

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y  
ANTIBIÓTICO A PARTIR DE  
FERMENTACIONES SÓLIDAS CON  
*STREPTOMYCES CINNAMONENSIS***

Informe final de tesis  
presentado por

**Marissa Ivonne Umaña Velásquez**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Para optar al título de  
**QUÍMICO BIÓLOGO**

Guatemala, junio de 1996.

490850

DL  
04  
7(1707)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR	DECANO
LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ	VOCAL PRIMERO
LIC. GERARADO LEONEL ARROYO CATALAN	VOCAL SEGUNDO
LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE	VOCAL TERCERO
BR Licda. ANA MARIA RODAS CARDONA	VOCAL CUARTO
BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA	VOCAL QUINTO
LICDA. ANA LUCRECIA FORTUNY LEMUS DE ARMAS	SECRETARIA

## TESIS QUE DEDICO:

A DIOS

el mejor maestro

A MIS PADRES

Dr. Benigno Umaña Guillén y  
Dra. Silvia de Umaña por su  
amor, apoyo y comprensión.

A MI HIJA

Marisabel, mi principal mo-  
tivación.

A MIS HERMANOS

Lys, Juan Carlos y David  
con cariño.

A la Universidad de San Carlos De Guatemala

## AGRADECIMIENTO

Deseo agradecer a:

El Lic. Roberto de León y a la Lic. Elizabeth de Porres por su apoyo y asesoría para el desarrollo de esta tesis.

Al personal profesional, técnico y a los compañeros de la División de Investigación Aplicada del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial - ICAITI - por su colaboración y apoyo, en especial a la Lic. Sheryl de Cabrera y a la Lic. María del Carmen de Arreola.

Al Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial por la oportunidad que me brindó de realizar esta tesis en sus instalaciones.

Y muy especialmente a mi hermano David por su constante apoyo y colaboración.

ÍNDICE	Pag.
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. ANTECEDENTES .....	5
3.1 <i>STREPTOMYCES CINNAMONENSIS</i> .....	5
3.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS	
3.1.2 CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO EN CULTIVO LIQUIDO	
3.1.3 DEGRADACIÓN DE MATERIALES POR <i>S. CINNAMONENSIS</i>	
3.2 FERMENTACIONES SOLIDAS .....	8
3.3 SUSTRATOS .....	11
3.3.1 CASCARA DE BANANO VERDE Y MADURO	
3.3.2 MAICILLO O SORGO	
3.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA (PBM) .....	13
3.5 PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO .....	14
3.5.1 MONENSIN	
3.5.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS	
3.5.1.2 BIOSÍNTESIS DE MONENSIN	
3.5.1.3 USOS	
3.5.1.4 DOSIFICACIÓN	
3.5.1.5 AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN	
4. JUSTIFICACIONES .....	19
5. OBJETIVOS .....	21
6. HIPÓTESIS .....	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
8. RESULTADOS .....	31
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	38
10. CONCLUSIONES .....	40

11.	RECOMENDACIONES .....	41
12.	REFERENCIAS .....	42
13.	ANEXOS .....	51

## 1. RESUMEN

El *monensin* es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces cinnamonensis* ATCC 15413. Este antibiótico pertenece al grupo de polióteres utilizado a nivel veterinario como coccidiostático aviar y aditivo alimentario bovino.

En esta investigación se estudió al *Streptomyces* con la finalidad de que creciera en un sustrato sólido, obteniendo de esta forma un producto final enriquecido con biomasa y antibiótico útil para la dieta de animales.

El proceso llevado a cabo en esta investigación se basó en la utilización de un monocultivo (sorgo) y un deshecho agroindustrial (cáscara de banano verde y maduro) que fue convertido por un proceso de fermentación, en un sustrato enriquecido con biomasa microbiana y metabolitos secundarios producidos por la bacteria (en este caso el *monensin*).

Para determinar el efecto del crecimiento sobre los sustratos se llevaron a cabo dos fermentaciones una con 10 y otra con 15% de inóculo. Para cada fermentación se tomaron muestras a los 5, 10 y 15 días realizando los análisis de antibiótico, biomasa y proximal.

De los resultados obtenidos, se determinó que el sorgo es un buen sustrato tanto para el crecimiento de la bacteria como para la producción de biomasa y antibiótico. Sin embargo, los resultados obtenidos de *monensin* (max. 18 ug/ml) y biomasa no fueron suficientes como para poder utilizar el sustrato como un sustituto alimentario, lo que hace pensar que se puede mejorar la calidad del mismo utilizando posiblemente enriquecedores tales como

sales de amonio y cambiando algunas condiciones de cultivo.

En el caso de la cáscara de banano no se logró obtener buen crecimiento de la bacteria y por lo tanto la producción de antibiótico fue mínima (a nivel de trazas).

Los resultados obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza con aplicación de la t de Student.



## 2. INTRODUCCIÓN

Entre los mayores problemas que se afrontan actualmente a nivel mundial, se encuentra la creciente demanda de alimento (tanto para el consumo humano como para el animal) y también, cómo debe disponerse de grandes cantidades de desechos, entre ellos el agro-industrial, los cuales repercuten en la salud y desarrollo de una comunidad (1).

En base en lo anterior varias organizaciones e instituciones nacionales e internacionales se han preocupado por producir y promover fuentes de alimento como posibles alternativas para mejorar la oferta de los mismos; aprovechando en la mayoría de los casos, los desechos que puedan ser utilizados para tales propósitos y que a su vez, llenen los requerimientos nutricionales necesarios; por ejemplo, la producción de proteína microbiana a través de un proceso de fermentación (2).

La producción de nuevas fuentes de alimento a partir del aprovechamiento de materias primas de la industria alimentaria local, se presentan también como una alternativa para la alimentación animal (3).

En el caso de la alimentación animal, se han descrito muchos esquemas para producir productos de biomasa microbiana (PBM). El proceso estándar utiliza un monocultivo como fuente de energía y alimento para que el microorganismo crezca y produzca la proteína que enriquece al sustrato utilizado además de producir metabolitos secundarios (2, 3).

Los antibióticos para humanos y animales son sustancias obte-

nidas generalmente en fermentaciones líquidas como metabolitos secundarios del microorganismo utilizado. El propósito de esta investigación fue la producción de biomasa microbiana y antibiótico en una sola etapa, utilizando para tal efecto, la técnica de fermentación al estado sólido. El producto final de este tipo de fermentación fue un sustrato en el cual la cantidad de biomasa (PBM) y de antibiótico producidos simultáneamente mejorarán la calidad de la dieta de los animales, utilizándolo como micronutriente alimentario.

La demanda de alimento animal en Centro América exige la utilización de sustitutos para el maíz y productos similares, así como, el mejoramiento del alimento para rumiantes.

Para buscar un producto final adecuado que llene estas necesidades, se utilizaron varios sustratos: maicillo o sorgo, cáscara de banano verde y maduro.

El microorganismo utilizado para realizar las fermentaciones fue el *Streptomyces cinnamonensis*, una bacteria filamentosa que posee la capacidad de producir biomasa y antibiótico(4).

### 3. ANTECEDENTES

Después de los trabajos realizados por Pasteur sobre fermentaciones alcohólicas y lácticas se han realizado otros descubrimientos sobre la utilidad de la microbiología industrial. En la década de los años 40, se marca el inicio de la microbiología industrial moderna con la biosíntesis de penicilinas usando los métodos de fermentación (5).

