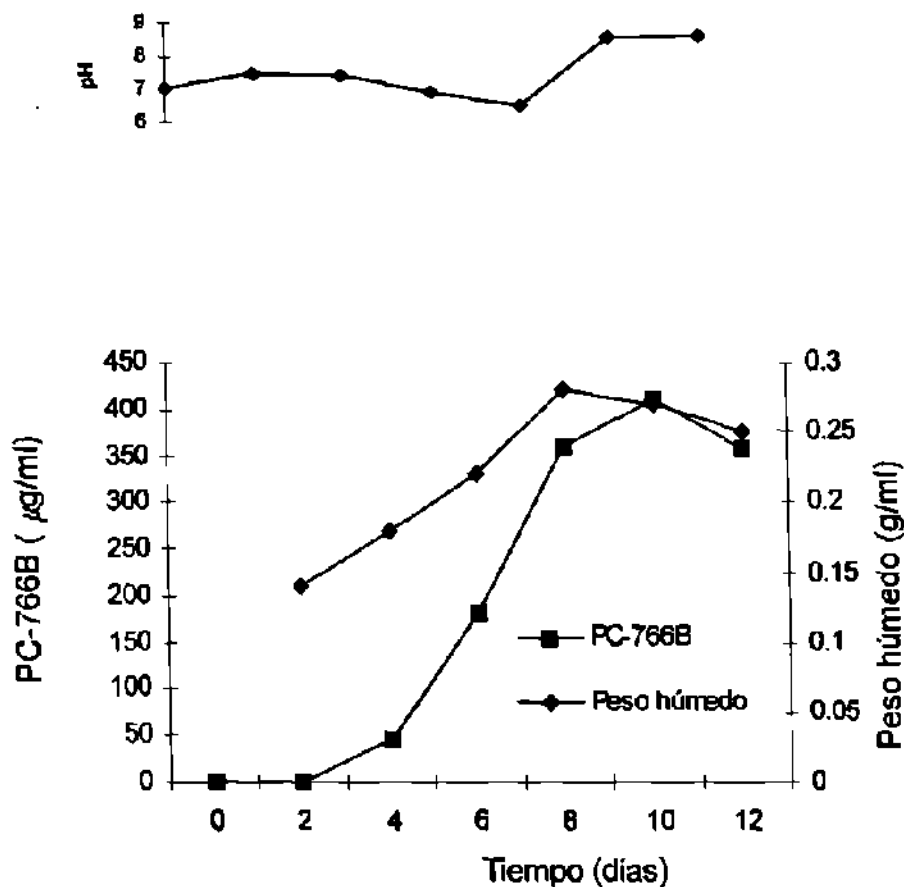


Figura No. 3 Cinética de la producción del antibiótico PC-766B a partir de *N. brasiliensis* (SC-4710). Kumagai K. Y cols. (1983) J. Antibiotics Vol. 46 No. 6 p 975.

Boeck L. y cols. (1992), obtuvieron un antibiótico tripéptido denominado A10255, producido a partir de la cepa de *Streptomyces gardneri*, en una concentración < 2 µg/mL en el medio de cultivo seleccionado. Se realizaron modificaciones en la selección de los constituyentes del medio de cultivo, y se examinaron los efectos de la malasa, CaCO₃, sulfato y fuentes alternativas de la fuente de carbono. Las fuentes de carbono que se probaron fueron: glucosa, fructosa, glicerol, glicerol + glucosa, en el glicerol (3%) se obtuvo un peso húmedo de 13% y 52µg/mL, la que produjo mayor concentración de antibiótico fue glicerol + glucosa (3 + 1%), con una producción de biomasa de 12% y 67 µg/mL. Se probaron diferentes fuentes de nitrógeno: bacto-peptona, hidrolizado de soya, hidrolizado de aminocaseína, glicina, alanina, serina, asparagina, glutamina y NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, la fuente que produjo mayor concentración de antibiótico fue Bacto-peptona, con una concentración de 81 µg/mL, con un peso húmedo de 11%, también se probaron diferentes concentraciones de antiespumante propilenglicol (P-2000) y la de 0.2% presentó mayores rendimientos en biomasa 15% y 123 µg/mL, se observó la influencia de ortofosfato a diferentes concentraciones y 0.001% incrementó la síntesis del antibiótico aprox. 50% respecto al medio al cual no se adicionó ortofosfato. Niveles bajos de CaCO₃ mantenían el pH cerca de la neutralidad, la omisión del carbonato producía acidificación del medio y disminución en la producción de antibiótico. Se probaron varios medios de cultivo para la producción a diferentes niveles (Tabla No. 3). La fermentación se llevó a cabo por 7 días en un fermentador de 165 L, aereada con 45% de oxígeno disuelto con una presión interna de 0.35 atmósferas, el pH se controló de 6.9 - 7.1 con soluciones diluidas de H₂SO₄ y NH₄OH (11).

Tabla No. 3

Medios de cultivo para la producción del antibiótico A10255 a partir de la *Streptomyces gardneri*

Ingredientes	Inicial	PAH	HCA
Glucosa	1.0%	1.0%	0.1%
Glicerol		4.0	
Bacto-peptona	0.5	0.9	
Hy-Aminocaseína		0.9	1.6
Moladas	2.0	4.0	4.0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		0.01	0.01
CaCO ₃	0.2	0.5	0.5
Propilenglicol		0.2	0.2
Cepa	Tipo Silvestre	NRRL 15922	NRRL 15922
Rendimiento (µg/mL)	<0.2	170.0	330.0

Boeck L. D. y cols. (1992). J. Antibiotic 45:8 1222 - 1230.

1.1.3. OBTENCION DE ENZIMAS

Las industrias de procesos bioquímicos se encargan del aprovechamiento de materiales biológicos bajo condiciones controladas tales como: microorganismos, tejido celular animal, productos microbianos y enzimas. Los requerimientos necesarios para estos procesos son: una población celular homogénea, seleccionada con características idóneas para el proceso y/o producto particular, los elementos nutricionales en las proporciones y cantidades óptimas de producción, las condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo del microorganismo. Como resultado se obtendrá un incremento en el número de microorganismos y diversos productos intra y extracelulares (73).

La ruptura de las células se emplea cuando se tiene interés en los productos intracelulares (proteínas, ácidos nucleicos o enzimas). Los componentes de las células tienen alta presión osmótica y están envueltos por una membrana semipermeable y frágil, protegida de ruptura por una pared celular rígida y fuerte. Los métodos de ruptura se clasifican en: a) Mecánica: corte de líquido (ultrasonido, agitación mecánica y presión) y corte de sólido (molido y presión); b) No mecánica: descongelamiento y lisis (física, química y enzimática) (33,73).

Las técnicas para determinar la actividad proteasa en sólidos, difieren en el tipo de sustrato y procedimientos usados para la determinación de productos y condiciones de incubación. La caseína, azocaseína, gelatina, péptidos y albúminas pueden ser utilizados como sustratos por periodos cortos y largos de incubación. La determinación de la concentración de proteínas es importante, provee un punto de referencia para otras mediciones tales como: metabolitos secundarios y actividad enzimática. Obviamente las proteínas tienen un número de propiedades básicas en común. Sin embargo, difieren grandemente en su composición, secuencia, tamaño y forma, de ello dependen los métodos para su determinación, para la selección del método se consideran varios criterios: a) detectabilidad, b) interferencia con otras sustancias presentes, c) variabilidad de respuesta con otras proteínas y d) factibilidad de realización (15,27,41,70).

Los procedimientos de fraccionamiento preliminar consisten en la eliminación de ácidos nucleicos y proteínas contaminantes, estas interfieren con purificaciones y extracciones subsecuentes. Pueden fraccionarse las proteínas reduciendo su solubilidad

hasta que precipiten por: a) adicionar sales inorgánicas con alta fuerza iónica al medio, lo que permite que las proteínas precipiten y b) adicionando solventes orgánicos a bajas temperaturas (- 5°C).

Los métodos de alta resolución para la purificación de proteínas son muy variados y específicos. Las características fisicoquímicas que se consideran para la purificación final son: anfoéresis de los electrolitos, solubilidad, coeficiente de partición, tamaño molecular, adsorción - desorción y propiedades químicas. La utilización de membranas se basa en la capacidad de algunos polímeros para seleccionar entre moléculas según el tamaño y/o composición química. Se pueden separar componentes con ayuda de membranas por : a) acción de la concentración (pervaporación (diálisis) y ósmosis), b) acción de un campo eléctrico (electrodiálisis y electroósmosis) y c) acción de presión (ultrafiltración y ósmosis) (73)

Las enzimas son algunos de los productos más importantes de los actinomicetos. Actualmente las enzimas de origen microbiano son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, textil, química, farmacéutica, terapia médica, química biorgánica, y biología molecular. Son de interés adicional las enzimas que pueden estar relacionadas con la patogenicidad de los actinomicetos (81) .

Aunque los mecanismos exactos de patogenicidad de *Nocardia* no se conocen, numerosos compuestos muestran la capacidad de estos microorganismos para invadir al huésped y causar enfermedad, pueden ser controlados por componentes asociados con la célula bacteriana. *Nocardia* posee una envoltura celular compleja y algunos

componentes pueden estar involucrados en el mecanismo de patogenicidad tales como: superóxido dismutasa, catalasa, proteasas, fosfatasas, lipasas, hemolisinas, dismutasa, ácidos micólicos y otros compuestos (81)

1.1.4. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS

Zlotnik Hinda y cols. (1984), purificaron y caracterizaron parcialmente proteasas extracelulares de *N. brasiliensis*, ésta fue cultivada en un medio a base de: Glucosa 1.0%, neopeptona 0.2%, extracto de levadura 0.05%, KH_2PO_4 0.68%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, FeSO_4 0.001%, MnSO_4 0.001%, CoSO_4 0.0005%, se incubaron a 30°C en agitación, la actividad proteolítica fue determinada usando una solución de 1.0% de caseína. Esta enzima fue purificada del homogeneizado libre de células de *N. brasiliensis*, se purificaron por cromatografía de intercambio iónico sobre carboximetil-Cefarosa filtración en gel sobre Sefadex G-100 y cromatografía por afinidad usando resina de hemoglobina-Sefarosa. El peso molecular de la proteasa de *N. brasiliensis* fue de 25,000 por filtración en gel y de 35,000 por electroforesis en gel con dodecil sulfato sódico. Las enzimas fueron inhibidas por α -fenantrolina y 8-hidroxiquinolina-5-acido sulfónico y no son afectadas por EDTA. Los parámetros cinéticos fueron V_{max} 0.288 μmol . de hemoglobina solubilizada por min. por mg de enzima y K_m 0.76 mM, usando hemoglobina como substrato (101).

Tsuboi R. y cols. (1989), cultivaron aislados clínicos de *N. asteroides* y *N. brasiliensis* en medio líquido con nitrógeno restringido e investigaron la correlación entre la

producción de la proteasa extracelular y la patogenicidad de las especies del género *Nocardia*. Para comparar la producción de proteasa utilizaron dos medios de cultivo: uno constituido por: peptona 1.0%, glucosa 2.0% el segundo constituido por: levadura 1.2%, albúmina de suero de bovino 0.5%, inositol 0.001% tiamina, 0.001 piridoxina, se incubaron a 37°C a 80 r.p.m. por 6 días. La proteinasa fue determinada utilizando azocoll como sustrato, se incubó por 2 h. a 37°C (520 nm). En el medio de cultivo restringido en nitrógeno, solo las cepas capaces de producir proteinasas extracelulares sobrevivieron y se multiplicaron por rompimiento de la albúmina; las cepas provenientes de nocardiosis cutánea primaria sin enfermedad sistémica, mostraron alta actividad proteinasa y abundante crecimiento celular, produjeron la enfermedad sistémica, hay una probabilidad que una proteinasa extracelular trabaje como un factor de virulencia como se ha encontrado ser el caso con *C. albicans*. Sin embargo, considerando que la producción de proteasa no se observó en un medio suplementado con peptona la producción de proteasa extracelular en un medio nitrógeno restringido puede ser esencial (92).

Salinas y cols. (1992), identificaron proteasas intracelulares de *N. brasiliensis*, de un extracto celular obtenido, por cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) a 37°C por 7 días sin agitación, fueron preparadas y resueltas en un gel de electroforesis 12p. 100 poliacrilamina no reducida. Se determinó la presencia de proteasas en un gel conteniendo caseína como sustrato incubado a 37°C (zymograma), estas fueron inhibidas por fenilmetilsulfonilfluorido y p-hidroximercuribenzoato. Iodoacetato y 2-mercaptoetanol afectaron levemente dos de estas enzimas y EDTA tuvo efecto de inhibición parcial y 2,2' dipiridil no mostró efecto. Proteasas similares no se

encontraron en filtrados del cultivo ni en extractos celulares de *N. asteroides*. También se estudió el posible papel de las proteasas descritas en este estudio de patogenicidad. (77)

Colón L. y cols. (1992), realizaron una purificación parcial de la fosfatasa ácida producida por *N. brasiliensis*, la cual contribuye a la patogenicidad en humanos y animales, *N. brasiliensis* se produjo en un medio de cultivo líquido Sabouraud dextrosa a 37°C a 150 r.p.m. por 8 - 10 días, la biomasa fue recuperada por filtración usando membranas de nitrocelulosa de 0.8 µm., esta actividad está relacionada con dos formas enzimáticas, diferenciadas por electroforesis nativa en gel; una fue parcialmente purificada y caracterizada, se le determinó su peso molecular sobre SDS-PAGE de 50 kDa a pH óptimo de 5.2 y un valor de Km de 1.25 mM para nitorfenilfosfato. Las enzimas de *N. brasiliensis* fueron estables a 4°C por 24 h. y rápidamente inactivadas a 60°C. El molibdato de amonio, fluoruro de sodio y L (+) tartrato fueron potentes inhibidores de la enzima. Sin embargo, su función hasta hoy es desconocida, por analogía con otros sistemas bacterianos se considera que juega un papel importante en la fisiología y patología del microorganismo. (20).

Nesbit y cols. (1993), determinaron la influencia de las condiciones de cultivo sobre la actividad lipolítica en *N. asteroides*. El máximo crecimiento y actividades extracelular e intracelular se presentan a los tres días después de la inoculación. Entre los medios probados; los medios sintéticos inducen máximo crecimiento (6.2 g/L) y actividad extracelular (97 nkat /L) (1U = 16.67 nkat), sin embargo soya - tripticasa

induce máxima actividad de lipasa intracelular (283 nkat/g). Las mejores fuentes de carbono y nitrógeno fueron glucosa y fructosa, glutamato y nitratos, respectivamente. La óptima relación C:N para el crecimiento fue en el rango 1:4 a 2:3 y para la actividad lipasa 2:3 a 3:2. Los resultados de crecimiento, actividad lipasa intracelular y extracelular para *N. asteroides*, *N. brasilinsis* y *N. caviae* son : 6.4 g/L, 270 nkat /g. 96 nkat /L ; 3.7 g/L, 115 nkat /g, 41 ; y 5.3 g/L, 82 nkat/g 35 nkat /L respectivamente, bajo las condiciones de estudio, *N. asteroides* crece mas y con mayor actividad lipasa que *N. brasiliensis* y *N. caviae* . (68).

Minut T. y cols. (1995) , utilizaron un sistema acuoso de dos fases con el detergente no iónico polioxietilen C12EO5 para la solubilización directa y extracción de la colesterol oxidasa unida a la membrana de cultivos de *N. rhodochrous* (NCIB 10554), para la fermentación se utilizó el medio de cultivo constituido de: extracto de levadura 1.0%, extracto de malta 1.0% (mezcla de extracto malta, maltosa, extracto de levadura y dextrosa), glucosa 0.4%, K₂HPO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.07%, en un fermentador de 10 L con un volumen de trabajo de 6 L, la presión del oxígeno fue ajustada a 12%, a 30°C y 550 r.p.m. y pH 6.9 ± 0.2, por adición de NaOH 2N y NH₃PO₄ 3N, se obtuvo una concentración final de 7.2 g/L células secas o 3% peso húmedo, para determinar las condiciones óptimas de la fermentación se determinaron concentración de biomasa y detergente también como varios agentes adicionales para la solubilización y estabilización proteica. (64)

1.1.5. RESPUESTA INMUNE

La estructura básica de la pared celular de las nocardias además de lípidos, péptidos sensibles a proteasas, pigmentos y polisacáridos neutros, tiene tres componentes en común con las micobacterias que son: peptidoglicana, arabinogalactosa y ácidos micólicos, mostrando respuesta cruzada con antígenos de otros actinomicetos. El estudio de los antígenos de *Nocardia* y las reacciones serológicas que se han desarrollado están enfocadas principalmente a la diferenciación taxonómica de *Nocardia* para el diagnóstico de la nocardiosis (55,80)

Salinas y cols. (1992), midieron la respuesta a los anticuerpos de antígenos contra *N. brasiliensis* en el hombre y obtuvieron un extracto crudo de *N. brasiliensis* cultivadas en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) a 37°C por 7 días sin agitación, presentaron 37 bandas las cuales fueron resueltas en un sistema discontinuo de Laemmli en gradiente SDS-PAGE. En el análisis Western blot el suero de 16 individuos infectados con *N. brasiliensis* reconocía 6 bandas de 61, 49, 45, 42, 26, y 24 kDa. Algunas otras bandas también se detectan con menor intensidad. Los sueros de pacientes inmunizados BCG contra *M. tuberculosis* y *M. leprae* reaccionaron fuertemente con las bandas 49, 45, y 42 kDa pero débilmente o sin reacción con las bandas 61, 26 y 24 kDa. Los sueros de voluntarios sanos empleados como control reaccionaron con algunas bandas ligeramente pero no con estas tres identificadas para los sueros con micetoma. Estos tres antígenos inmunodominantes (61, 26 y 24 kDa), pueden ser de valor clínico para el serodiagnóstico de micetoma por *N. brasiliensis*. (79). Estos mismos autores (1993) desarrollaron una técnica inmunoenzimática (ELISA), para el diagnóstico de *N. brasiliensis* así como para buscar la correlación

clínica con infecciones con micetoma y purificaron 2 antígenos inmunodominantes que correspondieron a 26 y 24 kDa (78).

Licon-Trillo y cols. (1997), estudiaron la inmunogenicidad de las proteasas de *N. brasiliensis* y su efecto inductor de producción en el micetoma experimental en ratones BALB/c, las proteasas se aislaron a partir de extractos celulares crudos de *N. brasiliensis*, cultivadas en caldo de infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C por 7 días sin agitación, en columnas de DEAE-celulosa; posteriormente se purificaron por electroelución en geles preparativos de poliacrilamida. La inmunogenicidad de una proteasa de 42 kDa en condiciones nativas o 38 kDa en condiciones desnaturizantes en ratones BALB/c, se determinó midiendo la respuesta de anticuerpos en el suero de los ratones, mediante un ensayo de ELISA contra la enzima. El posible efecto protector de la proteasa fue determinado en experimentos de inmunización activa y pasiva en los ratones los cuales fueron infectados en el cojinete plantar y la inmunoprotección fue evaluada macroscópicamente y mediante el mismo ensayo de ELISA hasta 150 días postinfección. La proteasa aislada con un grado de pureza de 60.9, con una masa molecular de 42 kDa en condiciones nativas y de 38 kDa bajo condiciones desnaturizantes. Esta enzima caracterizada como serina proteasa, mostró un pI de 5.2, resultó ser inmunogénica para ratones BALB/c. La respuesta inmune mostrada contra la proteasa, modifica el desarrollo de micetomas experimentales en los ratones. La inmunización activa de los ratones como emulsión de proteasa-AIF previno en un 100% el desarrollo de actinomicetoma. La inmunización pasiva de los ratones con sueros inmunes recolectados a los 30 días postinmunización con suero de 60 días no confirió protección (55).

1.3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar los requerimientos nutricionales, las condiciones físicas, químicas y biológicas para el desarrollo óptimo en escala piloto de *N. brasiliensis* HUJEG-1 y la producción de proteasas caseinolíticas intracelulares.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Diseñar un medio de cultivo para la producción de biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con óptimos coeficientes de rendimiento a nivel matraz.
- 2.- Determinar las condiciones óptimas para la producción de biomasa y proteasas caseinolíticas de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a nivel matraz
- 3.- Producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasas caseinolíticas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. ORIGEN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron adquiridos en las casas comerciales: Arancia Ingredientes Especiales (Arancia S.A. de C.V., Monterrey, Nuevo León), Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond CA. Suecia), Difco (Difco Laboratories, Detroit MI. EUA), Merck (Merck México S.A.), Monterrey (Productos Químicos Monterrey S.A.) y Sigma (Sigma Chemical Co. St Louis Mo., EUA).

2.2. MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa *N. brasiliensis* HUJEG-1, se aisló de un paciente con micetoma dorsal en el Hospital Universitario José Eleuterio González de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Fue identificada por pruebas bioquímicas por Manuel Rodríguez Quintanilla y confirmada por June Brown en el Centro de Enfermedades Infecciosas en Atlanta Ga., EUA, registrada por Mario César Salinas Carmona en el ATTC con el No. 700358.

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

2.3.1. MEDIO DE CULTIVO PARA EL MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

La cepa se conservó en medio sólido infusión-cerebro-corazón (BHI) (Difco) mediante resiembras periódicas a temperatura ambiente y en refrigeración a 4°C cubierta con una capa de aceite mineral estéril (32,77,78,79,83)

2.3.2.- DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO Y LAS CONDICIONES FISICOQUÍMICAS PARA PRODUCCIÓN DE *N. brasiliensis* HUJEG - 1 A NIVEL MATRAZ.

Se diseñaron diferentes medios de cultivo cuya formulación se presenta en la Tabla No. 4, en los cuales se probaron diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales. En los medios de cultivo que presentaron mayor peso seco, se realizaron modificaciones en la fuente de nitrógeno, debido a que los medios que contenían harina de soya y levadura entera, resultaron parcialmente insolubles, dando rendimientos mayores, se probaron diferentes métodos físicos (hidrólisis, decantación, filtración, centrifugación, hidrolizado y centrifugado) en los medios de cultivo No. 4 y 6, la ruptura de la célula *Sacharomyces cerevisiae* se realizó por calentamiento, congelación, descongelación y filtración del medio de cultivo No. 5, a estos medios se les denominó medios modificados, se seleccionó el medio de cultivo que presentó mayores valores en peso seco, contenido de proteínas totales, actividad caseinolítica, mayor solubilidad y menor costo de operación y producción, se probaron diferentes presentaciones comerciales de la fuente de nitrógeno que presentaran mayor solubilidad y menor costo.

Tabla No. 4

Composición de los medios de cultivo para la producción de
N. brasiliensis HUJEG-1

Componente g/ L	M - 1	M - 2	M - 3	M - 4	M - 5	M - 6
Glicerol			10.0			50.0
Glucosa	5.0	15.0		20.0	30.0	
Almidón			10.0			
Harina de soya				10.		30.0
Proteosa peptona	10.0					
Infusión de corazón	5.0					
Infusión de cerebro	12.5					
Peptona de carne					20.0	
Levadura entera					5.0	
Asparagina		5.0				
Hidrolizado de caseína		2.0				
Extracto de levadura				1.0		
Acido cítrico		1.5				
Caseína			0.3			
NaCl	5.0		2.0		5.0	
Na ₂ HPO ₄	2.5		2.0			
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.5	0.1			
K ₂ SO ₄ · 7H ₂ O		0.5				
K ₂ SO ₄						
CaCO ₃			0.02	1.0	1.0	1.0
pH	7.4	7.2	7.0	7.0	7.0	7.0

Aquel medio de cultivo que presentó mayores rendimientos a menor costo de operación y producción a 37°C y 200 r.p.m. y se determinó el rendimiento bajo diferentes condiciones de agitación y temperatura: 150 r.p.m. y 250 r.p.m. ambas a 30°C y 37°C, Estas condiciones se determinaron a nivel matraz por quintuplicado, se seleccionaron las condiciones que presentaron mayor producción de biomasa del microorganismo para ser transferidas a la producción a nivel fermentador .

Se utilizó el medio de cultivo denominado No. 5C- 4, el cual está constituido de glucosa 4%, peptona de colágena 4%, extracto de levadura 0.5%, cloruro de sodio 0.5%, carbonato de calcio 0.01% ajustados a pH 7.0 y se eligieron aquellas condiciones que presentaron mayor rendimiento.

2.4. ESTERILIZACIÓN.

2.4.1 LA ESTERILIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO A NIVEL MATRAZ, ÁCIDOS, BASES Y ANTIESPUMANTE.

Se realizó por calor húmedo a temperatura de 121 °C y una presión de 15 lb/pulg², durante un periodo de 15 min. Los medios que contienen glucosa, se solubilizaron en agua y la solución fue esterilizada por filtración con filtros de membrana de poro 0.2 µm, también se utilizó calor húmedo a las mismas condiciones de presión y temperatura por 10 min a nivel fermentador se utilizó calor húmedo a las mismas condiciones de presión y temperatura (52,72,73,87).

2.4.2. MATERIAL DE VIDRIO Y FILTROS DE AIRE.

Este se esterilizó por calor seco a 180 °C por 2h (52,72,73).

2.4.3. AIRE.

Se esterilizó por filtración, se hizo pasar el aire por filtros empacados con fibra de vidrio o lana mineral a presión, hasta lograr una velocidad de flujo de 1.0 VVM y con filtros de membrana de poro 0.2 μm (52,72,73).

2.5. PREPARACIÓN DE INÓCULO O SEMILLA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

2.5.1. PREPARACIÓN DE INÓCULO A NIVEL MATRAZ.

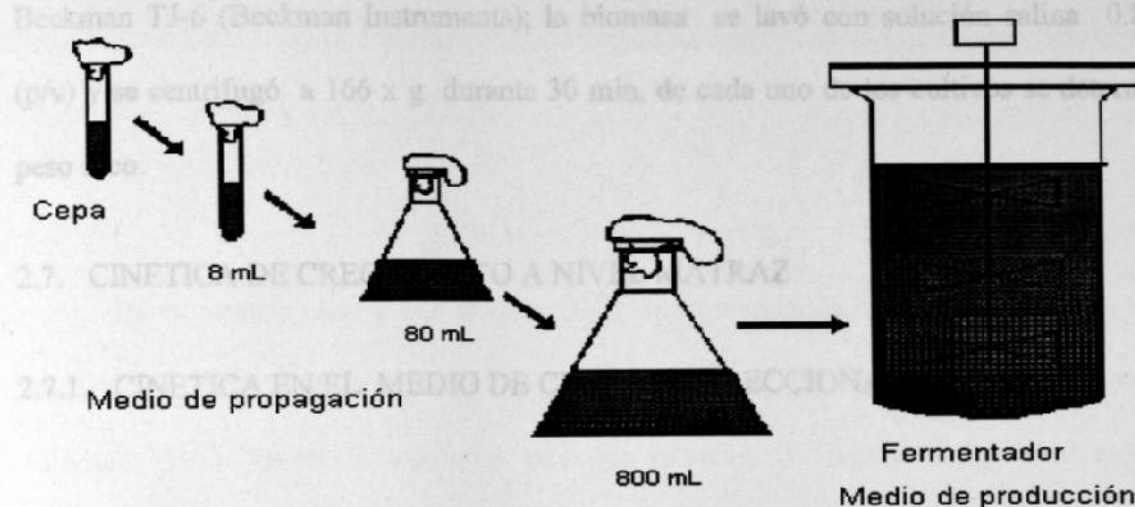
A partir de cultivos de *N. brasiliensis* en placa en BHI (infusión cerebro-corazón) se transfirió una asada de biomasa a matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 mL de caldo BHI se mantuvo en una incubadora con agitación giratoria a 200 r.p.m. durante 48 h a 37°C (New Brunswick Scientific Co. Inc.), los cultivos se colocaron en tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 166 x g durante 10 min en una centrifuga Beckman TJ-6 (Beckman Instruments); la biomasa se lavó con solución salina 0.85% (p/v) y se centrifugó a 166 x g durante 10 min por 2 veces , la biomasa fue transferida a un homogenizador Potter-Elevehem, la suspensión unicelular bacteriana fue utilizada como inóculo de los diferentes medios de cultivo en estudio (a nivel matraz.).

2.5.2. PREPARACIÓN DE INÓCULO A NIVEL FERMENTADOR.

De la suspensión obtenida en el punto anterior se inocularon matraces conteniendo 80 mL del medio de cultivo seleccionado para la producción a nivel fermentador , para obtener 10 % v/v del volumen de trabajo del fermentador 8 L, se incubó a 30°C a 250 r.p.m.

r.p.m. durante 72 h (fase Log), el cual es utilizado como inóculo para el fermentador (Figura No. 4) (38,73,91)

biomasa del medio de cultivo y productos celulares para la purificación del producto destilado. Los contenidos de los matraces fueron transferidos a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a $166 \times g$ durante 30 min en una centrífuga Beckman TJ-6 (Beckman Instruments); la biomasa se lavó con solución salina 0.85% (p/v) se centrifugó a $166 \times g$ durante 30 min. de cada uno



En el punto anterior para la producción de biomasa de *N. brasiliensis*. Se tomaron muestras cada 12 h (las primeras 48 h), y cada 8 h posteriormente (56 - 144 h), se realizó el proceso durante 6 días. Estas muestras fueron congeladas y se realizaron las siguientes

Figura No. 4 Escalamiento de la obtención de inóculo para la producción de biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1

de proteína (caseinólítica) y pH. Estos parámetros nos permitieron determinar el

2.6. OBTENCIÓN DE LA BIOMASA A NIVEL MATRAZ DE *Nocardia brasiliensis*

coeficiente de rendimiento, tiempo de generación y velocidad de crecimiento para la

2.6.1. BIOMASA A NIVEL MATRAZ.

Se inocularon 5 matraces Erlenmeyer conteniendo 50 mL con los diferentes medios de cultivo en estudio cuya composición se muestra en la Tabla No. 8, con 0.2 mL del inóculo previamente preparado (6×10^7 UFC 0.02 g peso seco), se incubó con agitación a 200 r.p.m. y 37°C durante un periodo de 6 días (New Brunswick Scientific Co. Inc.)

De la cosecha celular que se obtuvo en la fermentación a nivel matraz, se depositaron los 50 mL del cultivo en tubos cónicos previamente tarados y marcados, se

Recuperación de la biomasa a nivel matraz, terminado el proceso de fermentación fue necesario separar la biomasa del medio de cultivo y productos celulares para la purificación del producto deseado. Los contenidos de los matraces fueron transferidos a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugaron a 166 x g durante 30 min en una centrífuga Beckman TJ-6 (Beckman Instruments); la biomasa se lavó con solución salina 0.85% (p/v) y se centrifugó a 166 x g durante 30 min, de cada uno de los cultivos se determinó peso seco.

2.7. CINÉTICA DE CRECIMIENTO A NIVEL MATRAZ

2.7.1. CINÉTICA EN EL MEDIO DE CULTIVO SELECCIONADO.

En el punto anterior para la producción de biomasa de *N. brasiliensis*. Se tomaron muestras cada 12 h (las primeras 48 h), y cada 8 h posteriormente (56 – 144 h), se realizó el proceso durante 6 días. Estas muestras fueron congeladas y se realizaron las siguientes determinaciones: Azúcares reductores, peso seco, contenido de proteínas totales, actividad de proteasa (caseinolítica) y pH. Estos parámetros nos permitieron determinar el coeficiente de rendimiento, tiempo de generación y velocidad de crecimiento para la fermentación (4,16,56,86)

2.7.2. PESO HÚMEDO.

De la cosecha celular que se obtuvo en la fermentación a nivel matraz, se depositaron los 50 mL del cultivo en tubos cónicos previamente tarados y marcados, se

centrifugaron a 166 x g por 30 min. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos y se conservaron en congelación, la biomasa se lavó con agua destilada y se centrifugó a 166 x g por 30 min se decantó hasta eliminar todo el sobrenadante y se pesó en una balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg (Sartorius Mod. 2842), se determinó la diferencia en peso de los tubos, obteniendo el peso húmedo celular por litro de medio de cultivo (73).