Los compuestos producidos por los microorganismos son innumerables, entre ellos: aminoácidos, coenzimas, lípidos, antioxidantes, solventes, vitaminas, polisacáridos, proteínas, antibióticos y otros; en la microbiología industrial los microorganismos utilizados para la producción de estos compuestos son las bacterias, los actinomicetes, los hongos y las levaduras (5).

Los antibióticos son metabolitos secundarios producto del metabolismo microbiano; los actinomicetes sintetizan cerca de 3000 antibióticos diferentes, en donde los **Streptomyces** son los mayores productores de los mismos (5, 6).

#### 3.1 *Streptomyces cinnamonensis*

Forma parte de un grupo de bacterias Gram positivo con capacidad de formar micelio sumamente fino, por lo que también son llamadas bacterias filamentosas (4, 7, 8). Normalmente se aíslan del suelo (4).

Se caracteriza por formar cadenas largas de conidias y frecuentemente, durante la fase vegetativa sufre entrecruzamientos, los cuales originan crecimiento hacia los extremos de los filamentos, dando lugar a ramificaciones (7, 8).

### 3.1.1 Características físicas y químicas

Su morfología colonial se caracteriza por presentar micelio aéreo de apariencia granular (4, 7, 8). Crece en condiciones aeróbicas, en rangos de pH entre 6.00 a 8.00 y de temperatura entre 25 y 37°C (4).

Químicamente se caracteriza por reducir los nitratos a nitritos. Utiliza como fuente de carbono la Glucosa, D-fructosa y el almidón. Además posee la capacidad de hidrolizar la caseína y la gelatina (4, 9-10).

### 3.1.2 Características de crecimiento en cultivo líquido

Este microorganismo puede crecer en medios donde el pH varíe considerablemente, aunque es aconsejable ajustarlo en un rango entre 6.5 a 7.5, dependiendo del medio empleado (4). Durante el proceso de fermentación el pH se hace alcalino (entre 7 a 9) (4, 9-11).

Para la producción de sustancias esenciales por *S. cinnamonensis* la literatura menciona la utilización de cultivos aeróbicos sumergidos (4, 9, 11, 12), donde la fuente de nitrógeno para el medio puede variar, recomendándose amonio, peptonas y harina de soya. Se usan ciertas sales inorgánicas (sales de sodio, potasio, amonio, calcio, cloruros y carbonatos) para optimizar el crecimiento de la bacteria y a su vez mejorar la producción del antibiótico (4, 9, 11, 13).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

El inóculo para iniciar la fermentación se realiza a partir de una suspensión de esporas de la bacteria en su forma vegetativa (4, 9, 11, 12), el crecimiento en cultivos con agitación es rápido

y se inicia el incremento celular a las 24 horas de incubación (12, 14).

En general, los microorganismos filamentosos, necesitan un buen crecimiento y excelente aireación para producir metabolitos secundarios, en este caso el **monensin**. Las bacterias, como el ***Streptomyces cinnamonensis***, necesitan grandes cantidades de oxígeno para producir cantidades importantes de células; por lo tanto, se aconseja utilizar pequeños volúmenes de caldo en frascos grandes acompañados de agitación (esta acción produce buena distribución del inóculo y del oxígeno transferido del aire, así como un crecimiento rápido y uniforme que propicia el trabajo bioquímico y genético del microorganismo) (14).

Durante la etapa de producción de antibiótico en el proceso de fermentación, Biot, Otake y otros (1984), mencionan que los ***Streptomyces*** producen pigmentos cuya tonalidad varía entre café, negro y rojo, olor característico a tierra mojada y al llevarse a cabo la fermentación, se observa en el medio la formación de filamentos largos y delgados (12).

Además, la literatura reporta que para incrementar la producción de monensin, se puede agregar al medio diferentes compuestos tales como aceites, vitaminas, sales de hierro, valina e isoleucina (13, 15-17).

### 3.1.3 Degradación de materiales por ***S. cinnamonensis***

La literatura no reporta específicamente actividad celulolítica y/o amilolítica por parte de este microorganismo. Pero varios científicos, entre ellos: Bull, (1982), Crawford & Sutherland

(1979) y Kirk & Chang (1981), detallan actividad sobre la lignina, la celulosa y el almidón por parte de diferentes especies de Streptomyces (18-20).

Específicamente, Chandra (1979) describe la detección de degradación de pelo, lana, seda, cuero y plumas por parte de Streptomyces sp (21).

Durante las últimas décadas se le ha dado mayor importancia al potencial que posee la aplicación de sistemas biolignocelulolíticos (en donde se usan sustratos como los desechos agroindustriales, granos y/o cereales, etc...), utilizando microorganismos que pueden crecer y producir sustancias beneficiosas, como los antibióticos (20, 22-23).

El crecimiento de dichos microorganismos en estos sustratos, propicia el mejoramiento y aprovechamiento de los mismos, debido a la adición de la proteína unicelular y del antibiótico, los cuales le proporcionan ciertas características que lo hacen utilizable como alimento animal (24-27).

### 3.2 Fermentaciones Sólidas:

Desde el inicio de la historia el hombre ha utilizado los microorganismos para su beneficio, jugando un papel importante los procesos de fermentación en estado sólido como fuente alimenticia en donde se han usando productos agrícolas y desperdicios como base para el crecimiento de hongos (tempeh, koji y otros similares) (5, 23, 28-29).

La fermentación en estado sólido se define como toda fermentación sobre la cual el sustrato no es un líquido, además de

poseer la característica de no ser soluble ni siquiera en suspensiones de volúmenes grandes de agua (5, 28-29).

La fermentación sólida ha sido utilizada a lo largo de la historia en la producción y preservación de varios alimentos, producción de enzimas, ácidos orgánicos, antibióticos y otros productos microbianos (5, 29). En la actualidad los procesos de fermentación sólida se usan a escala comercial para la producción de alimentos fermentados (particularmente en el Oriente), producción de metabolitos fúngicos y en la bioconversión de desechos domésticos, de plantas y animales (29).

En los años comprendidos entre 1940 y 1950, la industria de la fermentación con el descubrimiento de los antibióticos, puso en práctica la primera producción comercial de penicilina en sustratos sólidos, sin embargo, mas o menos a partir de 1960 se utilizan métodos de cultivo sumergido para la producción de antibióticos y enzimas fúngicas (29).

El desarrollo de cultivos sobre materiales sólidos se ha dirigido hacia la producción de alimento animal, a partir del enriquecimiento de residuos especialmente lignocelulósicos. Este enriquecimiento se debe a la presencia de micelio y a la liberación de sustancias solubles, así como a los cambios producidos en la matriz lignocelulósica (3).

En los países centroamericanos para la elaboración de concentrados (especialmente para aves), aproximadamente entre un 64-92% de los insumos protéicos de alta calidad son importados, es en este caso en donde toma auge producir un proceso de fermentación en

estado sólido para la producción de biomasa como fuente principal de proteína (30).

Los medios o sustratos sólidos deben poseer textura, estructura y porosidad bien definidas, pudiéndose utilizar como sustratos granos de cereales, productos vegetales, productos orgánicos o gránulos y/o fragmentos minerales con alto contenido en carbohidratos y/o proteínas (23, 28-29).

Las fermentaciones sólidas se caracterizan por (29):

- El sustrato sólido debe permitir la libre circulación del aire.
- Generalmente el único componente adicional requerido es el agua, sin embargo pueden agregarse otros nutrientes como fuentes de nitrógeno o minerales.
- Debido a que generalmente la humedad inicial no es muy alta, la posibilidad de contaminación bacteriana es baja.
- El control de la temperatura y de la atmósfera (con respecto a oxígeno, dióxido de carbono y metabolitos volátiles) puede ser necesaria.