2.7.3. PESO SECO.

De la cosecha celular que se obtuvo en la fermentación a nivel matraz en el punto anterior, los tubos se llevaron a una estufa de secado a 105°C a peso constante, se colocaron los tubos en un desecador para que se enfriaran y finalmente se pesaron en una balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg (Sartorius Mod. 2842), se determinó la diferencia en peso de los tubos, obteniendo el peso seco celular por litro de medio de cultivo. (35,73).

2.7.4. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES.

De las muestras tomadas durante el transcurso de la fermentación que se almacenaron a - 4°C, las cuales fueron descongeladas posteriormente, se determinaron los azúcares reductores por el método DNS (32,90). Primeramente se realizó una curva de calibración con una solución estándar de glucosa (10 µM). Las soluciones patrón se prepararon a una concentración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 µM.

Contenido de azúcares reductores. Se realizaron las siguientes diluciones de las muestras 1:10, 1:20, 1:50 y 1:100, a cada dilución se le adicionó 1mL del reactivo 3, 5 DNS, se llevó a ebullición por 5 min e inmediatamente después se pasaron a baño de agua – hielo, posteriormente se adicionaron 2 mL de agua fría y se agitó y se tomaron lecturas a 540 nm.

2.7.5. pH.

A las muestras de las cuales se separó la biomasa se les determinó el pH con un potenciómetro, previamente calibrado (Beckman OHMS 50 pH meter).

2.7.6. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ) Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN (t_d).

El tiempo de duplicación (t_d) se obtiene de dos puntos en la cinética de crecimiento (μ) donde la biomasa se duplica, con estos datos se obtiene la velocidad de crecimiento a partir de la siguiente fórmula:

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

2.8. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO CELULAR.

Los coeficientes de rendimiento celular en base al substrato ($Y_{x/s}$) fueron determinados por la relación de la biomasa celular y el consumo de azúcares reductores.

(73)

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimiento en base a sustrato (g células secas/g sustrato)

X = Concentración final de biomasa celular (g/L)

X_0 = Concentración inicial de biomasa celular (g/L)

S_0 = Concentración inicial de azúcares reductores (g/L)

S = Concentración final de azúcares reductores (g/L)

2.9. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1

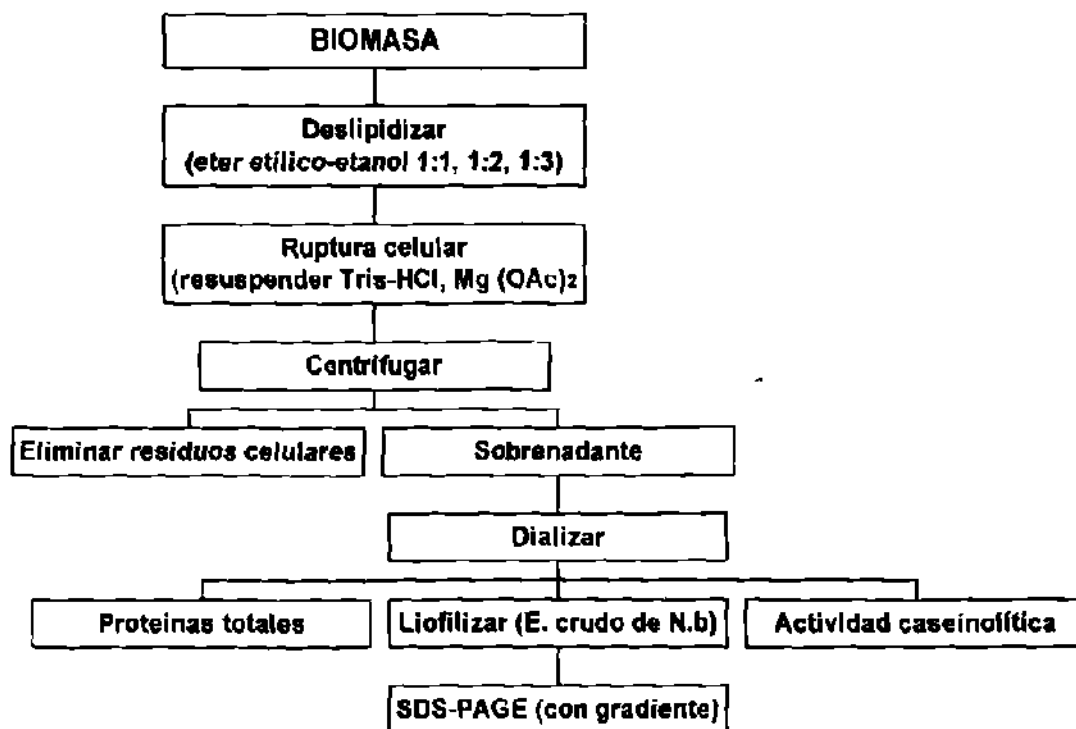


Figura No. 5 Obtención del extracto celular de *N. brasiliensis* HUJEG-1

2.9.1. ELIMINACIÓN DE LÍPIDOS DE LA CÉLULA BACTERIANA DE *N. brasiliensis* HUJEG -1

La biomasa húmeda se transfirió a un vaso de precipitado de 100 mL para eliminar los lípidos; se le adicionó un volumen de aprox. 15 mL de una solución de alcohol etílico - éter etílico (1:1) y cubrieron con papel aluminio para evitar pérdida por evaporación, se mantuvo en agitación por 10 min en la campana de extracción, posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta serológica, se repite el proceso anterior hasta que la biomasa pierde la coloración amarilla, se repite el proceso con una solución de alcohol etílico - éter etílico (1:2) por dos veces y una siguiente extracción con una solución de alcohol etílico - éter etílico (1:3) por una sola ocasión; el material deslipidizado se dejó en la campana de extracción durante toda la noche hasta evaporar todo el solvente de la extracción.

2.9.2 RUPTURA CELULAR DE:

2.9.2.1. CORTE SÓLIDO.

Se colocó el material deslipidizado y seco de cada medio estudiado en un mortero con una porción igual de perlas de vidrio de 1 – 2 mm y se trituró durante un periodo de 20 min, la mezcla se transfirió a un vaso precipitado de 100 mL y se le adicionó 15 - 20 mL de amortiguador de extracción Tris-HCl 0.01M, pH 7.4, éste fue colocado en un agitador magnético a 4°C durante 18 h (Stir Plate Sybron /Termolyne Nuova II); después de este periodo de extracción la mezcla se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 600

2.9.1. ELIMINACIÓN DE LÍPIDOS DE LA CÉLULA BACTERIANA DE *N. brasiliensis* HUJEG -1

La biomasa húmeda se transfirió a un vaso de precipitado de 100 mL para eliminar los lípidos; se le adicionó un volumen de aprox. 15 mL de una solución de alcohol etílico - éter etílico (1:1) y cubrieron con papel aluminio para evitar pérdida por evaporación, se mantuvo en agitación por 10 min en la campana de extracción, posteriormente se retiró cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta serológica, se repite el proceso anterior hasta que la biomasa pierde la coloración amarilla, se repite el proceso con una solución de alcohol etílico - éter etílico (1 :2) por dos veces y una siguiente extracción con una solución de alcohol etílico - éter etílico (1 :3) por una sola ocasión; el material deslipidizado se dejó en la campana de extracción durante toda la noche hasta evaporar todo el solvente de la extracción.

2.9.2 RUPTURA CELULAR DE:

2.9.2.1. CORTE SÓLIDO.

Se colocó el material deslipidizado y seco de cada medio estudiado en un mortero con una porción igual de perlas de vidrio de 1 – 2 mm y se trituró durante un periodo de 20 min, la mezcla se transfirió a un vaso precipitado de 100 mL y se le adicionó 15 - 20 mL de amortiguador de extracción Tris-HCl 0.01M, pH 7.4, éste fue colocado en un agitador magnético a 4°C durante 18 h (Stir Plate Sybron /Termolyne Nuova II); después de este periodo de extracción la mezcla se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 600

x g durante 30 min para empaquetar las perlas de vidrio y el material celular, el sobrenadante se separó y se realizó otra centrifugación a 1 600 x g durante 90 min , el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro Millipore de 0.22 μ m de diámetro de poro.

2.9.2.1. CORTE LÍQUIDO

Se colocó el material deslipidizado y seco de cada medio estudiado (por quintuplicado) en un vial de poliestireno y se adicionaron 15 - 20 mL de solución amortiguadora Tris 0.01M, pH 7.4 con acetato de magnesio tetrahidratado 0.01M en una proporción de 10% (p/v), esta se colocó en baño de hielo. La suspensión se sonicó en un Aparato Biosonik Modelo 250/450 Sonifer (Bronwill Scientific, Rochester, N.Y.) en 6 intervalos de 5 min, a una intensidad de la punta de titanio de 60%, posteriormente la suspensión se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 1 600 x g durante 90 min , para separar el material celular, el sobrenadante se separó y se hizo pasar a través de un filtro Millipore de 0.22 μ m de diámetro de poro.

La solución obtenida por ambos métodos se separó en alícuotas y se determinó el contenido de proteínas totales y la actividad caseinolítica de cada extracto, al que presentó mayor contenido de proteínas totales y mayor actividad caseinolítica se le corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil-sulfato de sodio (SDS), para comparar el patrón de proteínas obtenidas en el medio de cultivo de referencia (BHI) y el medio de cultivo en estudio que es el 5C-4.

2.10. DETERMINACION DE PROTEINAS. MÉTODO DE BRADFORD

2.10.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNAS .

Se utilizó una solución estándar de albúmina sérica bovina (1 mg/mL). Las soluciones patrón se prepararon a una concentración de 2, 6, 10, 14 y 18 µg/mL.

2.10.2. CONTENIDO DE PROTEÍNAS.

De los extractos obtenidos, primeramente se realizó dilución de las muestras a concentraciones adecuadas (0.25 mL), se adicionó 0.25 mL del reactivo de Bradford (6 mg de azul de Coomassie G-250 en 100 mL de ácido perclórico al 3% v/v en agua destilada) se incubó a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 595 nm en un Espectrofotómetro DU-6 (Beckman Instruments) (13,15,69)

2.11. ANALISIS DEL EXTRACTO CELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG – 1

2.11.1 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS -PAGE).

Para el estudio de las proteínas presentes, se utilizó el sistema discontinuo de Laemmli con un gel de empaquetamiento al 5% T, 2.7% C (2) y geles de corrimiento en gradiente 10 - 18% T, 2.7% C (1). El gel se preparó en un Sistema de Electroforesis Mini-Protean II (BIO-RAD) y una bomba peristáltica Microperpex 2132 (LKB). Primero se colocó el gel de corrimiento, se le adicionó agua destilada sobre la superficie para formar una interfase,

se secó con papel filtro y se colocó un peine de teflón con los carriles deseados y se agregó el gel de empaquetamiento, se dejó polimerizar durante una hora, posteriormente se sacó el peine y se lavaron los pozos con agua destilada, se colocó en la cámara de corrimiento el amortiguador (Tris-HCl 125 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.1% p/v). El gel se recorrió a 50 V por 20 min con una fuente de poder modelo 1 000 /500 (BIO-RAD), las muestras fueron previamente tratadas con amortiguador de muestra 4X Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% p/v, sacarosa al 50% p/v, con azul de bromofenol como indicador de frente de corrida), se llevaron a ebullición durante 2 min ; posteriormente las muestras se aplicaron en los carriles previamente marcados con el peine de teflón. Se corrió la electroforesis a 80 V hasta que el frente de corrida alcanzó el gel de corrimiento, incrementando el voltaje a 150 V hasta que el indicador llegue a la parte inferior del gel (37,61,98)

2.11.2. TINCIÓN DE COOMASSIE

Terminada la electroforesis, se desensamblaron las placas de vidrio, se despegó el gel y se colocó durante 30 min en solución azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 0.1% p/v en solución desteñidora (metanol 40% y ácido acético 10% v/v en agua destilada), posteriormente el gel fue desteñido durante 1 - 3 h con solución desteñidora. Se secó y se analizaron las bandas obtenidas comparando con los patrones de proteínas de masa molecular conocida, estos fueron corridas bajo las mismas condiciones. (77)

2.11.3. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

Terminada la electroforesis, se desensamblaron las placas de vidrio, se despegó gel y se colocó durante 20 min en una solución fijadora (metanol 50% y ácido acético 12% v/v en agua destilada), posteriormente se lavó 3 veces con solución de lavado (etanol 10% y ácido acético 5% v/v en agua destilada) y se colocó durante 5 minutos con una solución oxidante (dicromato de potasio 3.4 mM, ácido nítrico 3.22 mM) con agitación suave, se lavó 3 veces con agua destilada durante 10 min ; posteriormente el gel se colocó durante 5 min a la luz intensa y 25 min a la luz normal en una solución de nitrato de plata 12 mM. Las bandas se visualizaron con solución reveladora (carbonato de sodio 0.28M y formaldehído al 0.055 v/v), se detuvo la reacción con ácido acético al 1% se secó y se analizaron las bandas obtenidas comparando con los patrones de proteínas de masa molecular conocida, estos fueron corridas bajo las mismas condiciones. (55,61)

2.11.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PROTEASAS

2.11.4.1. TÉCNICA DE Mc LAUGHLIN Y FAUBERT

Se colocaron 50 µl del extracto celular crudo con 50 µl de amortiguador Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 0.01 M, pH 7.4 y se llevó a 37°C con agitación por unos min, posteriormente se adicionaron 100 µl de caseína al 1% de la solución amortiguadora (Merck), se incubó la mezcla a 37°C por 20 min , posteriormente se añadieron 250 µl de TCA al 10% (ácido tricloroacético) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, para precipitar aquellas proteínas que no fueron hidrolizadas enzimáticamente; después se centrifugó a 166 x g

durante 10 min en un centrifuga Beckman TJ-6 (Beckman Instruments), del sobrenadante se tomaron 100 μ l y se pusieron en contacto con 900 μ l de NaOH 0.05 N. y se realizó la lectura a 280 nm en un Espectrofotómetro DU-6 (Beckman Instruments), se midió la absorbancia con un blanco de reactivos y se corrió un control positivo de actividad caseinolítica , se utilizó tripsina al 0.2% (1010 unidades BAEE, Difco) (1 Unidad BAEE = ΔA_{253} de 0.001 unidades de absorbancia por min en 3.2 mL a pH 7.6 y 25°C) (1, 7,27, 31, 34, 41, 47, 71, 77)

2.11.4.2. TÉCNICA DE MONTVILLE.

Se prepararon cajas petri con 20 mL de una suspensión de 1% de caseína. Previamente hidrolizada en hidróxido de sodio (0.02N), 1% de gelatina y 1.5% de agar-agar ajustando el pH a 7.0 (HCl 1 N), se dejó solidificar y se dividió la caja en cuatro partes, en el centro de cada cuadrante se hizo una horadación con una pipeta Pasteur estéril. En el orificio se colocaron 100 μ l del extracto crudo, se incubó a 30°C por 3, 7 y 24 h y se midió el halo de hidrólisis. El agar en las placas es opaco, al estar presente las proteasas caseinolíticas se hidrolizan las proteínas en el medio de cultivo, formando un halo claro alrededor del orificio, se mide el halo de hidrólisis en cm (70).

2.12. PARÁMETROS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA EN LA FERMENTACIÓN .

2.12.1. CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO.

Se utilizó un electrodo tipo Johnson Borkowsky, construido a base de plomo y plata, se calibró mediante la determinación del cero electrónico y el 100 % mediante la aereación y agitación del medio de cultivo, esta determinación nos permite conocer la actividad de oxígeno y el porcentaje de saturación del gas en el medio de cultivo del fermentador para cumplir la demanda biológica de oxígeno. (5,25,40,60,65)

2.12.2. MEDICIÓN DEL CONSUMO DE ENERGÍA DE MEZCLADO.

Consumo de energía en amperes o watts, haciendo uso de un multímetro en las terminales del motor. Se corrigen pérdidas eléctricas y mecánicas en el motor, en la terminación de los sellos del reactor. (6,66,94)

2.12.3. MEDICIÓN DE TIEMPO DE MEZCLADO.

Se usó un volumen de 6 L de una solución alcalina a base de NaOH 0.1 N, la cual fue colocada en el recipiente del fermentador bajo las condiciones de mezclado seleccionadas, se adició fenolftaleína al 1%, se determinó el tiempo aparición del color rosa. El tiempo en segundos necesario para el viraje se toma como tiempo de mezclado (60,73).