En estas fermentaciones el valor nutricional de los alimentos cambia gracias a (28):

- La producción de enzimas digestivas.
- La destrucción de sabor y olor indeseable.
- La introducción de olor y sabor agradable.
- La conservación del alimento.
- La producción de vitaminas.
- El aumento de la digestibilidad.

El crecimiento de microorganismos en estado sólido se realiza



colocando el inóculo sobre una capa fina en el fondo de un frasco para permitir condiciones óptimas de aireación (28).

El crecimiento en la superficie de un sólido húmedo está sujeto a la influencia de propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad del sustrato, tamaño de la partícula, forma y estructura de la superficie (28-29).

### 3.3 Sustratos

Los sustratos que se utilizaron en esta investigación fueron cáscara de banano verde, cáscara de banano maduro y maicillo o sorgo.

#### 3.3.1 Cáscara de banano verde y maduro

El banano es uno de los productos de mayor comercio internacional. De la producción mundial una gran cantidad (aproximadamente un tercio de la producción) es utilizada como comida o alimentación local. El resto se reparte de la siguiente forma: Un tercio para la exportación y el resto queda como desperdicio o banano de rechazo (30-31).

En Guatemala el promedio de producción anual del banano en el año de 1985 fue de 7,807,264 quintales, de los cuales se exportaron 4,617,801.9 quintales (32).

El banano no exportado es aquel que queda ya sea para consumo local o que es rechazado por no llenar los requerimientos para ser consumido. Por lo tanto se ha considerado la posibilidad de utilizar el banano de rechazo para producir o manufacturar productos para el consumo humano o animal. El banano de desecho industrial es de fácil disponibilidad y presenta un alto potencial de

utilización en la alimentación animal como fuente calórica (1).

La cáscara del banano, fuente de protección para la fruta se elimina al consumirse y constituye uno de los mayores desperdicios agroindustriales que se acumulan sin ninguna utilización aparente (30).

El contenido de almidón (fruta verde) y posteriormente de azúcares reductores (fruta madura) en la cáscara es menor que en la pulpa (33, Anexo 7).

La hemicelulosa es más abundante en la cáscara que en la pulpa y decrece durante la maduración (30-33). También se encuentran sustancias del tipo catecol, así como taninos, los cuales decrecen con la maduración (33).

### 3.3.2 Maicillo o sorgo

El sorgo es un cereal que en las últimas décadas ha aumentado su demanda, debido a que su cultivo es de alta productividad y se adapta fácilmente a diversidad de climas (29).

El sorgo se ha utilizado como alimento para ganado, y su uso ha aumentado debido a que posee ciertas cualidades que favorecen su consumo, entre ellas su precio en el mercado y ciertas características físicas tales como: color, dureza (resiste el ataque de insectos), facilidad de cocción y de manipulación para hacer harinas (35).

El grano posee aproximadamente de 7-11% de proteína (ver Anexo 8). Debido a sus características físicas, el grano resiste la sequedad. Tiene su origen en Africa y se ha utilizado primordialmente como alimento (34-35).

En Guatemala el sorgo juega un papel importante en la alimentación, de una producción total de 17880.55 toneladas en el año de 1987, se reporta que 319.8 toneladas fueron utilizados como alimento para humanos y 284.5 toneladas fueron destinados para el consumo animal, el resto fue utilizado como semilla y otros usos (36).

#### 3.4 Producción de biomasa (PBM)

De acuerdo a la opinión de los expertos, los "alimentos clásicos" no serán suficientes en el futuro, las necesidades nutricionales van a cambiar y aumentar debido al crecimiento poblacional (2, 3, 37). Por ello se ha visto la necesidad de producir "alimentos novel", especialmente ricos en proteína, de donde la biomasa (cultivo a gran escala de microorganismos como fuente directa de proteína) se presenta como una alternativa (1-5, 29, 38, 37, 39).

Según investigaciones realizadas sobre la producción de biomasa en fermentaciones sólidas, se prefiere utilizar para el crecimiento microbiano, desechos agroindustriales como sustratos con alto contenido en almidón y materiales lignocelulósicos pretratados fáciles de degradar (para favorecer la hidrólisis enzimática por parte de las bacterias, hongos, levaduras o algas) (30, 37-39).

El producto final es material sólido enriquecido con proteína que puede ser utilizado como alimento (30, 37-40), esta proteína es conocida como proteína unicelular (5, 38).

Es importante tener en cuenta que la biomasa puede ser fuente no sólo de proteína sino que también de minerales, grasas y vitaminas (1). La importancia del uso de la biomasa se basa en que no es

dependiente del clima ni condiciones agrícolas, tiene una velocidad de crecimiento mayor aún que la de las plantas de más rápido crecimiento y su composición química es comparativamente similar a la de los alimentos para humanos y animales (1, 30, 38).

Además, el proceso de biodegradación durante la producción de biomasa proporciona una fuente accesible y económica para reducir los efluentes industriales, ya que todo el material de desecho es convertido en proteína, disminuyendo de esta forma la contaminación ambiental (38).

El crecimiento de un microorganismo en un sustrato sólido es difícil de medir, debido a que no es posible utilizar el peso seco como factor de cuantificación de la biomasa producida; por lo tanto se sugiere como método de cuantificación la determinación del nitrógeno por el método de Kjeldahl, donde se cuantifica el enriquecimiento del material inicial (1, 34).

### 3.5 Producción de antibiótico

#### 3.5.1 Monensin

A partir de la fermentación con *S. cinnamomensis* ATCC 15413 y el fraccionamiento de sus productos, es posible obtener antibiótico y un complejo coccidiostático A 3823, compuesto de cuatro factores. Cada uno de estos factores posee actividad antibiótica (4, 40-44).

Este complejo, llamado también **monensin**, es un poliéter utilizado en la alimentación de animales, principalmente ganado vacuno (41). La estructura de **monensin** fue determinada por primera vez en el año de 1967 y ha sido determinada casi totalmente por

análisis de las sales de sus átomos pesados (40, 42, 45)(Anexo 1).

Los antibióticos poliéteres forman parte de un grupo de compuestos ionóforos, que poseen la habilidad de formar complejos liposolubles que actúan como vehículos para que cationes monovalentes y divalentes puedan atravesar las barreras lipídicas (40-42, 47-48).

#### 3.5.1.1 Características físicas y químicas

El complejo de monensin es un sólido blanco cristalino, poliéter monovalente, ionóforo, cuyo punto de fusión es 103-106°C (4, 40, 44, 47-48).

Dicho complejo es soluble en los solventes orgánicos más comunes, como lo son: Benceno, ésteres, alcoholes, cetonas, cloroformo, dimetilformamida y éter (4, 42, 45, 49-52).

El complejo muestra marcado grado de estabilidad disuelto en soluciones básicas, perdiendo su actividad en soluciones ácidas (4, 44, 48). Puede ser almacenado por períodos de tiempo largos (4, 42), manteniendo sus características de transparencia y de no absorber la luz ultravioleta (42).

Los microanálisis del antibiótico, revelan alto contenido de oxígeno con pocos grupos hidroxilo (40-42). En estado cristalino se encuentra en su conformación cíclica, en cuyos extremos se encuentra un enlace H entre el grupo carboxilo y un hidroxilo terciario sobre el anillo tetrahidropirano terminal. El oxígeno se encuentra concentrado en el centro de la molécula y los grupos hidrofóbicos alcalinos se encuentran en la superficie (40-42, 47-48, 51-52).