2.12.4. DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOLÓGICA DE OXÍGENO (N_a).

Esta se realizó en la fase exponencial de crecimiento (Método Humphrey, 1967), en esta etapa se eliminó la aereación y prácticamente la agitación, en este momento la

concentración de oxígeno disuelto es consumido por las células presentes y nos indica el requerimiento de oxígeno expresado como N_a en $g O_2 / L MC \times h$.

2.12.5. DETERMINACIÓN DE COEFICIENTE DE RESPIRACIÓN (Q_{O_2}).

Este parámetro se obtiene a partir de la relación entre la demanda biológica de oxígeno (N_a) y la cantidad de células secas presentes por litro de medio de cultivo.

2.12.6. COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO (K_{La})

Este parámetro se obtuvo a partir de la relación de la demanda biológica de oxígeno (N_a) y el gradiente de concentración de oxígeno ($C^*_g - C_L$) que imperó durante la determinación con la presencia de células, obteniendo un coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno $K_{La} = h^{-1}$.

2.13. FERMENTACION

2.13.1. OBTENCIÓN DE BIOMASA A NIVEL PLANTA PILOTO.

Se utilizó un fermentador como el que muestra la Figura No. 8, marca New Brunswick Scientific Co. Inc. Modelo MF-114 de 14 L de capacidad, equipado con sistema de medición y control de: pH, temperatura, oxígeno disuelto, aereación y velocidad de agitación. Las características de construcción del fermentador son Tipo de impulsor:

Turbina tipo Rushton (dos), con 6 Paletas ; Altura promedio del líquido 25 cm ; Diámetro del Tanque 30 cm (26,43,60,63,73,82).

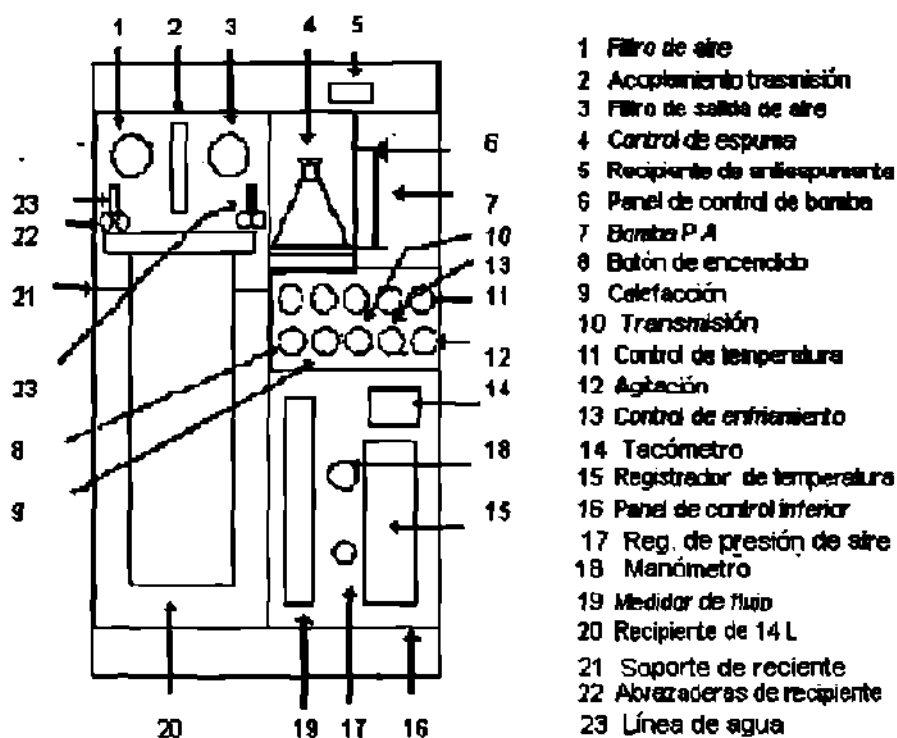


Figura No. 8 Controles del fermentador Modelo M19-1410 New Brunswick Scientific.

Se seleccionó el medio que proporcionó mayor coeficiente de rendimiento y mayor producción de proteasas a nivel matraz, fue el medio denominado 5C- 4, Con este medio se realizó escalamiento a un microfermentador de 14 L de capacidad (New Bruswick Scientific Co.) con un volumen de trabajo de 2 - 11 L. Se colocó en el vaso de

fermentación 8.0 L del medio de cultivo, se esterilizó a 121° a 15 lb/in^2 por un periodo de 15 min, se colocaron las mangueras y el filtro de aire previamente esterilizados en la tapa del fermentador. Antes de iniciar la etapa de fermentación se conectó el potenciómetro ajustándolo con solución buffer de pH conocido, se dejó estabilizar por 10 min, el registrador de temperatura se ajustó a cero con el termopar, se colocó el electrodo de oxígeno en la cavidad correspondiente en la tapa del fermentador ajustando a cero con el sistema galvánico.

2.13.2. CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LA FERMENTACIÓN.

Las condiciones de operación fueron: Velocidad de agitación 250 r.p.m, aereación 1 VVM, pH 7.0 ± 0.3 y temperatura 30°C . Antes de dar inicio al proceso se tomó una muestra para medir los parámetros iniciales. Establecidas las condiciones de operación del fermentador, se adicionó antiespumante y posteriormente se adicionó el inóculo (5-10% v/v.), se tomó una muestra al inicio del proceso y se realizó muestreo del proceso de fermentación cada 12 h (las primeras 48 h) y cada 8 h posteriormente (72 - 96 h), estas muestras fueron almacenadas a -4°C .

2.13.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *N. brasiliensis* HUJEG A NIVEL FERMENTADOR.

Durante el proceso se registró el consumo de oxígeno y pH y se tomaron muestras del medio de la fermentación y se conservaron en congelación. Las muestras que se tomaron durante el transcurso de la fermentación, fueron descongeladas y centrifugadas a

166 X g por 30 min y se realizaron las siguientes determinaciones: Azúcares reductores, peso seco, contenido de proteínas totales, actividad caseinolítica, pH y coeficiente de rendimiento, estos parámetros nos permitieron determinar el coeficiente de rendimiento, tiempo de generación y velocidad de crecimiento para *N. brasiliensis* HUJEG-1.

2.13.4. RECUPERACIÓN DE BIOMASA DEL FERMENTADOR

La biomasa del fermentador se dejó reposar para que sedimentara a 4°C y posteriormente separarla por filtración.

3. RESULTADOS

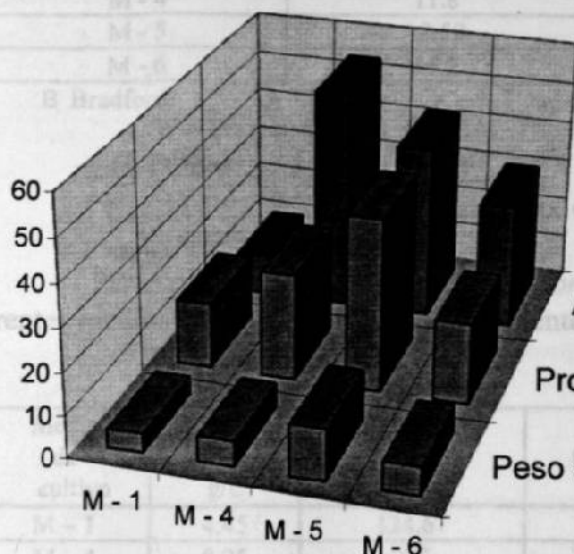
3.1. SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE PESO SECO, PROTEÍNAS TOTALES Y ACTIVIDAD CASEINOLÍTICA A NIVEL MATRAZ.

En la Tabla No. 5 se muestran los resultados obtenidos de estos parámetros en los diferentes medios de cultivo a nivel matraz, los valores de peso seco de los medios 4, 5, y 6 fueron los más altos, el resultado se ve afectado por los componentes insolubles de la harina de soya en los medios 4 y 6 y la levadura entera en el medio 5. Se eliminaron los constituyentes insolubles por diferentes métodos físicos (decantación, filtración, centrifugación, extracción con calor y agitación, y posterior centrifugación), en la Tabla No. 6 y Figura No. 7 solo se muestran los resultados obtenidos por el método de centrifugación, elegido por mayor facilidad para realizarlo, ya que la diferencia no fue significativa entre los valores para los diferentes métodos. Para los datos anteriores se realizó un análisis estadístico que consistió en: 1) Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución de los datos. 2) Kruskal - Wallis ANOVA (un factor) no paramétrica, para k muestras independientes y 3) ANOVA (un factor) para determinar cual es el grupo diferente. Se encontró que no existe diferencia significativa entre los datos del mismo grupo. No hay diferencia significativa entre los datos de los medios No. 1, 2, y 3 y si existe

diferencia significativa entre los datos de los medios No. 4, 5 y 6 respecto al No. 1 (testigo).

Parámetros en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en diferentes medios de cultivo a 37°C / 200 r.p.m.

Medio de cultivo	Peso seco g/L	Proteínas totales ^a ug/ml
M-1	4.50	124.67
M-2	3.19	67.25
M-3	4.9	137.40
M-4	11.8	291.53
M-5		297.53
M-6		272.22



Medios de cultivo	Actividad ^a	Índice de hidrólisis de caseína ^a cm
M-1	98	1.0
M-4	536	7.3
M-5	301	1.5
M-6	420	2.0

3.2. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE *N. brasiliensis* HUJEG-1

Esta se determinó en los diferentes medios de cultivo, a excepción del No. 2, el Figura No. 7 Parámetros en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en los diferentes medios de cultivo, utilizando solamente los componentes hidrosolubles. No. 7 y Figura

No. 8 se muestran los resultados obtenidos de actividad caseinolítica; en el medio de cultivo No. 4, presentó actividad desde las 48 h y el mayor halo de hidrólisis a partir de las 96 h.

Tabla No. 5

Parámetros en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG - 1
en diferentes medios de cultivo a 37°C / 200 r.p.m..

Medio de cultivo	Peso seco g/L	Proteínas totales ^B µg/mL
M - 1	4.50	124.67
M - 2	3.19	67.25
M - 3	4.9	137.40
M - 4	11.8	291.53
M - 5	12.58	297.53
M - 6	35.2	272.22

B Bradford,

Tabla No. 6

Parámetros en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG - 1 en los
diferentes medios de cultivo, utilizando solamente los componentes hidrosolubles.

Medio de cultivo	Peso seco g/L	Proteínas Totales ^B µg/mL	Actividad Caseinolítica ^{MF} UA	Halo de hidrólisis de caseína ^M cm
M - 1	4.45	124.67	98	1.0
M - 4	8.25	255	536	2.5
M - 6	6.75	1192	301	1.5
M - 5	10.28	413	420	2.0

B Bradford MF Mc Laughlin y Faubert M Montville

3.2. PRODUCCIÓN DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE *N. brasiliensis* HUJEG-1

Esta se determinó en los diferentes medios de cultivo, a excepción del No. 2, el cual fue eliminado por bajo rendimiento y alto costo. En la Tabla No. 7 y Figura No. 8 se muestran los resultados obtenidos de actividad caseinolítica; en el medio de cultivo No. 4, presentó actividad desde las 48 h y el mayor halo de hidrólisis a partir de las 96 h.

Tabla No. 7

Producción de enzimas caseinolíticas extracelulares de *N. brasiliensis* HUJEG - 1 en diferente medio de cultivo

Medio de cultivo	Tiempo			
	48 h	96 h	120 h	148 h
M-1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M-3	Negativo	+/-	+/-	+/-
M-4	++	+++	+++	+++
M-5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M-6	+	+	+	+

+/- 0.5 cm + 1.0 cm ++ 1.5 cm +++ 2.0 cm



Figura No. 8 Hidrólisis de los extractos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en los medios de cultivo No. 1, 4, 5 y 6.

3.3. EFECTO DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

El hidrolizado de harina de soya del medio de cultivo No. 4 presentó las siguientes desventajas: alto costo y baja solubilidad que ocasionó el incremento del número de pasos en el proceso, por tal motivo en el medio de cultivo No. 5 se probaron diferentes fuentes de nitrógeno cuya composición se muestra en la Tabla No. 10 En la Tabla No. 11 se muestran los resultados obtenidos con diferentes fuentes de nitrógeno, donde la peptona de colágena presentó mayor contenido de proteínas totales, por lo tal motivo se probaron diferentes proporciones de peptona de colágena, la composición se muestra en la Tabla No. 12 y los resultados se presentan en la Tabla No. 13 y en la Figura No. 11. El medio de cultivo SC - 4 presentó mayor biomasa.

Tabla No. 8

Composición del medio de cultivo No. 5 con diferente fuente de nitrógeno.

Componente g/L	A	B	C
Glucosa	30.0	30.0	30.0
Peptona de carne	7.0		
Hidrolizado de gelatina		20.0	
Peptona de colágena			10.0
Extracto de levadura	5.0	5.0	5.0
NaCl	5.0	5.0	5.0
CaCO ₃	0.1	0.1	0.1
pH	7.0	7.0	7.0

Tabla No. 9

Parámetros determinados en el medio de cultivo No. 5 con diferente fuente de nitrógeno.

Medio de cultivo	Peso seco g/L	Proteínas Totales ^B µg/ml
A (P. carne)	12.46	116.36
B (H. gelatina)	7.18	142.98
C (P. colágena)	10.52	129.50

B Bradford

Tabla No. 10

Modificación en la proporción de peptona de colágeno en el medio de cultivo No -5C.

Componente g/L	C-1	C-2	C-3	C-4
Glucosa	30.0	30.0	30.0	40.0
Peptona de colágena	10.0	20.0	30.0	40.0
Extracto de levadura	5.0	5.0	5.0	5.0
NaCl	5.0	5.0	5.0	5.0
CaCO ₃	0.1	0.1	0.1	0.1
pH	7.0	7.0	7.0	7.0

Tabla No. 11

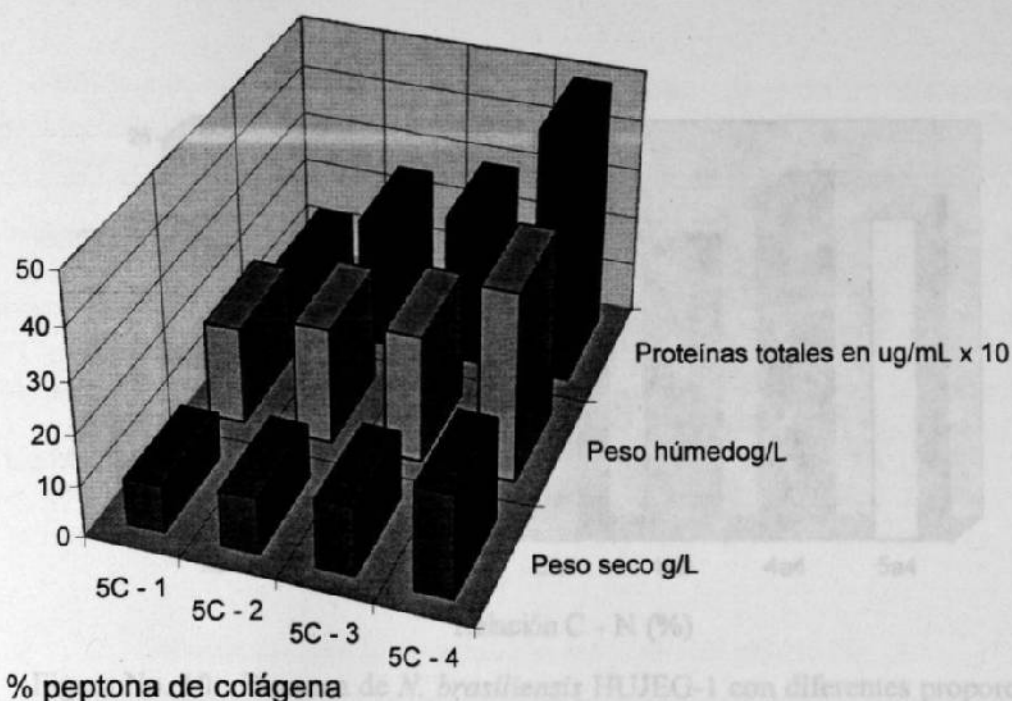
Parámetros determinados en el medio de cultivo No. 5 con diferente proporción de peptona de colágena.