### 3.5.1.2 Biosíntesis de monensin

Es el principal compuesto del complejo formado por cuatro antibióticos producidos por *S. cinnamonensis* (40-42) a partir de cinco moléculas de acetato, siete de propionato y una de butirato (40, 53-54).

Para mejorar la producción del antibiótico por parte de la bacteria, se han realizado estudios con cepas mutantes, plásmidos, ciertas sales y aminoácidos tales como la isoleucina y L-valina (53-59).

El antibiótico es sintetizado por el *S. cinnamonensis* como metabolito secundario a partir de fermentaciones líquidas con bastante aireación (4, 9, 11).

### 3.5.1.3 Usos

El monensin es usado para prevenir coccidiosis en pollos y para promover el crecimiento en bovinos y vacunos (61-62). En adición a lo anterior presenta actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivo (en general la bacteria más sensible al monensin es el *Bacillus* sp) y cierta actividad tóxica en las plantas (40, 60-61).

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Además se ha investigado el uso de monensin en el mejoramiento de la utilización de los alimentos por rumiantes, usando rumen fluido, el resultado obtenido es la alteración del proceso de fermentación del rumen al aumentar la producción de propionato y la disminución de la producción de butirato y acetato, así como el aumento en el volumen de producción del rumen (66); a su vez se ha comprobado que inhibe la metanogénesis en el mismo, debido a la

disminución del crecimiento de bacterias metanogénicas (67). Como efecto final, al agregar el antibiótico en el alimento para los animales, se logra mejorar el crecimiento de los mismos disminuyendo la cantidad de alimento consumido (67-69).

Por lo tanto el **monensin** se puede usar como aditivo que mejora y promueve el engorde del ganado, aumentando la eficiencia de las comidas y mejorando la calidad de la carne (70-72).

También se ha comprobado actividad contra la penetración en la célula y la replicación de los virus (73), además de prevenir enfisema y edema pulmonar en bovinos (74).

#### 3.5.1.4 Dosificación

Cuando el antibiótico se incorpora a los alimentos en cantidades bajas de 20-40 mg/kg o incluso 18 mg/kg se observan resultados satisfactorios en el crecimiento y alimentación de los animales. En ganado vacuno la dosis recomendada es de 5 a 30 g de **monensin**/ton de alimento (75-76).

Los pollos son tratados con dosis profilácticas de **monensin**, incorporando a las comidas 90 a 110 g/ton, los pavos son alimentados con dosis de 54 a 90 g/ton (59, 76-78).

#### 3.5.1.5 Aislamiento y determinación:

El **monensin** se puede aislar y determinar a partir de alimentos o sustratos sólidos previamente molidos y homogenizados. Para la extracción la literatura reporta utilizar como solventes acetona, metanol y cloroformo (59-60, 78, 80).

Se utilizan distintas técnicas para la cuantificación del **monensin**, ente ellas están las microbiológicas (técnica de difusión

en placa con cilindros y la técnica turbidimétrica) y las técnicas químicas que incluyen colorimetría, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta presión (4, 9, 11, 28, 60-61, 77-80).

Los microorganismos control utilizados en los métodos microbiológicos son el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y el *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 (9, 11, 78-80).



#### 4. JUSTIFICACIÓN

Cada día en Centro América, está aumentando la necesidad del uso de la biomasa, para mezclarla con harinas de ciertos granos o desechos agroindustriales (pulpa de café, banano verde, cáscara de banano verde y maduro, etc) con la finalidad de producir alimento balanceado para animales (2, 3).

Esta biomasa se obtiene a la vez con ciertos productos no renovables, entre ellos el gas natural, el alcohol y los antibióticos; Los cuales requieren de procesos tecnológicos establecidos y equipo especializado para poder elaborarse.

A causa de lo anterior, se han propuesto varios procedimientos que involucran la producción de biomasa y los subproductos a partir de fermentaciones sólidas, donde se utilizan sustratos lignocelulósicos o desechos agroindustriales para el crecimiento de bacterias u hongos filamentosos.

Para tal efecto, al utilizar *S. cinnamomensis* como bacteria fermentadora de tres sustratos diferentes, se produjo en una sola etapa biomasa y antibiótico.

Los sustratos propuestos en este estudio presentaron la alternativa de poder utilizarse como micronutrientes en el alimento animal al ser enriquecidos con biomasa y pequeñas cantidades de *monensin*.

Es importante hacer hincapié que en la actualidad, la producción de antibióticos se realiza a través de fermentaciones líquidas únicamente.

De tal manera, que el proceso de fermentación sólida fue el

instrumento utilizado en este estudio, para transformar los sustratos utilizados en fuentes de biomasa y antibiótico y poder ser agregados posteriormente en el alimento animal como parte de su formulación. Al mismo tiempo se presenta la opción de hacer utilizables desechos y granos que son producidos en nuestro país permitiendo el desarrollo de nuevas técnicas y el mejoramiento de los procesos de producción en Centro América.

5. OBJETIVOS

5.1 Producir **monensin** y biomasa simultáneamente a partir de fermentaciones sólidas aeróbicas utilizando un monocultivo.

5.2 Determinar las características morfológicas y de cultivo de *S. cinnamonensis* ATCC 15413 en el maicillo, la cáscara de banano verde y la cáscara de banano maduro.

## 6. HIPÓTESIS

Biomasa y antibiótico pueden producirse simultáneamente a partir de fermentaciones sólidas con *S. cinnamonensis*

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Universo de trabajo

Los elementos utilizados fueron la bacteria *S. cinnamonensis* ATCC 15413 , el material de desecho agroindustrial (cáscara de banano verde y maduro) y un monocultivo (maicillo), estos últimos fueron usados como sustratos.

### 7.2 Recursos humanos

Responsable Br. Marissa Ivonne Umaña Velásquez y coordinadores del proyecto: Lic. Roberto de León (asesor), y como colaboradores la Lic. Elizabeth de Porres y el Ing. Ricardo García.

### 7.3 Recursos materiales

El Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial-ICAITI, proporcionó los recursos materiales para desarrollar la investigación y se llevó a cabo la ejecución del trabajo en la División de Investigación Aplicada del mismo.

El material especializado que se utilizó fue:

- Incubadora a 32°C, marca Thelco.
- Incubadora a 35°C, marca Precision.
- Incubadora horizontal con agitación a 28°C, marca New Brunswick Scientific.
- Centrífuga IEC B-20A, marca Damon/IEC division.
- Espectrofotómetro, marca Baush & Lomb.
- Potenciómetro, marca Corning model 10.
- Potenciómetro, marca Kernco Instruments model 671.
- Balanza rango 30-300 g (3 decimales), marca Ohaus.
- Balanza rango 120-1200 g, marca Precision modelo Sartorius

3716MD.

- Microscopio, marca Wild modelo Herbrugg 10502.
- Autoclave, marca Castle.
- Horno a 60°C, marca Thelco - GCA/Presicion Scientific
- Estufas y agitadores (pyro-magnestir), marca Lab-line modelo 1266.
- Fermentador con capacidad de 5 litros, marca Fermentation Design.
- Cajas de petri con tapadera de cerámica.
- Cilindros de acero de 8mm. de diámetro \* 10mm. de alto.