Medio	Peso seco g/L	Peso húmedo g/L	Proteínas Totales ^B µ/ml
5C-1	9.04	19.0	129
5C-2	10.84	22.5	252
5C-3	13.47	25.0	292
5C-4	20.35	37.0	493

B Bradford

relación porcentual de la fuente de carbono (C) (glucosa) en el medio de cultivo No.

5. La óptima relación C - N fue 4 - 4.



de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Tabla No. 12

Figura No. 9 Parámetros en la producción de biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en el medio de cultivo No. 5 a diferentes proporciones de peptona de colágena.

Parámetros en la relación porcentual C-N en el medio de cultivo 5 C en la producción de biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1

Relación	Peso seco	Glucosa
2-1	11.37	0.51
3-1	12.13	0.98
3-3	14.46	0.68
3-4	16.77	0.64
4-3	17.99	0.82

En la Tabla No. 12 y Figura No. 10 se muestran los resultados obtenidos en las diferentes proporciones de la fuente de nitrógeno (N) (peptona de colágena) y la

relación porcentual de la fuente de carbono (C) (glucosa) en el medio de cultivo No.

5. La óptima relación C - N fue 4 - 4. EN EL MEDIO DE CULTIVO NO. 4.

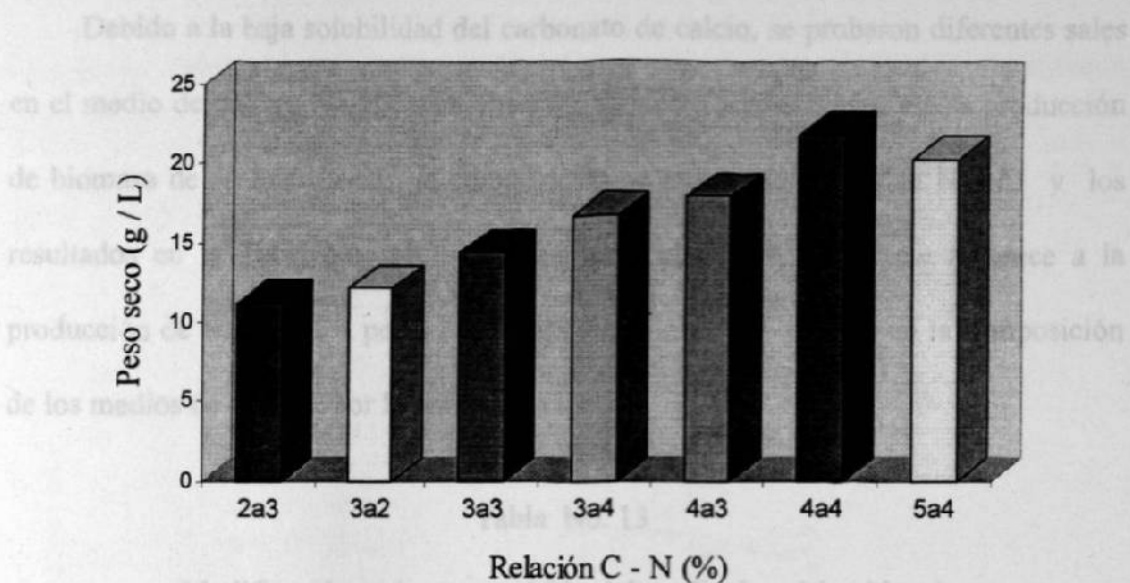


Figura No. 10 Biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 con diferentes proporciones

de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Componente	A	B	C
Glucosa	2.0	2.0	2.0
Hidrolizado de soya	0.1	0.4	0.4
Extracto de levadura	0.3	0.5	0.5
CaCO ₃	0.1		
Na ₂ HPO ₄		0.25	
NaHCO ₃			0.1
pH	7.0	7.0	7.0

Parámetros en la relación porcentual C-N en el medio de cultivo 5 C en la producción de biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG -1

Relación C - N	Peso seco g/L	Glucosa g/L
2 - 2	9.83	0.33
2 - 3	11.27	0.51
3 - 2	12.19	0.98
3 - 3	14.46	0.68
3 - 4	16.77	0.64
4 - 3	17.99	0.82
4 - 4	21.83	2.29
5 - 4	20.33	5.30

3.5. EFECTO DE LAS DIFERENTES SALES EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1 EN EL MEDIO DE CULTIVO NO. 4.

Debido a la baja solubilidad del carbonato de calcio, se probaron diferentes sales en el medio de cultivo No. 4 , para observar su efecto amortiguador en la producción de biomasa de *N. brasiliensis*, la composición se muestra en la Tabla No. 13 y los resultados en la Tabla No. 14, indican que el CaCO_3 es el que favorece a la producción de biomasa. A pesar de su baja solubilidad se conservó en la composición de los medios de cultivo, por lo antes mencionado.

Tabla No. 13

Modificación en la composición del medio de cultivo No. 4

Componente g/100 ml	A	B	C
Glucosa	2.0	2.0	2.0
Hidrolizado de soya	0.4	0.4	0.4
Extracto de levadura	0.5	0.5	0.5
CaCO_3	0.1		
Na_2HPO_4		0.25	
NaHCO_3			0.1
pH	7.0	7.0	7.0

Tabla No. 14

Parámetros determinados en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG - 1 en el medio de cultivo No. 4 con diferentes sales minerales.

Medio de cultivo	Peso seco g/L	Proteínas Totales ^B µg/ml	actividad caseinolítica ^{MF} UA	Halo de hidrólisis de caseína ^M cm
A (CaCO_3)	8.25	537.66	529.5	2.0
B (Na_2HPO_4)	4.84	367.20	384.5	1.6
C (NaHCO_3)	3.05	117.01	270.5	1.0

B Bradford MF Mc Laughlin y Faubert M Montville

3.6. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

En la Tabla No. 15 y Figura No. 11 se muestran los resultados obtenidos a diferentes condiciones de temperatura y agitación y las condiciones óptimas fueron a 30°C y 250 r.p.m.

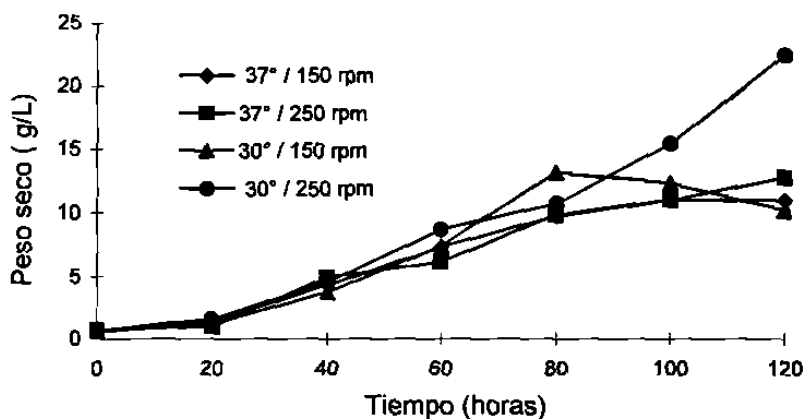


Figura No. 11 Biomasa de la producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a diferentes condiciones en el medio de cultivo a nivel matraz.

Tabla No. 15

Biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG -1 en el medio de cultivo No. 5 C-4 a diferentes condiciones de temperatura y velocidad de agitación.

Temperatura °C	Velocidad de agitación r.p.m.	Peso seco g / L
37	150	11.83
37	250	12.76
30	150	13.89
30	250	21.37

3.7. CINÉTICA DEL PH EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

En la Figura No. 12 se observa que las condiciones de cultivo influyen en el pH del medio. A 30°C y 250 r.p.m. donde se obtuvo la óptima producción de biomasa; el pH máximo 8.1 se presentó a las 60 horas.

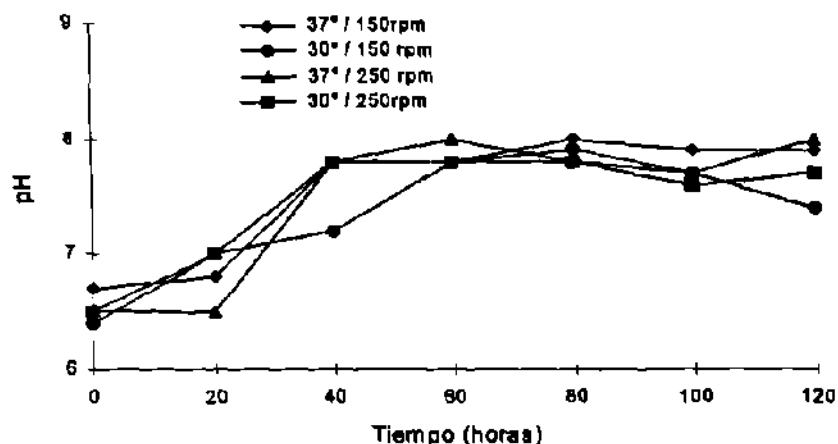


Figura No. 12 Cinética de pH en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a diferentes condiciones en el medio de cultivo No. 5C – 4 a nivel matraz.

3.8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO A *N. brasiliensis* HUJEG-1 A NIVEL MATRAZ EN EL MEDIO 5C-4.

En la Figura No. 13 se observó un consumo mínimo de glucosa las primeras 30 h y descendiendo exponencialmente hasta las 70 h, después de este periodo el descenso es lento,

a las 130 h, ésta permanece en 3.0 g/L. La biomasa se incrementa lentamente las primeras 50 h y exponencialmente de 50 - 120 h, disminuye hasta las 160 h, se obtuvo un peso seco final de 20.35 g/L. El pH se incrementa de 6.8 a 7.4 de las 20 - 40 h y el máximo lo presenta a las 100 h. De la cinética se calculó el tiempo de duplicación (t_d) de 27 h, una velocidad de crecimiento (μ) de 0.186 h^{-1} y un rendimiento celular ($Y_{x/s}$) de $0.51 \text{ g BM / g de substrato}$.

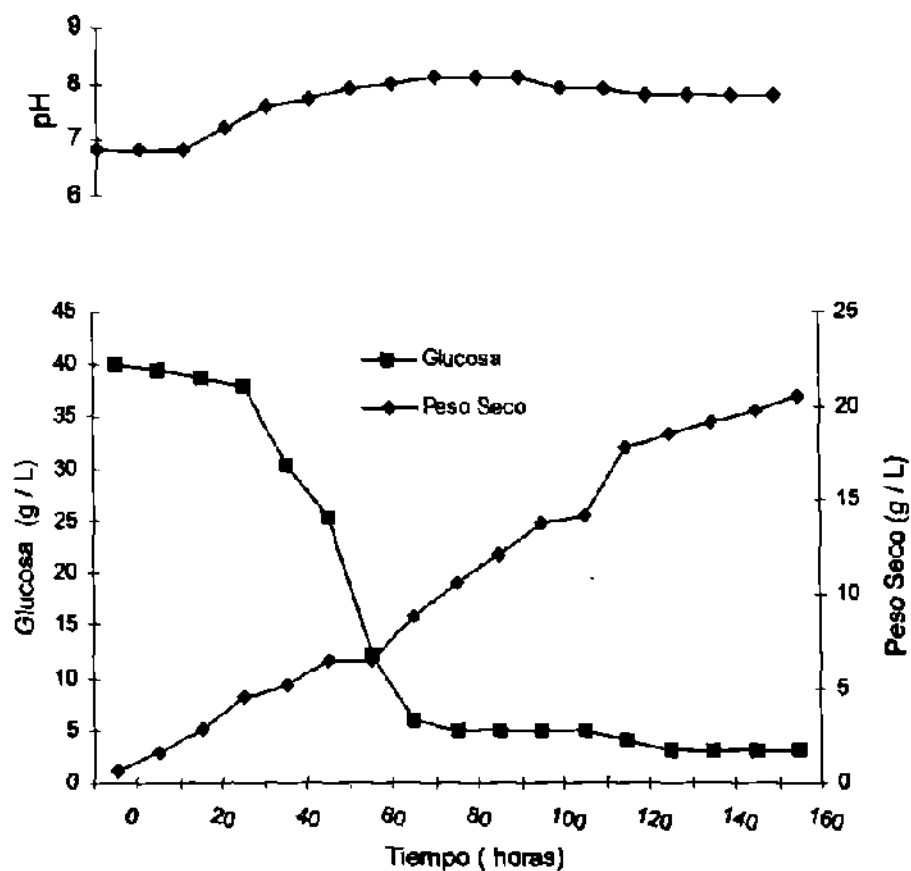


Figura No. 13 Cinética de crecimiento de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en el medio de cultivo No. 5C - 4 a nivel matraz.

3.10. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1 A NIVEL
3.9. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LOS COMPONENTES
DEL EXTRACTO CELULAR DE *N. brasiliensis* HUJEG-1.

En la Figura No. 14 se muestran los resultados obtenidos de los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS -PAGE) de las proteasas de *N. brasiliensis* en los medios de cultivo No. 1 y 5C - 4 y se compararon con marcadores de peso molecular .

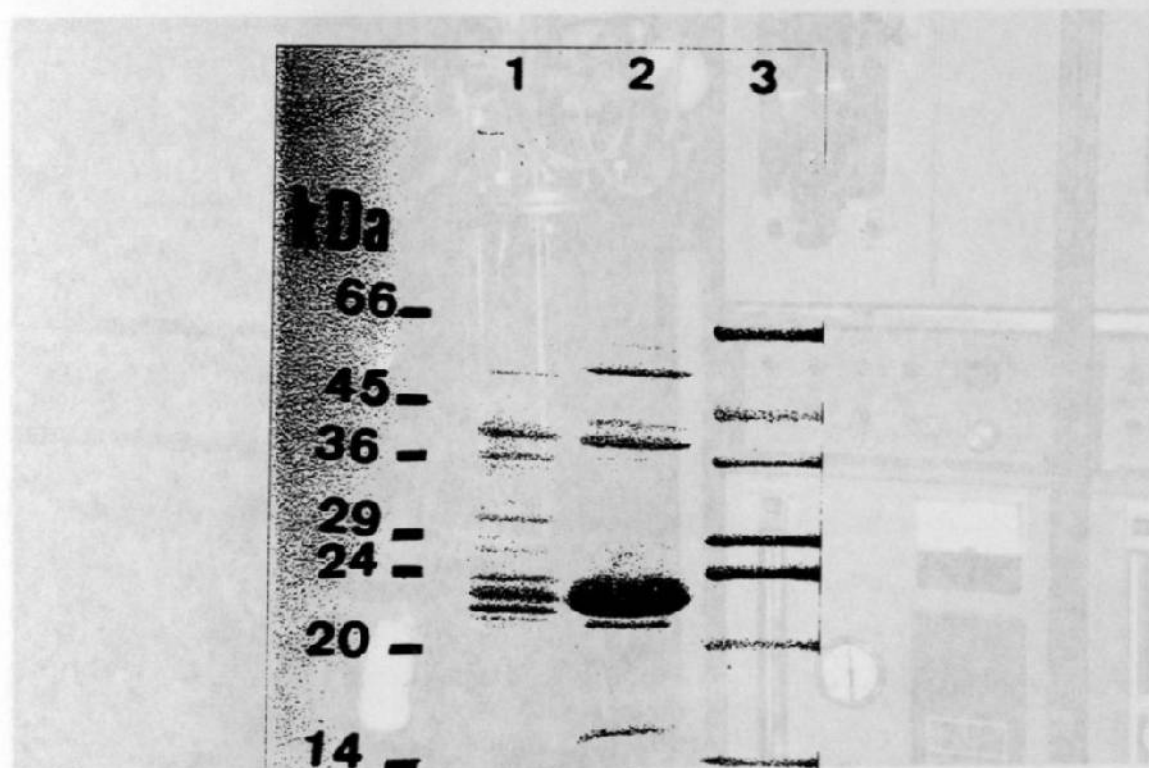


Figura No 14 Electroforesis en gel SDS-PAGE en gradiente 8.75 - 18.0 % de extractos de *N. brasiliensis*, carril 1 medio No. 5C- 4, carril 2 medio No. 1, carril 3 marcadores de masa molecular.