Reactivos:

- Metanol grado reactivo.
- Medios de cultivo (ver anexos).
- Estandard de monensin (sal de sodio), Sigma.

#### 7.4 Procedimiento

Para lograr la producción de **monensin** es necesario llevar a cabo distintas etapas: producción de esporas, crecimiento vegetativo (inóculo para iniciar la etapa de producción de antibiótico) y crecimiento en sustratos sólidos para la producción del antibiótico por parte del *S. cinnamonensis* (ver diagrama de flujo, anexo 6).

Cada uno de los sustratos fueron preparados en frascos con tapón de rosca y se evaluaron los siguientes parámetros: a) análisis proximal (incluyendo la muestra inicial-hora cero, y cada submuestra que fue tomada cada 5 días por duplicado hasta finalizar el décimo quinto día de fermentación), b) descripción macroscópica y microscópica del crecimiento de *S. cinnamonensis* durante el desarrollo de la fermentación sólida, c) extracción y cuantificación del **monensin** producido en los distintos tiempos de muestreo.

##### 7.4.1 Cultivo del microorganismo. Crecimiento y mantenimiento de la cepa.

Para poder crecer y desarrollar al **Streptomyces** es necesario realizar los cultivos en diferentes etapas, estas son:

###### 7.4.1.1 Etapa de producción de esporas.

La siembra de la cepa fue hecha en tubos de ensayo con agar nutritivo en sesgue o inclinado (anexo 2) y se incubó 5 días a una temperatura aproximada de 30-32°C (4, 9,

###### 7.4.1.2 Etapa de crecimiento vegetativo

El inóculo se obtuvo agregando y raspando con 5 ml de agua destilada estéril el cultivo de esporas de *S. cinnamonensis*, con la finalidad de obtener una suspensión acuosa del mismo. Esta suspen-

si3n se utiliz3 como in3culo en el caldo para el crecimiento vegetativo, el in3culo fue de 1% (4, 9, 11. Anexo 3). El medio con el in3culo vegetativo se agit3 por 48 horas a 30°C en un fermentador vertical cuya capacidad es de 5 litros con una agitaci3n a 280 RPM (4, 9, 11, 12).

#### 7.4.1.3 Etapa de producci3n de antibi3tico.

En la fermentaci3n s3lida, el in3culo para la producci3n del antibi3tico se obtuvo a partir del crecimiento vegetativo en el fermentador vertical. Se llevaron a cabo dos fermentaciones s3lidas con cada uno de los sustratos; la primera fermentaci3n se hizo con un in3culo del 5% y la segunda se realiz3 con un 10% de in3culo (peso/volumen).

Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos de aproximadamente 300 g de capacidad, en los cuales, se agregaron 50 g de cada sustrato m3s igual peso de agua deionizada sin ning3n tratamiento espec3fico; con excepci3n de la c3scara de banano verde y maduro que se corto en cuadros de aproximadamente 1 cm y se colocaron en los frascos sin agregarles agua.

El tiempo de esterilizaci3n de los frascos preparados con los sustratos fue de una hora a 121°C y 15 lb de presi3n. La fermentaci3n tuvo una duraci3n de 15 d3as incubando a una temperatura de 28°C. Se sacaron muestras cada 5 d3as en duplicado por cada sustrato.

#### 7.5 Extracci3n y Cuantificaci3n del antibi3tico

El m3todo de extracci3n que fue utilizado es el descrito en el AOAC y en la literatura (Kavanagh, (1972), Haney, et al. (1970) y



otros), el método sugerido es la extracción usando solventes orgánicos con posterior agitación de la muestra, para la cuantificación del antibiótico se utiliza el método de difusión en placa con cilindros de metal. Esta técnica utiliza una capa de agar impregnada con el microorganismo test: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, sobre la cual se colocan los cilindros de metal con las soluciones analizadas (4, 9, 11, 14, 60, 80).

#### 7.5.1 Preparación de soluciones standard

- Solución patrón de 1 mg/ml de la sal de sodio de monensin. La solución debe almacenarse a 5°C y prepararse con metanol anhidro como diluyente (11, 60, 80).

- Solución de trabajo de 100 ug/ml. Preparada con metanol acuoso (1:1::metanol:agua). Esta solución debe ser preparada cada vez que se use (11, 60, 80).

#### 7.5.2 Curva de trabajo

Se corre una curva de soluciones standard a la par de las muestras analizadas. Las diluciones se preparan a partir de la solución de trabajo con metanol acuoso. Las concentraciones recomendadas son 0.25, 0.50, 1.00 y 2.00 ug/ml. La concentración de referencia es la de 0.50 ug/ml y se utiliza para corregir los valores obtenidos en el análisis (80, 82).

#### 7.5.3 Análisis de las muestras

Se pesan 10 g del alimento o sustrato utilizado con 100 ml de metanol anhidro. Se mezclan bien y se dejan reposar durante toda la noche. Luego se procede a separar las partículas del sobrenadante por centrifugación y la solución obtenida se diluye

con metanol acuoso para su análisis posterior (60).

#### 7.5.4 Ensayo. Preparación de las cajas

Se utilizan esporas de *B. subtilis* llevadas a una suspensión de 20% de transmitancia a 530 nm con agua estéril. De esta suspensión se agregan 0.5 ml a 100 ml de medio (60, 80. Anexo 4) y en la caja se coloca una capa de agar con inóculo sencillo (60, 80-82).

#### 7.5.5 Determinación

Las cajas con la capa de agar son la base donde se colocan los 6 cilindros de acero y el lugar donde se vierten las soluciones analizadas con la solución de referencia en forma intercalada (60, 80, 81-82).

En total se preparan tres cajas por muestra, para obtener 9 lecturas para cada solución (14).

#### 7.6 Otros procedimientos

Para lograr determinar las características de *S. cinnamonensis* se realizaron algunas técnicas, las cuales se describen a continuación.

##### 7.6.1 Actividad celulolítica.

Se usó la técnica de interacción del rojo congo y polisacáridos (6, 84-85). Esta técnica se basa en el desarrollo de una tinción que evidencia el sustrato soluble o insoluble, con una zona de hidrólisis sobre el agar. Para realizar la técnica se incubó el *S. cinnamonensis* inoculado en cajas con agar (anexo 5) durante 5 días a 30°C. Al término de este tiempo se agrega una solución de rojo congo, cuya concentración es de 1mg/ml y, se deja por 15 minutos. Posteriormente se trata con NaCl 1M durante 15 minutos, al

terminar este tiempo, se observa la hidrólisis producida por el microorganismo en forma de zonas claras alrededor del inóculo o crecimiento.

#### 7.6.2 Actividad amilolítica.

La técnica consiste en agregar 0.2% de almidón soluble a el agar o caldo basal nutritivo, se esteriliza y se coloca en cajas de petri o tubos (con o sin rosca). Después de inocular con la bacteria e incubar, se embebe la caja con lugol diluido. La prueba se interpreta de la siguiente forma: Ausencia de color púrpura azulado es indicativo de hidrólisis, color café-rojizo indica hidrólisis parcial y el color azul, es indicativo de ausencia de hidrólisis (76, 83-85).

#### 7.6.3 Determinación de biomasa

Se realizo la determinación de la biomasa a partir de la cuantificación de nitrógeno por el método de Kjeldahl (1, 2, 3, 28).