3.10. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1 A NIVEL FERMENTADOR

En la Tabla No. 16 y Figura No. 15 se muestran los parámetros determinados durante el proceso, la demanda de oxígeno es baja con un valor de $256 \text{ mg O}_2 / \text{L} \times \text{h}$, el coeficiente de rendimiento ($Y_{x/y}$) $0.56 \text{ g BM} / \text{g Substrato}$.



Figura No. 15 Obtención de la biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en un fermentador de 14 L Modelo M 19-1410 NBS.

Tabla No. 16

Parámetros determinados en la producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a nivel fermentador Modelo M19 - 1410 NBS.

Parámetro	Valor obtenido
Coefficiente volumétrico de Transferencia de oxígeno (K_{La})	53 h ⁻¹
Biomasa en peso seco (X)	22.43 g/l
Tiempo de duplicación (t_d)	13.5 h ⁻¹
Velocidad de crecimiento (μ)	0.0513 h ⁻¹
Demanda de oxígeno (N_a)	256 mg O ₂ / L x h
Coefficiente de respiración (Q_{O_2})	0.12 mgO ₂ /g BM x h
Coefficiente de rendimiento de oxígeno (Y_{O_2})	0.52 g O ₂ / g BM x h
Rendimiento ($Y_{X/S}$)	0.56 g BM / g de substrato

3.10.1. CINÉTICA DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1 A NIVEL FERMENTADOR.

Figura No. 16 muestra el comportamiento del proceso. El consumo de oxígeno fue de un 75 % las primeras 40 h, luego permanece constante las siguientes 20 h y finalmente disminuye. La demanda de glucosa permanece constante las primeras 10 h, posteriormente hay un consumo continuo hasta las 50 h y a partir de las 70 h, la concentración de glucosa permanece constante en 5 g/L. La biomasa se incrementa lentamente las primeras 10 h, exponencialmente de las 10 a las 50 h y finalmente es constante hasta las 90 h. El pH se controló a 7.0 ± 0.3 .

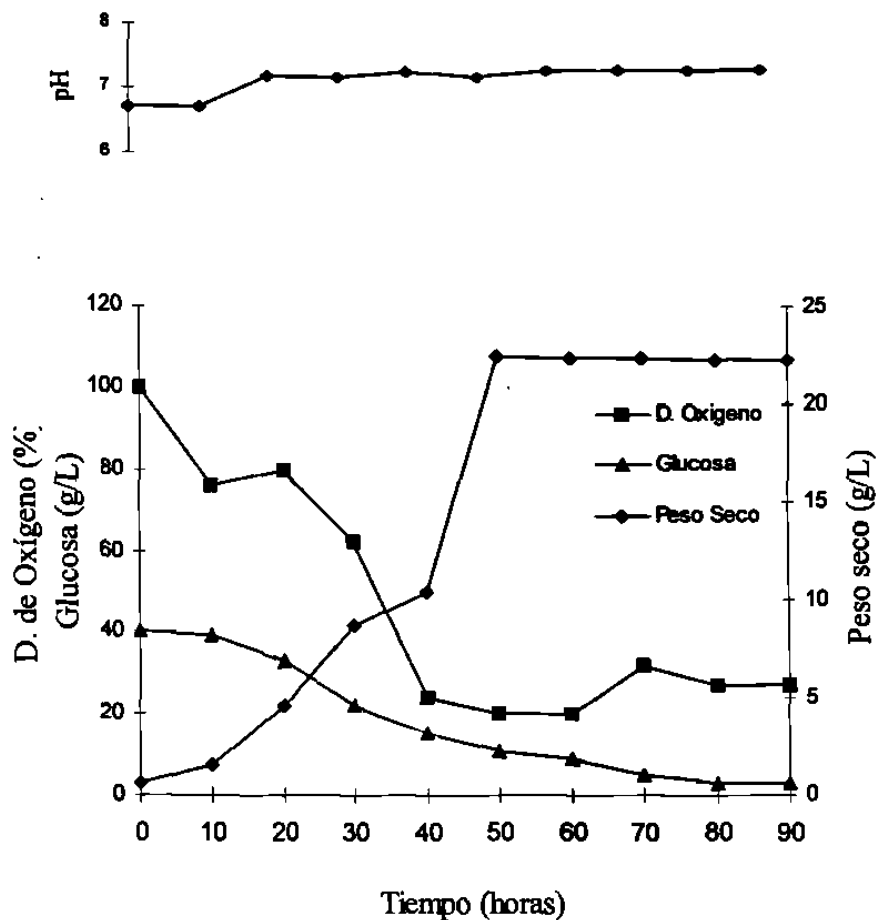


Figura No. 16 Cinética de crecimiento de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en el medio de cultivo No. 5C-4 a nivel fermentador.

3.10.2. CINÉTICA DE CONSUMO DE OXÍGENO EN LA PRODUCCIÓN DE *N. brasiliensis* HUJEG-1

En la Figura No. 17 se observó que el consumo de oxígeno en la producción de biomasa, muestra un perfil hiperbólico asintótico a la V_{max} , con una demanda de oxígeno de $256 \text{ mg O}_2 / \text{L} \times \text{h}$; se presenta $\frac{1}{2} V_{max}$ a las 20 h. En la Figura No. 20 los resultados de la ecuación de Michaelis -Menten son transformados

algebraicamente a los recíprocos de ambos lados de la gráfica de la Figura No. 19 a la ecuación de Lineweaver - Burk.

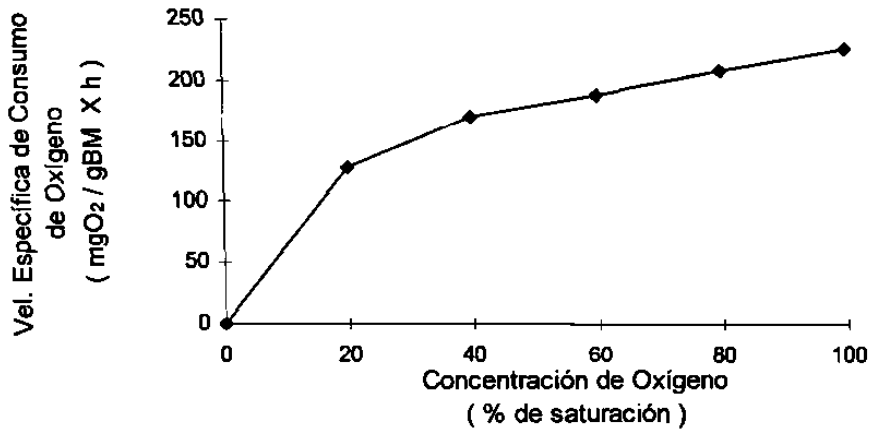


Figura No. 17 Cinética de consumo de oxígeno de la producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en el medio de cultivo No. 5C- 4.

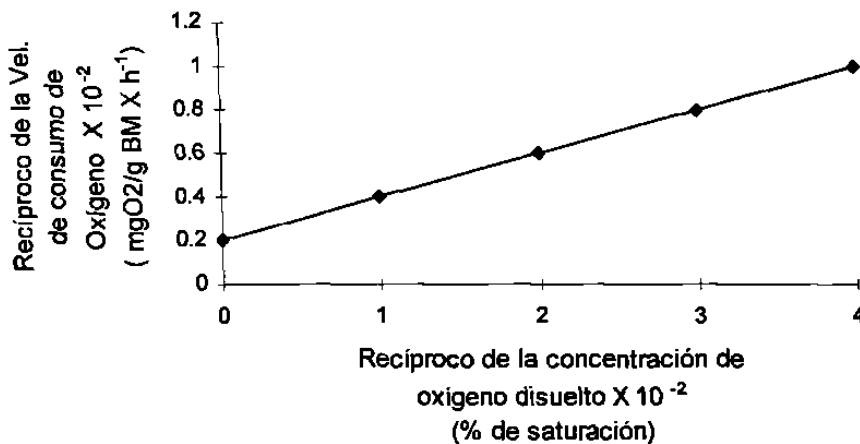


Figura No. 18 Ecuación de Lineweaver - Burk sobre la cinética de consumo de oxígeno en la producción de biomasa de *N. brasiliensis* en el medio de cultivo No. 5C-

3.11 RELACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *N. brasiliensis* HUJEG-1 A NIVEL MATRAZ Y FERMENTADOR.

En la Tabla No. 17 se muestra una relación de la biomasa obtenida a nivel matraz y nivel fermentador en el medio de cultivo No. 5C -4 y nivel matraz el No. 1 (BHI testigo) los cuales son superiores en el medio No. 5C - 4, al igual que el contenido de proteínas totales y la actividad caseinolítica a nivel matraz.

Tabla No. 17

Comparación de los parámetros en la producción de biomasa de *N. brasiliensis* HUJEG -1 a nivel matraz y fermentador.

Medio de Cultivo	Peso seco g / L	Proteínas totales µg / mL	Actividad caseinolítica UA
1 (matraz)	4.45	124.7	98.0
5C-4 (matraz)	20.35	342.0	482.0
5C-4 (fermentador)	22.43	366.0	513.7

4. DISCUSION

Las fuentes de carbono que se utilizaron en el presente trabajo fueron: glicerol, glucosa y almidón y la que proporcionó mayores rendimientos fue la glucosa (Tabla No. 9 y 10, esto concuerda con lo encontrado por Nesbit y cols. (1993), quienes probaron diferentes fuentes de carbono: glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, almidón y citrato, en el estudio "Influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y actividad lipolítica en *N. asteroides*" y encontraron que la glucosa y fructosa dieron mayores rendimientos en la producción de biomasa de 4.9 y 5.6 g /L respectivamente (68). Boeck (1992) también reportó que de las diferentes fuentes de carbono utilizadas: (glucosa, fructosa, glicerol y glicerol más glucosa), la glucosa incrementó la cantidad de biomasa y antibiótico (11). Otros autores utilizaron diversas fuentes de carbono: dextrinas de papa, almidón soluble, almidón de maíz, glicerol, fructosa y otras, en la producción de un antibiótico a partir de *N. orientalis* y obtuvieron mayores rendimientos en la producción de antibiótico con dextrinas de papa y almidón soluble, estos constituyentes al hidrolizarse producen glucosa y otros micronutrientes que favorecen el metabolismo de los microorganismos (11), Rivas y cols. (1988) también encontraron que la melaza de caña de azúcar que posee micronutrientes, dió mejores resultados como fuente de carbono que cuando se utilizó glucosa (74)

Boeck (1992) estudió el efecto de varias fuentes de nitrógeno: peptona de carne, hidrolizado de soya, harina de semilla de algodón, harina de cacahuete, harina de carne-sangre de cerdo, levadura, líquidos de remojo de maíz, sobre la biosíntesis de un

antibiótico, los únicos que proporcionaron buenos resultados fueron la peptona, cascina e hidrolizado de soya, se confirma en el citado estudio que los mayores rendimientos los presenta el hidrolizado de harina de soya y peptona de carne(11), en nuestro trabajo se encontraron los mejores resultados cuando se usaron las siguientes fuentes de nitrógeno: hidrolizado de soya, peptona de carne y peptona de colágena. El hidrolizado de soya presentó buenos rendimientos pero fue descartado por el contenido de componentes insolubles, el incremento de procedimientos para eliminarlos y por lo tanto el costo en la producción de biomasa, se buscó otra alternativa de la fuente de nitrógeno, se probaron peptona de carne, hidrolizado de gelatina, peptona de colágena y la fuente que favoreció la producción de biomasa fue la peptona de colágena, al igual que el estudio realizado por Theriault (1986), quien utilizó diferentes fuentes de nitrógeno: peptonas líquidas (F152, 156, 1000) lactoalbúmina, harina de pescado, peptona de carne, extracto de carne, harina de soya, en la producción de antibióticos Benzanthrinas A y B y la que presentó mayor producción de antibiótico fue peptona líquida F 1000 y la F 152. Para optimizar los rendimientos se utilizaron diferentes proporciones de glucosa y peptona de colágena y se encontró que la proporción óptima fue de 4 % de cada una, a diferencia de la obtenida por Nesbit (1993) en las relaciones que probó encontró que la óptima para la producción de biomasa fue 1 ~ 4, esta diferencia puede ser debida a que utilizó diferente fuente de nitrógeno (68) y las que presentaron mayores rendimientos fueron hidrolizado de soya, peptona de carne y peptona de colágena. Se eligió para la formulación de los medios de cultivo la peptona de colágena que aunque la actividad caseinolítica era ligeramente menor que en el medio con hidrolizado de soya esta presentaba las siguientes ventajas: alta solubilidad y menor costo.

Las fuentes de carbono y nitrógeno que contribuyen en la producción de biomasa, se muestran los resultados en las Tablas No. 9, 10, 15, 17 y 18. En éstas se observa que en los medios de cultivo No. 4, 5, y 6 presentaron mayores valores, se observó que no existe una relación directa respecto a la biomasa y el contenido de proteínas totales y a la actividad caseinolítica con el contenido de proteínas totales, igual efecto observó Nesbit en la relación del medio de cultivo y la actividad de lipasa intra y extracelular de *N. asteroides* (68).

En la Tabla No.10 se muestran los resultados de la actividad caseinolítica extracelular, fue mayor en el medio a base de hidrolizado de soya y glucosa, por lo tanto estas fuentes contribuyen a la producción de enzimas intra y extracelulares, Nesbit (1993) observó que la producción de enzimas lipolíticas intra y extracelulares dependía de la fuente de carbono y nitrógeno que se utiliza, obteniendo mayor producción con glutamato y fructosa (11), Zlotink también reportó que la producción de enzimas depende de las fuente de nitrógeno y observó que cuando utilizaba una fuente simple no se producían enzimas con actividad proteolítica y cuando ésta fue substituida por una fuente compleja, si se producían enzimas con dicha actividad (101).

En el medio de cultivo No. 4 se utilizó CaCO_3 cuya función es amortiguar los cambios de pH, con la contribución del ácido producido metabólicamente, esta sal presenta baja solubilidad por tal motivo se probaron otras sales Na_2HPO_4 , NaHCO_3 para que cumplieran la misma función (Tabla No. 12), se observó que el medio de cultivo con CaCO_3 la biomasa fue mayor en un 40% que con Na_2HPO_4 y 70% respecto a NaHCO_3 y la actividad caseinolítica también fue mayor en CaCO_3 , 30 y 50% respecto a Na_2HPO_4 y

NaHCO₃. Debido a los mejores resultados se conservó el CaCO₃ en la formulación del medio de cultivo, probablemente el CaCO₃ además de tener efecto amortiguador de pH, participa el ion Ca⁺⁺ como cofactor en el metabolismo de *N. brasiliensis* favoreciendo la producción de biomasa y enzimas proteolíticas, Boeck observó que el CaCO₃ amortiguó los cambios de pH en el medio de producción de un antibiótico a partir de *Streptomyces ganderi* manteniéndolo cerca de la neutralidad, si éste se omitía, el pH se acidificaba y disminuía la producción de antibiótico (11).

Con los resultados obtenidos en ésta primera parte, se cumplió con el objetivo del diseño de un medio de cultivo con óptimos rendimientos y mayor actividad caseinolítica, la composición del medio es: glucosa 4.0%, peptona de colágena 4.0%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, CaCO₃ 0.01% ajustados a pH 0 7.0.

Además de los constituyentes en el medio de cultivo las condiciones fisicoquímicas contribuyen en la producción de biomasa, en varios experimentos se determinó la temperatura óptima y se encontró que a 30°C se presentaron mejores resultados (Tabla No. 9 y Figura No 13). Boeck y col. (1984) probaron diferentes temperaturas para la producción de un antibiótico análogo a la vancomicina a partir de *N. orientalis* y encontraron que de 32 – 34°C es el rango óptimo para la producción (11), una observación similar realizó Theriault (1986) en *N. lurida* y encontró que 24°C fue la óptima para la producción de Benzanthrinas A y B (88). La diferencia entre los resultados obtenidos se comprende ya que estos investigadores midieron producción de metabolitos y en el presente trabajo se midió la producción de biomasa. De esto se concluye que tanto la producción de biomasa como la de metabolitos depende de la temperatura y de la cepa de producción. Por otro lado la velocidad de

agitación contribuye a la producción de proteasas caseinolíticas, encontramos mejores resultados a 250 r.p.m. ésta favorece a la producción de biomasa y actividad proteolítica a nivel matraz (Tabla No. 19, Figura No. 13), Theriault observó el efecto de la agitación, aereación y volumen del medio en la producción de antibióticos Benzanthrinas A y B a nivel fermentador y encontró que estas contribuyen a la cantidad de antibiótico producido, las óptimas fueron 300 r.p.m. a 1.0 VVM y un volumen de trabajo de 10 L a nivel fermentador (88). Como es de esperarse el desarrollo de *N. brasiliensis* a diferentes condiciones de temperatura y velocidad de agitación influyen en la producción de metabolitos y esto se observa en la cinética de pH, el cual es diferente respecto a las condiciones de producción debido a la formación de diferentes metabolitos (figura No. 14). En la cinética de crecimiento a nivel matraz, se observa en la figura No. 15, que en las primeras 20 h la fuente de carbono sufre un ligero cambio, al igual que la biomasa, después de este periodo entre las 30 a 60 h la glucosa es altamente consumida y la biomasa se incrementa un poco más, posteriormente de 60 a 160 h el consumo es mínimo, el fenómeno inverso se observa en la producción de biomasa, que tiene su fase exponencial de las 60 a las 160 h y después de este periodo permanece constante; en el pH de las primeras 30 h donde el consumo de glucosa es mínimo este no cambia, hay un incremento en el periodo donde la glucosa es altamente metabolizada alcanzando su pH máximo a las 60 – 70h.

Con los resultados obtenidos en esta segunda parte, se cumplió con el objetivo de determinar las condiciones fisicoquímicas óptimas para la producción de biomasa y mayor actividad caseinolítica, estas condiciones fueron: temperatura 30°C y velocidad de agitación 250 r.p.m. La temperatura según los experimentos realizados, se observa que es un factor determinante en el desarrollo de *N. brasiliensis*, éstas condiciones de

cultivo tienen semejanza con el entorno ambiental de temperatura alrededor de 30°C, predominante en zonas tropicales, son los lugares donde existe mayor incidencia de infecciones causadas por bacterias del género *Nocardia*.

Para la determinación de masa molecular de los componentes del extracto obtenido a partir de *N. brasiliensis* se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se corrieron los extractos del medio No. 1 (carril 2) y los extractos del medio No. 5C- 4 (carril 1) y se compararon con patrones de masa molecular (66, 45, 36, 29, 24 y 14 kDa) (carril 3) y se observaron proteínas de masa molecular de 38, 36, 26 y 24 kDa principalmente, lo que concuerda con los resultados reportados por Licon en su investigación (55).

La Tabla No. 20 muestra los parámetros obtenidos durante el proceso a nivel fermentador. El coeficiente de rendimiento ($Y_{X/S}$) muestra una capacidad metabólica aceptable de la fuente de carbono, este se obtiene a partir de los valores de conversión de substrato a biomasa (0.56 g BM/g S) (88), el valor de la demanda de oxígeno es un factor importante, ésta proporciona información acerca de si el fermentador cumple con los requerimientos de oxígeno a través de la aereación y agitación, por otra parte Q_{O_2} representa una velocidad específica de la demanda de oxígeno por el microorganismo, ambos factores muestran características correspondientes al microorganismo, mientras que el coeficiente de transferencia de oxígeno ($K_L a$) nos representa las características del reactor biológico, en base a los resultados obtenidos este cumple satisfactoriamente con las necesidades del microorganismo. En la Figura No. 19 donde se muestra la cinética de consumo de oxígeno en la producción de *N. brasiliensis*, la curva describe parte de una hipérbola rectangular con una asíntota a la velocidad máxima aproximadamente a 250 mgO₂ / g BM x h y la $\frac{1}{2} V_{max}$ se presenta al 20% de saturación ésta gráfica indica

que la fermentación microbiana se comporta como una reacción catalizada enzimáticamente, cumpliendo con la ecuación de Michaelis - Menten por lo tanto con la ecuación de Monod (56, 73), la Figura No. 20 se convierte en la gráfica de la Figura No. 21 en una línea recta al graficar los recíprocos de estos parámetros convirtiéndose a la ecuación de Lineweaver - Burk, esta permite una determinación más exacta de la velocidad de la reacción, en cuanto al crecimiento microbiano (25, 60, 97)

Para el proceso se establecieron condiciones de operación Temperatura 30°C y velocidad de agitación 250 r.p.m. parámetros que fueron preestablecidos a nivel matraz. A nivel fermentador se probó solo a condiciones de aereación y velocidad de agitación de 250 r.p.m. y 1.0 VVM; La aereación y presión se establecieron a partir de referencias de investigaciones realizadas por Boeck (11) y Theriault (88).

En la Figura No. 18 se muestra el comportamiento del microorganismo a nivel fermentador, el consumo de glucosa fue exponencial de 20 - 60 h igual comportamiento observó Theriault en la producción de antibióticos Benzanthrinas A y B a partir de *N. lurida*, por otra parte el consumo de oxígeno fue continuo y bajó de 100 - 30% durante las 40 primeras h del proceso, Dingerdissen observó un consumo alto de oxígeno las 20 primeras h y las siguientes 20 h se incrementó al 90 % y posteriormente se mantuvo constante, este comportamiento difirió parcialmente al obtenido en este estudio, lo que en parte se puede deber a las diferentes cepas de *Nocardia* y a las condiciones del equipo que se utilizó en ambos experimentos. Con los resultados obtenidos se cumple con el tercer objetivo, realizar la producción de biomasa a nivel fermentador.

De esta investigación, se obtuvo un medio de cultivo con alta producción de biomasa 20.35 g/L mayor actividad caseinolítica 482 UA mostrados en la Tabla No. 17. y costos inferiores respecto a los del medio testigo, para la obtención de biomasa y componentes inmunogénicos, que pueden ser utilizados para el diagnóstico de micetoma y monitoreo de la acción terapéutica en pacientes.

Se recomienda realizar investigaciones en el futuro, en el diseño de medios de cultivo, ya sea incorporando otras fuentes de nitrógeno como queratinas de plumas de aves, otras fuentes de carbono como melazas o residuos de la obtención de la miel de maíz, variando las proporciones de micronutrientes tales como el Ca^{++} , incorporando otras sales minerales y variando la proporción de los componentes del medio de cultivo 5C- 4, para incrementar los rendimientos (Y_x/s) y disminuir los costos de producción; para la obtención de otros metabolitos de interés, tales como P-24, que es un antígeno inmunodominante que puede ser de interés clínico, para el serodiagnóstico de micetoma para *N. brasiliensis*. También se recomienda realizar experimentos a nivel fermentador a otras condiciones de agitación y aereación, éstas favorecen la disponibilidad del oxígeno para los microorganismos, por lo tanto, mayor conversión de los substratos a biomasa.

Otra alternativa sería realizar investigaciones, para determinar los genes responsables de los metabolitos de interés como P-24 y otros, por medio de clonación en vectores e inserción del mismo en un hospedero apropiado como *E. coli*, *S. cerevisiae* u otros.

5. CONCLUSIONES

- La mejor fuente de carbono y nitrógeno fueron glucosa y peptona de colágena respectivamente y el carbonato de calcio la mejor sal para la producción de biomasa y actividad caseinolítica de *N. brasiliensis* HUJEG-1.
- Las condiciones óptimas fueron: 30°C de temperatura y 250 r.p.m. de velocidad de agitación a nivel matraz.
- El tiempo de duplicación (t_d) y la velocidad de crecimiento (μ) de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a nivel fermentador disminuyó aproximadamente el 50% respecto a los valores obtenidos a nivel matraz.
- La demanda de oxígeno de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a nivel fermentador es baja (256 mg O₂ / L x h), con un coeficiente de rendimiento y actividad caseinolítica ligeramente superiores a los obtenidos a nivel matraz.
- La operación unitaria de producción de *N. brasiliensis* HUJEG-1. Cumple con los recíprocos de la Ecuación de Lineweaver – Burk, guardando una relación directamente proporcional a los valores recíprocos de la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad de consumo de oxígeno, la que permite una aplicación industrial para la producción de biomasa.
- El medio de cultivo que mostró mayor coeficiente de rendimiento fue 5C-4 con 4.5 veces más peso seco, 3.5 veces más proteínas totales, 4.9 veces más actividad caseinolítica y aproximadamente 27 veces menos el costo respecto al medio testigo (BHI) a nivel matraz.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1 Alef Kaseem and Nanniperi Paola. (1995) Protease Activity. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry . 313-31
- 2 Arenas R .(1990). Micetoma. Micología Médica Ilustrada. Editorial Interamericana McGraw – Hill, México D.F. 131 -144
- 3 Arenas R .(1990). Nocardiosis. Micología Médica Ilustrada. Editorial Interamericana McGraw – Hill, México D.F. 299 - 302
- 4 Bailey J. and Ollis D. (1986). Kinetics of Substrate Utilization Product Formation, And Biomass Production in Cell Cultures. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. Ed. Mc Graw-Hill, New York. 373 427
- 5 Bailey J. and Ollis D. (1986).Transport Phenomena in Bioprocess System. Second Edition. Ed. Mc Graw-Hill, New York. 457 - 623
- 6 Bajpai R. (1992). Micro-and-Macro Mixing in Fermentors. Ubamari Publication, No.34 3 – 29.
- 7 Balatti A.P.(1983). Producción de Proteasas por Bacterias.Biotecnología de Enzimas. Editado por UNAM. 89 - 108.
- 8 Beaman B. L. and Beaman L. (1994) Nocardia Species: Host-Parasite Relationships Clinical Microbiology. 7: 2, 213-264.
- 9 Beaman B. L., Saubolle M. and Wallace R. (1995). *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Oerskovia*, and other aerobic Actinomycetes of Medical Importance. Manual of Clinical Microbiology. 6th. Edition. Ed. Library Congress Washington, D. C. 379 – 399.
- 10 Blanco G.; Hadisson C. and Salas J. (1984). Resistance to Inhibitor of RNA Polimerase in Actinomycetes which Produce Them. J. of General Microbiol. 130: 2883 - 2891.
- 11 Boeck L. D., Berry D. M., Mertz F. P. and Wetzel R. W. 1992. A10255, A Complex of Novel Growth-Promoting Thiopeptide Antibiotics Produced by a Strain of *Streptomyces gardneri* Taxonomy and Fermentation Studies. J. of Antibiotics. 45(8): 1222 - 1230.

- 12 Boeck L. B., Mertz F. P., Wolter R. K. and Higgenes E. C. (1984). "N Demethylvancomycin, A Novel Antibiotic produced by a strain of *Nocardia orientalis* Taxonomy and Fermentation". *J. of Antibiotics*. **37**(5): 446 - 453.
- 13 Bradford M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72** :248-252
- 14 Bu'Lock J. (1987). *Introducción a la Biotecnología Básica; Biotecnología Básica*, Ed. Academic Press, London. 3 - 10.
- 15 Burkhard-Kresze G. (1983). *Methods for Protein Determination*. Third Edition, Editorial Verlag - Chemie. Deerfield Beach, Florida. **2**: 84 - 99.
- 16 Calam C. (1986). Shake-Flask Fermentations. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Editors: Demain H. T. and Salomon N. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 59 - 65.
- 17 Calderón J. (1991). *Aplicación Clínica de Antibióticos y Quimioterápicos*. Editorial Méndez Cervantes. México D.F. 25 -26.
- 18 Castro-Corona M.A. (1995). *Obtención de Anticuerpos Monoclonales para Buscar a la Proteína Immunodominante de 24 kDa en la Superficie de Nocardia brasiliensis*. Tesis de Maestría Especialidad Inmunología. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 19 Chen Y. and Rosazza J. P.N. (1994). Microbial Transformation of Ibuprofen by a *Nocardia* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(4): 1292 - 1296.
- 20 Colón L. S., Jiménez N. M. & Zlotnik H. (1992). Properties of a Partially Purified Acid Phosphatase from Pathogenic *Nocardia brasiliensis*. *Mycopathology* **118**: 85 - 93.
- 21 Couch T.L. & Ross D.A. (1980). Production and Utilization of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* δ -endotoxin for Control of Mosquito Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 984 - 988.
- 22 Cross T. (1989). The Actinoycetes II. Growth and Examination of Actinomycetes Some Guideline. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by Williams T. S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. USA. **4**: 2340- 2343.
- 23 Dingerdissen R.D. et al. (1986). Actinoidin A2, A Novel Glycopeptide. Production, Preparative HPLC Separation and Characterization. *J. of Antibiotics*. **50**(2): 165 - 172

- 24 Dingerdissen J. J., Sitrin R. D., Dephillips P. A., Giovenella A. J., Grappel S.F., Mchta R. J., K. OH, Pan C. H., Roberts G.D., Shearer M.C. and Nisbet L.J. (1986). Actinoidin A₂ A Novel Glycopeptide: Production , Preparative HPLC Separation and Characterization. *J. of Antibiotics*. 40(2): 165 - 172.
- 25 Galán-Wong L. (1993). Selección de Cepas Nativas y de Extractos de Fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hubner) *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidóptera: Noctuidae). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.
- 26 García-Hernández F. (1983). Aspectos sobre Escalamiento de Enzimas. *Biotecnología de Enzimas*. Editado por UNAM. México D.F. 110 - 123.
- 27 Gautam S. Motte R. S. Wangner F.W. (1994). *Protease Assay Methods. Proteolytic Enzymes a Practical Approach*. Edited by Beynon R.J. and Bond J.S. USA
- 28 Godfrey J.C & Zhu Z.M. (1990). Measurement of Particle - Liquid Profiles in Agitated Tanks. *Arch. Symposium Series. Industrial Mixing Technology*. 90(299): 181 - 186.
- 29 Gonzalez - Ochoa A. (1975). Geografía de las Micosis Profundas. *Rev. Inv. Salud Pública. México, D.F.* 35: 85 - 96.
- 30 Goodfellow M. (1989). The Actinomycetes I. Supragenetic Classification of Actinomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by Williams T. S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. USA. 4: 2333 - 2339
- 31 Gottchalk G. and Kula M. R. (1983). *Methods for Micro-Organism. Methods of Enzymatic Analysis*. Third Edition, Ed. Verlage- Chemie. Deerfield Beach, Florida. 2: 66 - 73.
- 32 Greenman J., Holland K. T. and Cunliffe W. J. (1981). Effects of Glucose Concentration on Biomass, Maximum Specific Growth Rate and Extracellular Enzyme Production by Three Species of Cutaneous *Propionibacterium* Grow in Continuous Culture . *J. of General Microbiology*. 127: 371 - 376.
- 33 Herbert D. Phipps P. J. and Srange RE. (1971). Chemical Analysis of Microbial cells Norris J. and Ribbons D. *Methods in Microbiology*, Ed. Academic Press, London. Vol. 5B. 214 - 216, 300-301.