#### 7.6.4 Método estadístico

Las variables de esta investigación fueron:

- Variables independientes: formadas por cada uno de los sustratos, el microorganismo productor de la biomasa (*S. cinnamomensis*) y el antibiótico.
- Variables dependientes: la producción de biomasa, (expresada como porcentaje de nitrógeno en base seca de cada sustrato), producción de antibiótico (expresado por la presencia o ausencia de inhibición en el crecimiento de *B. subtilis* al ponerlo en contacto con los extractos analizados) y la potencia del antibiótico expre-

sado en ug/ml y/o ug/g de sustrato.

En base a la definición de las variables el diseño estadístico utilizado fue el análisis de varianza, con aplicación de la t de Student.

## 8. RESULTADOS

Durante los procesos de fermentación la bacteria presentó las siguientes características de crecimiento:

- En cultivos líquidos: formó filamentos delgados y pigmentos que variaron desde el color café hasta el rojo, además de un característico olor a tierra mojada.
- En cultivos sólidos: se caracterizó por presentar una morfología colonial típica de apariencia arenosa y/o cerebroide de color blanco, con formación de pigmento rojo así como el olor característico que ya fue mencionado anteriormente. Microscópicamente, utilizando tinción de Gram, la bacteria se observó como largos filamentos ramificados Gram positivo, que conforme se desarrollaba formaba conidias entrecruzadas.

Al realizar las pruebas para determinar actividad celulolítica y amilolítica, el **Streptomyces** presentó las siguientes características: en la técnica de rojo congo, se observó una zona clara de hidrólisis alrededor del área donde se había sembrado la bacteria; y en la técnica de la amilasa los resultados obtenidos fue ausencia de color púrpura, por lo tanto se interpreta como que el **Streptomyces** si tiene actividad amilolítica.

Como se puede observar en las siguientes tablas, al utilizar el sorgo el *S. cinnamonensis* presentó una mejoría tanto en la producción de biomasa como de antibiótico al aumentar la concentración del inóculo inicial (no siendo así con la cáscara de banano verde o maduro):

TABLA No. 1 Concentración de Monensin en cáscara de banano verde inoculado con una suspensión de 10% y 15% de *S. cinnamomensis* durante 15 días de incubación.

Tiempo (días)	Concentración de Monensin (ug/ml)	
	10%	15%
5	< 0.25	< 0.25
10	< 0.25	< 0.25
15	< 0.25	< 0.25

TABLA No. 2 Concentración de Monensin en cáscara de banano maduro inoculado con una suspensión de 10% y 15% de *S. cinnamomensis* durante 15 días de incubación.

Tiempo (días)	Concentración de Monensin (ug/ml)	
	10%	15%
5	< 0.25	< 0.25
10	< 0.25	< 0.25
15	< 0.25	< 0.25

TABLA No. 3 Concentración de Monensin en sorgo inoculado con una suspensión de 10 y 15% de inóculo de *S. cinnamonensis* durante 15 días de incubación.

Tiempo (días)	Concentración de Monensin (ug/ml)	
	10%	15%
5	1.74	6.67
10	5.14	15.43
15	14.98	18.90

UNIVERSIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Tabla No. 4 Concentraciones de Nitrógeno en 3 diferentes sustratos inoculados con una suspensión del 10% y 15% de inóculo inicial con *S. cinnamomensis* durante 15 días de incubación.

Sustrato	Tiempo (días)	Concentración de nitrógeno(%,bs)	
		10%	15%
Cáscara	0	1.01	<u>0.87</u>
de	5	0.95	1.16
Banano	10	0.93	1.05
Verde	15	0.91	1.09
Cáscara	0	1.12	1.20
de	5	1.45	1.20
Banano	10	1.47	1.31
Maduro	15	1.57	1.30
Sorgo	0	1.14	1.19
	5	1.51	1.51
	10	1.63	1.66
	15	1.72	2.24



Tabla No. 5 Análisis de regresión lineal por sustratos en la determinación de biomasa vs. tiempo.

SUSTRATO	% DE INOCULO	EC. DE LA RECTA	VAL. DE R
SORGO	10	$\text{LOG } Y = 0.1222 + 0.00589X$	
	15	$\text{LOG } Y = 0.0587 + 0.01815X$	0.7706
CASCARA DE BANANO V.	10	$Y = 0.9980 - 6.4E-3X$	-0.9562
	15	$Y = 0.9653 + 9.41E-3X$	0.5520
CASCARA DE BANANO M.	10	$Y = 1.2438 + 0.0283X$	0.8450
	15	$Y = 1.1803 + 0.0102X$	0.7560

Tabla No. 6 Análisis de regresión lineal para el sorgo en la determinación de producción de monensin vs tiempo.

% DE INOCULO	EC. DE LA RECTA	VALOR DE R
10	$\text{LOG } Y = -0.226 + 0.0935X$	0.9999
15	$\text{LOG } Y = 0.6439 + 0.0452X$	0.9431

TABLA NO. 7

Composición macrocomponente del sorgo y la cáscara de banano verde y maduro con 10 % de inóculo (g/100g).

SUSTRATO	Tiempo	Humedad	pH	Acidez	Azucares Tot.	Almidón	Nitrógeno	Cenizas	Polifenoles
S O R G O	0	6.05	6.9	0.01	6.75	67.07	1.14	1.86	--x--
	5	1.80	6.4	0.04	1.83	60.69	1.45		--x--
	10	7.05	6.55	0.04	0.25	54.76	1.63	1.43	--x--
	15	7.90	6.4	0.63	0.25	62.45	1.53	1.69	--x--
CASCARA DE BANANO VERDE	0	7.14	9.60	1.03	5.26	53.18	1.01	4.00	0.63
	5	8.84	4.70	1.03	3.82	51.58	0.95	2.00	0.36
	10						0.93	5.12	
	15	9.02	4.5	1.07	0.15	54.70	0.91	7.26	0.37
CASCARA DE BANANO MADURO	0	13.20	5.02	1.82	62.00	7.43	1.12	12.55	2.65
	5	14.08	5.75	0.10	28.42	6.48	1.46		0.54
	10	19.03	4.70	2.05	0.60	6.69	1.47	17.48	1.46
	15		4.47	2.19	0.71	7.76	1.57	17.31	

TABLA NO. 8

Composición macrocomponente del sorgo y la cáscara de banano verde y maduro con 15 % de inóculo (g/100g).

S U S T R A T O	Tiempo	Humedad	pH	Acidez	Azucares Tot.	Almidón	Nitrógeno	Cenizas	Polifenoles
S O R G O	0	5.99	6.10		4.64	74.21	1.19	1.35	--x--
	5	5.84	5.6	0.11	2.58	70.03	1.50	1.57	--x--
	10	6.99	6.35	0.06	3.12	72.58	1.45	2.18	--x--
	15	6.36	6.35	0.10	4.64	58.24	1.45	2.13	--x--
CASCARA DE BANANO VERDE	0	8.81	4.85	0.76	5.77	61.31	0.87	4.22	2.06
	5	4.89	5.0	0.85	7.72	57.78	1.16	1.08	
	10	9.68	4.7	0.83	21.68	70.30	1.05	4.82	
	15	6.42	6.25	0.07	2.98	56.25	1.09	3.49	2.13
CASCARA DE BANANO MADURO	0	18.73	5.1	1.64	42.24	7.69	1.20	12.51	4.39
	5	17.58	5.1	1.56	46.80	10.68	1.20	11.03	5.29
	10	19.71	5.0	1.67	45.51	8.89	1.33	14.19	
	15	19.75	5.1	1.72	49.07	9.16	1.30	12.92	2.25

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados observados, se lograron duplicar las características típicas reportadas en la literatura tanto en la morfología colonial como en la morfología microscópica del *S. cinnamonensis*, como lo son el olor a tierra mojada, formación de micelio aéreo con apariencia granular, filamentos delgados y pigmento de color rojo.

En cuanto al análisis de producción de biomasa los valores de  $r$  obtenidos en la cáscara de banano verde y maduro (tabla No. 5) demostraron que no hay relación entre el tiempo y el crecimiento del *Streptomyces* y que a su vez, este no mejora al aumentar el % de inóculo inicial; El crecimiento de la bacteria no fue lo suficientemente rápido como para considerarlos un buen sustrato en donde pudiese la bacteria crecer en cantidad suficiente y producir el antibiótico (tabla No. 1, 2 y 4). Esto podría explicarse basándose en la existencia de sustancias fenólicas en la cáscara, que pudieron de alguna forma inhibir el crecimiento. También la morfología del sustrato, el cual debido a su granulometría, pudo constituir una barrera física que podría dificultar la accesabilidad de la bacteria a los nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo.

Se puede argumentar que el aumento en el inóculo inicial de 10 a 15% así como la utilización de un sustrato adecuado favorece la producción de antibiótico, no así la de biomasa. Esto se confirma en las tablas de la 1 a la 6 en donde el sorgo demostró ser el mejor sustrato logrando obtenerse cantidades de antibiótico cuanti-

ficables y crecimiento evidente de la bacteria; sin embargo en el caso de la biomasa las concentraciones de nitrógeno obtenidas no difirieron al variar el % de inóculo del 10 al 15% (ver tabla No. 1 - 3). Es importante hacer notar que en el caso del sorgo no se observa relación directa entre la producción de biomasa y el tiempo (ver tabla No.5). Sin embargo, los valores de  $r$  obtenidos en el análisis de concentración de **monensin** vs. tiempo en el sorgo, demuestran que si se observa un comportamiento lineal entre dichas variables (ver tabla No. 6).

Como se puede observar en el diseño estadístico utilizado, al obtener la ecuación de la recta se utilizó un modelo logarítmico con la finalidad de obtener la mejor ecuación de la recta (ver tabla No. 5 y 6).

La finalidad de esta investigación era producir alimento enriquecido para animales sin embargo, la cantidad requerida por la literatura de **monensin** (18 mg/kg de alimento) no se logro obtener.

## 10. CONCLUSIONES

10.1 De acuerdo a los resultados obtenidos, la producción de **monensin** en el sorgo, se mejoró al aumentar el inóculo inicial del 10 al 15%.

10.2 La cáscara de banano verde y maduro, bajo las condiciones de trabajo en esta investigación, no se consideran sustratos adecuados para el crecimiento de *S. cinnamomensis* y por lo tanto, para la producción del antibiótico.

10.3 El crecimiento de la bacteria en los sustratos utilizados en esta investigación no guarda relación lineal con el tiempo.

10.4 La cantidad de antibiótico obtenida en las fermentaciones no son lo suficientes como para tener efecto aditivo en el engorde ni profiláctico sobre los animales.

10.5 La bacteria *Streptomyces cinnamomensis* es capaz de crecer en sustratos con alto contenido en almidón o celulosa.

10.6 El mejor sustrato utilizado en esta investigación para la producción de antibiótico fue el sorgo.

## 11. RECOMENDACIONES

11.1 Realizar pruebas utilizando nuevos sustratos, tales como pulpa de café, harina de banano y otros.

11.2 En el caso del sorgo y la cáscara de banano, realizar pruebas modificando las condiciones de trabajo durante la fermentación sólida (esto es: enriquecer con sales inorgánicas como fuente de nitrógeno, variar las condiciones de pH, modificar la granulometría del sustrato, etc) para lograr mejorar el crecimiento de la bacteria y de esta forma favorecer la producción de metabolitos secundarios como lo es el **monensin**.

11.3 Debido a que los microorganismos filamentosos necesitan un buen crecimiento y excelentes condiciones de aireación para producir sus metabolitos secundarios, se recomienda hacer las fermentaciones sólidas con agitación, lo cual probablemente mejorará el crecimiento del **Streptomyces**.

11.4 La cáscara de banano verde y maduro resultaron ser sustratos pobres para el desarrollo del **Streptomyces**, se sugiere la posibilidad de producir altas concentraciones de antibiótico en granos de cereales, para que puedan ser utilizados como micronutrientes en la formulación de raciones alimenticias para animales.

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
Biblioteca Central

## 12. REFERENCIAS

1. UPEB. Seminario sobre prioridades en la investigación; Banano y plátano. Colombia, Doc. Tec. 87, 111, 121-123 pp. 1977.
2. Rolz C et al. Fermentaciones en sustratos sólidos. Guatemala: ICAITI, Doc. Tec. No. 1, 1982.
3. Rolz C et al. Fermentaciones en sustratos sólidos. Guatemala: ICAITI, Doc. Tec. No. 2, 1984.
4. Haney ME, Hoehn MM, McGuire JM. Patente oficial de los Estados Unidos 3501568. Novel Antibiotic A3823 complex and process for production thereof. Indianapolis: Eli Lilly and Company, 1970. 16p.
5. Sasson, A. Bio-technologies: challenges and promises. Francia: ISBN, 1984. (p. 157, 215-237) 315 pp.
6. Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysacharid interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microbiol 1982; 43 (4):777-780.
7. Buchanan RE y Gibbons NE coed. Bergey's Manual of determinative bacteriology. USA: Williams & Wilkins Company, 1974. (p. 747) 1267 pp.
8. Skerman VBD. A guide to identification of the genera of bacteria. USA: Williams & Wilkins Company, 1967. (p. 187-190) 303 pp.
9. Haney ME, Hoehn MM. Monensin, a new biologically active compound; I. Discovery and isolation. USA: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Doc. Tec. No.1, 349-352pp. 1967.
10. Matejue J, Marsalkova J, Nohymek M, Steinerova N. Mutant strains of *S. cinnamonensis* protoplasts: Cultural and physiological conditions. Czechoslovaquia: Folia Microbiol 1991: 36(1):42-48.



11. Stark WM, Knox NG, Westhead JE. Monensin, a new biologically active compound; II. Fermentation studies. USA: Ant. Agent Chem. Doc. Tec. No. 2, 1967. (p.353-358).
12. Dekker Inc. eds. Biotechnology of industrial antibiotics. USA: 1984; 22:695-741.
13. Pospisil S. Resistance of *S. cinnamomensis* to butyrate and isobutyrate: Production and properties of a new anti-isobutyrate (AIB) factor. Czechoslovakia: J Gen Microbiol 1991; 137 (9):2141-2146.
14. Demain AL, Solomon NL. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1986. (p.13-16, 25-26, 59, 410-415) 466 pp.
15. Kalovcova E, Krumphanzl V, Vanek . Improving the production of Monensin by *S. cinnamomensis*. Folia Microbiol. 1984; 29 (1):35-42.
16. Tichy P, et al. Biology of *S. cinnamomensis* and production of Monensin. 285-295. (In Sermonti G, Pennella F, Spalla C, eds. Proceedings of the second european conference on industrial microbiology. Milan, Italy: 1983).
17. Mateju J, Nedbalova E, Vanek Z. Vitamins as effectors of monensin production by *S. cinnamomensis*. Czechoslovakia: Folia Microbiol 1990; 35 (5):460-462
18. Bull AT, Slater H, eds. Microbial interactions and communities vol 1. London: Academic Press. 1982; (p.505) 567 pp.
19. Crawford DL, Sutherland JB. The role of actinomycetes in the decomposition of lignocellulose. Dev. Ind. Microbiol. 1979; 20:143-151.