- 34 Hernández - Delgadillo R. Y Ruiz-Cruz J. (1994). Actividad Proteolítica Libre de *Serratia marcescens*. II Cinética de Producción y Mecanismo de Inducción . Rev. Lat-Amer. Microbiol. 36: 93 -100
- 35 Hernández M.; Jenkins D. and Beaman B. (1994). Mass and Viability Estimations of *Nocardia* in Activated Sludge and Anaerobic Digester Using Conventional Stains and Immunofluorescent Methods. Wat. Sci. Tech. 29: 249 - 259.
- 36 Herrmann J. (1995) Immunoassays for the Diagnosis of Infectious Diseases. Manual of Clinical Microbiology. 6th Edition. Ed. Library of Congress. Washington, D.C. 110 - 122.
- 37 Hofelmann M. , Kitisteiner-Eberle R. and Schreier P. (1983). Ultrathin -layer Agar Gels: A Novel Print Technique for Ultrathin-layer, Isoelectric Focusing of Enzymes. Analytical Biochemistry. 128: 217 - 222.
- 38 Hunt. G:R.; Stieber . R: W. (1986) Inoculum Development. Editors: Demain A. and Salomon N. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 32 - 40.
- 39 Jeffrey P. Callen, M.D. And John Kingman, M. D. (1984). Disseminated Cutaneous *Nocardia brasiliensis* Infection. Pediatric Dermatology. Louisville, Kentucky. 2(1): 149 - 151.
- 40 Kargi F. and Moo-Young M. (1982). Transport Phenomena in Bioprocesses. Biorreactor Design, Operation and Control. Lehigh University, Bethlenhem, P.A. USA. 6 - 54.
- 41 Keleti George and Lederer William. (1974). Microbial Activity Hanbook of Micromethods for the Biological Sciences. Ed. Van Nostrand , Reinhol Company, New York. 200 - 207
- 42 Kevin J. Myers & Robert R. Corpstein, Andre Bakker & Julian Fasano. (1990). Solids Suspension Agitator Design whit Pitched-Blade and High-Efficiency Impellers. Arch. Symposium Series. Industrial Mixing Technology 90(299) : 187 - 192.
- 43 Kitzis M. D., Gutmann L. and Acar J. F. (1985). *In-vitro* Suceptibility of *Nocardia asteroides* to β -Lactam Antibiotics, in Combination with three β -Lactamase Inhibitors, and its Relationship to the β - Lactamase Cont. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 15 : 23 - 30.

- 44 Kumagai K, Taya K, Fukui A, Fukasawa M., Fukui M. and Nabeshima S. (1993). "PC - 766B, A New Macrolide an Antibiotic Produced by *Nocardia brasiliensis*". *The Journal of Antibiotics*. 46(6): 972 – 978
- 45 Laemm V. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227 : 680-685
- 46 Larone D. H. (1987). *Medically Important Fungi a Guide to Identification*. Second Edition. Editorial Elsevier, New York. 49 - 52.
- 47 Laughlin, J. and Faubert, G. (1997). Partial Purification and Some Properties of a Neutral Sulphydryl and an Acid Proteinase from *E. histolytica*. *Can. J. Microbiology* 23 :420- 425.
- 48 Lechevalier H.A. (1989). The Actinomycetes III. A Partial Guide to Generic Identification of Actinomycetes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ..* Edited by Williams T. S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA. 4: 2344 - 2347
- 49 Lechevalier H.A. (1989). Nocardioform Actinomycetes . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* . Edited by Williams T. S., Sharpe M.E. and Holt J.G. Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA. 4:2348 - 2361.
- 50 Lechevalier et Mary, P. Lechevalier. (1965). Classification des Actinomycetes Aerobies Basee sur Leur Morphologie et leur Composition Chimique. *Annales L' Institut Pasteur*. 108 : 662 - 673.
- 51 Lechevalier H. A. 1985. Filamentous Microorganisms. *Biomedical Aspect* . 73 – 84.
- 52 Lee J.M. 1992. Sterilization. *Biochemical Engineering*. Ed. Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences. New York. 212 - 239.
- 53 Lemmer H. and Baumann M. (1988). Scum Actinomycetes in Sewage Treatment Plant - Part 3 , Synergisms with Other Sludge Bacteria. *Wat. Res* 22: 765 -767.
- 54 Liberman D.F., Fink R. and Schaefer F.(1986) *Biosafety and Biotechnology*. Editors: Demain A. and Salomon N. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 403 - 408.

- 55 Licon-Trillo A. (1997). Estudio de la Inmunogenicidad de las Proteasas de *Nocardia brasiliensis* y su Efecto Inductor de Protección en el Micetoma Experimental en Ratones BALB/c. Tesis de Doctorado Especialidad en Inmunología. Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 56 Madigan M., Martinko J. y Parker J. (1998) Crecimiento Microbiano. Brock Biología de los microorganismos. 8ª Edición, Editorial Prentice-Hall, México D.F. 150 - 177.
- 57 Maiese W.M., Korshalla J., Goodman J., Torrey M. J., Kantor S., Labeda D. P. and Greenstein M. (1990). Simaomicin (LL -D42067), A Novel Antibiotic From *Actinomadura madurae*. J. of Antibiotics. 43(9) : 1059 - 1230.
- 58 McMurray D. N. (1991). "Mycobacteria and Nocardia. Medical Microbiology, Third. Edition. Editor Samuel Barron. 451 - 467.
- 59 McNeil M. and Brown J. (1994). The Medically Important Aerobic Actinomycetes : Epidemiology and Microbiology, Clinical Microbiology Review. 7(3): 357-417.
- 60 Medrano-Roldan H. (1992). Estudio sobre los Parámetros de Fermentación de Importancia Industrial Durante la Propagación de *Bacillus thuringiensis var kumamotoensis* C-4 para Producción de Bioinsecticidas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología , Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 61 Merrill C.R., Dunau M.L. and Golmaan D. (1981). A Rapid Sensitive Silver Stain for Polypeptides in Polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 110 :201-207
- 62 Meyer J. (1976). *Nocardiosis*. A New Genus of the Order *Actinomycetales*. International J. of Systematic Bacteriology. 26(4): 487 - 493.
- 63 Miller T. and Churchill B. (1986). Substrates for Large-Scale Fermentations. Editors: Demain A. and Salomon N. Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 122 - 135.
- 64 Minuth T. and Kula M. R. (1994). Extraction of Cholesterol Oxidase from *Nocardia rhodochrous* Using a Nonionic Surfactant - Based Aqueous Two - Phase System. J. Biotechnol. 38:151 -164.
- 65 Moo-Young M. and Blanch H.W. (1991). Fenómenos de Transporte y Diseño de Bioreactores. Biotecnología Básica Ed. Academic Press, London 133 - 169
- 66 Moser A. (1982). Imperfectly Mixed Bioreactor Systems. Bioreactor Design, Operation and Control. Technical University, Graz, Austria. 77 - 95.

- 67 Murray P. , Kobayashi G., Pfaller M., Rosenthal K. (1997). *Nocardia* y Actinomicetos Relacionados. Microbiología Médica. México, D.F. 315 - 319.
- 68 Nesbit E.A. and Gunasfkarán M. (1993). Influence of Cultural Conditions on Growth and Lipolytic Activity in *Nocardia asteroides*. Folia Microbiol 38(6): 451 - 455.
- 69 Norris. J. R. and Ribbons. D.W. (1971). Methods in Microbiology. Ed. Academic Press. London. 282-341.
- 70 Ochoa-Monzon M. (1994). Producción de Alfa - Amilasa por una Cepa Nativa de *Bacillus* y su Aplicación al Tratamiento del Almidón Residual en Granos de Malta agotados. Tesis para Obtener el Grado de Maestría con Especialidad en Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L. Monterrey N.L.
- 71 Perez-Rivera L.I., (1992). Identificación de Proteínas con Actividad Caseinolítica en un Extracto Celular de *Nocardia brasiliensis*. Tesis para Obtener el Grado de Maestría con Especialidad en Inmunología, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey N.L.
- 72 Quesnel L.B. (1991). Esterilización y Esterilidad. Biotecnología Básica, Ed Academic Press. London . 199 - 215.
- 73 Quintero Ramírez R. (1990) Ingeniería Bioquímica Teoría y Aplicaciones. Ed. Alhambra Mexicana. México D.F. 15 - 150
- 74 Rivas-Morales C. (1988). Producción de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* y su Actividad en *Aedes aegypti* Linnaeus y *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Tesis de Maestría para Obtener el Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L. Monterrey, N.L.
- 75 Salama H. S., Foda H. T. Dulmage H.T. (1981). Novel Fermentation media for production of δ - endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Invertebrate Pathology in Print 1 - 26
- 76 Salinas-Carmona M. C., Castro-Corona M.A, Sepulveda -Saavedra J. and Perez-Rivera L. I. (1997). Monoclonal o Antibodies to P-24 and P-61 Immunodominant Antigenes from *Nocardia brasiliensis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 4(2): 133 - 137.
- 77 Salinas-Carmona M. C., Perez L. I. Welsh O. Rodriguez M. Rinaldi M.G. (1992). Identification of Intracellular Proteases from *Nocardia brasiliensis*. J. Mycol. Méd. 2: 183 - 188.

- 78 Salinas-Carmona M. C., Welsh O. and Casillas S. (1993). Enzyme-Liked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(11): 2901 - 2906.
- 79 Salinas-Carmona M.C., Vera L. Welsh O. and Rodríguez M. (1992). Antibody Response to *Nocardia brasiliensis* Antigens in Man. *Zbl. Bakt.* 276:390 -397.
- 80 Sandoval Trujillo H. (1993) Actinomicetos. 1ª Edición. Ed. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F. 17-203
- 81 Serrano J. A. and Sandoval A. H. (1992). Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos. Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico. Consejo de Publicaciones Merida - Venezuela. 7-346
- 82 Schmidt -Kastner G. and Golker C.F. (1991). Procesamiento en Biotecnología. Biotecnología Básica, Ed. Academic Press. London. 175 - 195.
- 83 Shawar R. M., Moore D. G. , and Larocco M. T. (1990). Cultivation of *Nocardia spp.* On Chemically Defined Media for Selective Recovery of Isolates From Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3) : 508 - 512.
- 84 Shukla O. P. and Kaul S. M. . (1986). Microbiological Transformation of Pyridine N - Oxide and Pyridine by *Nocardia sp.* *Can J. Microbiol.* 32:330 - 341.
- 85 Shuler Michael and Kargi Fikret. (1991). Selection, Scale-Up, Operation, and Control of Bioreactors. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Ed. Prentice-Hall International. Series In The Physical and Chemical Engineering Sciences. New York. 270-310
- 86 Sinclair C.G. (1991). Cinética de los Procesos Microbianos. Biotecnología Ed. Academic Press. London. 75 - 127.
- 87 Strain B. and Gröschel D. (1995). Laboratory Safety and Infectious Waste Management. *Manual of Clinical Microbiology* 6th. Edition. Ed. Library Congress. Washington, D.C. 75 - 85
- 88 Theriault R. J, Rasmussen R. R., Kohi W. L. , Prokop J. F. , Hutch T. B. and Barlow G. J. (1986). Benzanthrins A and B, A New Class of Quinone Antibiotics. *The Journal of Antibiotics*. 39(11): 1509 - 1514.
- 89 Thuery J. (1990). Drying . Microwaves. Industrial, Scientific, and Medical Applications. Ed. by Edward H. Grant King's College London. 159 - 163, 305 - 337

- 90 Tietz N.W. (1982). *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 2nd Edition Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia. 240.
- 91 Trilli A. (1986) *Scale- Up of Fermentations*. Editors: Demain A. and Salomon N. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 277 - 305.
- 92 Tsuboi R., Yamaguchi T., Matsuda K. and Ogawa H. (1989). Extracellular Proteinase and Pathogenicity of *Nocardiae*. *Arch. Dermatol. Res.* Tokyo Japan. **281**: 78 - 80.
- 93 Tsukamura M. (1970). Relationship Between *Mycobacterium* and *Nocardia* Japan *J. Microbiol.* **14**(3): 187 - 195.
- 94 Van 't Klass R. and Tramper J. (1982). Mixing. *Basic Bioreactor Desing.* 183 - 219.
- 95 Vega Alonso A. (1998). Diferenciación de Actinomicetos mediante el Análisis de Acidos Micólicos . Tesis de Maestría Especialidad en Microbiología Médica, Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L.
- 96 Vera Cabrera L., Salinas Carmona M.C., Welsh O. and Rodríguez M. (1992). Isolation and Purification of two immunodominants proteins of *Nocardia brasiliensis*. *J. Clin. Microb.* **30**:1183-1188.
- 97 Wang D., Cooney L., Demain A., Dunnill P., Humphrey A. and Lilly M. (1979). *Fermentation and Enzyme Technology*. Ed. John Wiley & Sons .New York. 14 - 194
- 98 Weber K. And Osborn M. (1969). The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecylsulphate-Polyacrilamide Gel Electroforesis *J. Biol. Chem.* **244** :4406-4412.
- 99 Welsh O., Salinas M. and Rodríguez M. (1996). Treatment of Eumycetoma and Actinomycetoma. *Current Topics in Medical Mycology*,. Ed. Prous Science. **6**: 47
- 100 Zlotnik H. and Buckley H. R.(1980). Experimental Production of Actinomycetoma in BALB/C Mice. *Infection and Immunity.* **29**(3):1141-1145.
- 101 Zlotnik H., Schramm V. I. and Buckley H. (1984). Purification and Partial Characterization of a *Nocardia brasiliensis* Extracellular Protease. *J. of Bacteriology.* **157**(2): 627-631.

LISTA DE ABREVIATURAS

BM	Biomasa
°C	Grado Celsius
C	Coefficiente
cols	Colaboradores
cm	Centímetros
J	Journal
°S	Grados de latitud sur
°N	Grados de latitud sur
g	Aceleración debida a la fuerza de gravedad
h	Hora
HCl	Acido clorhídrico
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
Kda	Kilodaltones
L	Litros
µg	Microgramo
µl	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitros
<i>N</i>	<i>Nocardia</i>
<i>N.b.</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
NBS	New Brunswick Scientific Co.

N_0	Demanda biológica de oxígeno
QO_2	Determinación de coeficiente de respiración
KLa	Coeficiente de transferencia de oxígeno
C^*_g	Concentración de oxígeno disuelto en equilibrio con el Oxígeno de la fase gaseosa
C_L	Concentración de oxígeno en el seno del líquido
t_d	Tiempo de duplicación
mm	Milímetro
M	Molaridad
min	Minuto
mm	Nanómetro
p	Página
PBS	Amortiguador de fosfatos-salina
pH	Potencial de Hidrógeno
% p/v	Porcentaje peso / volumen
% v/v	Porcentaje volumen / volumen
%T	Porcentaje total de acrilamida-bisacrilamida en el gel
%C	Porcentaje de bisacrilamida en el total de acrilamida
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sustrato
seg	Segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones Desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio

TEMED	N,N,N',N'- Tetrametilendiamina
U	Unidades de actividad enzimática
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Voltios
VVM	Volumen de aire por volumen de medio de cultivo por litro
W	Watts

8. APENDICES

8.1. Apendice A. Reactivo de Ac. 3, 5 Dinitrosalicílico (DNS).

Solución A. Se disolvió con calor 150 g de Tartrato doble de sodio y potasio en 250 mL de agua destilada.

Solución B.- Se preparó una solución de NaOH 2N (8g de NaOH en 100 mL de agua destilada), se adicionó 5 g del ácido DNS y se disolvió con calor.

Se unieron las soluciones A y B y se llevaron a un volumen de 500 mL, se conservó en refrigeración en frasco oscuro.

8.1. Apendice B. Gel de Corrimiento en Gradientes 10 – 18.5 T, 2.75 C.

	10% T	18% T
Acrilamida-Bis-Acrilamida (30%T, 2.7%C)	0.720 ml	1.259ml
Amortiguador Tris-HCl 3.02 M, pH 8.8	0.396	0.396
Glicerol 50% p/v	0.144	0.222
Agua Destilada	0.874	0.193
SDS 10% p/v	0.020	0.020
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.007	0.007
TEMED	0.001	0.001

8.1. Apendice C. Gel de Empaquetamiento 5% T, 2.7% C.

Acrilamida-Bis-Acrilamida (30%T, 2.7%C)	0.499 ml
Amortiguador Tris-HCl 1 M, pH 6.8	0.375
Agua Destilada	1.980
SDS 10% p/v	0.30
Persulfato de Amonio 10% p/v	0.105
TEMED	0.003