20. Kirk TK, Chang HM. Potential applications of bio-ligninolytic systems. *Enzyme Microbiol Technol.* 1981; 3 (3):189.
21. Chandra AL. Degradation of organic nitrogenous wastes by a soil *Streptomyces*. *Folia Microbiol.* 1979; 24 (6):473-477.
22. Schomburg I, Mueller HE. The role of microorganisms producing antibiotics in the biological waste water treatment. *Zentrabl. Bakteriolog. Mikrobiol.* 1984; 2:162-169.
23. Garcia, R. Memorias del simposium latinoamericano: Biotecnología para la producción de biomasa y tratamiento de desperdicios. ICAITI: Guatemala. 1987. 455 p.
24. Rust SR, et al. Corn moisture, protein concentration and rumen-  
sin and digestion by feedlot steers. *Okla. Agric. Exp.* 1979; MF-104:55-59.
25. Phelan MB, Crawford DL, Ponetto AL. Isolation of lignocellulose decomposing actinomycetes and degradation of specifically 14 C-labeled lignocelluloses by 6 selected *Streptomyces* strains. *Can. J. Microbiol.* 1979; 25 (11):1270-1276.
26. Carrillo LE. Wheat straw: digestibility and utilization by steers as affected by processing and the addition of Monensin, starch and protein. Tucson: Univ Arizona. 1979. 112p.
27. Chen M & Wolin MJ. Efecto de Monensin y Lasalocid-Na sobre el crecimiento de bacterias metanogénicas y sacarolíticas del rumen. USA: *Appl Environ Microbiol*, 1979; 38(1):72-77.
28. Raimbault M. Fermentation in milieu solide. Francia: ORSTOM, 1981. (p. 23-97) 291pp.
29. Aidoo KE, Hendry R and Wood JB. Solid substrate fermentations.

- p 201-233 (in Laskin AI, ed. *Advances in Applied Microbiology*. Vol 28. USA:1982) 282pp.
30. BCIE. Cuarto informe de progreso: Enriquecimiento protéico del banano. Guatemala: ICAITI. Doc. Tec. 11-42pp. 1985.
31. Banana fibre procesing. Alemania: Atlanta edit. Doc. Tec. 1975. 181 pp.
32. INE. Anuario estadístico de comercio exterior. Guatemala: 1984-1987.
33. Von Loesecke HW. Bananas. Vol.1 2 ed. USA: Interscience Publishers Inc., 1950. (p. 1-126) 189 pp.
34. Matz SA. Cereal Science. USA: The Avi Publishing Company Inc, 1969. (p. 78-172) 241 pp.
35. Dendy D. Proceedings of a symposium on sorghum and millets for human food. London: Chairman edit, Tropical Products Institute, 1977. (p. 7-12) 138 pp.
36. INE. Encuesta agrícola de granos básicos. Guatemala: Publicaciones estadísticas temáticas, 1984-1987. (p.96) 98 pp.
37. Ferranti MP, Fiechter A. Production and Feeding of single cell protein. London: Appl Science publishers, 1983. (p. 104, 115, 159).
38. Lee Chung, S. Bioprotein from banana wastes. A dissertation submitted to graduate. Lousiana State University. 1976. 112p.
39. Baldensperger J, Le Mer J, Hannibal L and Quinto PJ. Solid state fermentation of banana wastes. France: Biotech Letters 1985; 7 (10):743-748.
40. Westley JW. Polyether antibiotics: Versatil Carboxylic acid ionophors produced by **Streptomyces**. USA: Adv in Appl Microbiol

1977; 22:177-220.

41. Vladimir B. The chemistry and biology of antibiotics. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1983. (p.343-509) 590 pp.

42. Pospisil S, et al. Biosynthesis of monensin. Czechoslovakia: J Antibiot 1983; 36 (5):617-619.

43. Day LE, et al. Biosynthesis of monensin. Antimicrob Agents Chemoter 1973; 4 (4):410-414.

44. Lui C et al. Novel polyether antibiotics X1466A y X1466B from *S. cinnamonensis* subsp. *urethanofaciens*. Discovery, fermentation, biological as well inophore properties and taxonomy of the producing culture. J Antibiot 1981; 34 (10):1241-1247.

45. Westley JW, Berger J. The polyether antibiotics. p.407-411, 783,1009. (in Laskin & Lechavelier eds. Handbook of microbiology. Vol. 3. USA: 1973) 1143 pp.

46. Hamill RL, Grandall LW. Polyether antibiotics. USA: Elseiver Scientific Publ. Co., 1978. (p. 479-520).

47. Lutz WK, inkler FK, Dunitz JD. Crystal structure of the antibiotic monensin. Similarities and differences between free acid and metal complex. Helv Chim Acta 1971; 54 (4):1103-1108.

48. Agtarap A, Chamberlain JW. Monensin, a new biologically active compound. IV Chemistry. Antimicrob Agents Chemother 1968; 1 359-362.

49. Anteunis MJO, Rodin NA. Solution conformation of monensin free acid, a typical representative of the polyether in antibiotics. Bioorg Chem 1978; 7 (1):47-55.

50. Pointed Y, et al. Volumes of some ionophorous antibiotics according to their state in solution. Acid forms, anion and sodium and potassium salts. London: J Chem Soc 1981; I 77 (1):1-8.
51. Gertenbach FG, Popov A. Solution chemistry of monensin and its alkali metal ion complexes. Potentiometric and spectroscopic studies. J Am Chem Soc 1975; 97 (16):4738-44.
52. Hoogerheide JG. Physical chemical studies of the antibiotic ionophore monensin and its complexes. USA: Michigan State Univ 1978. 202p.
53. Ireland RE, Norbeck DW, Mandel GS, Mandel NS. The convergent synthesis of polyether ionophore antibiotics: an approach to the synthesis of the monensin tetrahydropyran-bis (tetrahydrofuran) via the ester enolate claisen rearrangement and reductive decarbonylation. J AM Soc 1985; 107 (11):3285-3294.
54. Pospisil S, Imburkova E, Kruphanzl V, Vanek Z. Effect of precursors on biosynthesis of monensin A and B. Czechoslovakia: Folia Microbiol 1985; 30 (1):30-33.
55. Pospisil S, Vanek Z, Krump-Hanzl V. Biosynthesis of monensins and regulatory mutants of *Streptomyces cinnamonensis*. Czechoslovakia: Biosinteza 1985; 31 (7-8):162-163.
56. Van Nevel CJ, Demeyer DI. Efecto de monensin sobre el metabolismo del rumen in vitro. Bélgica: Appl and Env Microbiol 1977; 34 (3):251-57.
57. Pospisil S ,et al. Biosynthesis of monensin A y B: the role of isoleucine. Czechoslovakia: Folia Microbiol 1986; 31 (1):8-14.
58. Mateu J, et al. Production of monensins by strains of *Strep-*

- toomyces cinnamonensis* resistant to propionate. Checoslovaquia: Kvasny Frum 1986; 32 (5):110-111.
59. Pospisil S, et al. Regulation of biosynthesis of monensins chemically defined medium. Folia Microbiol 1982; 27 (4):275-277.
60. Kavanag F. Analytical Microbiology II. USA: Academic Press, 1978. (p. 9, 53, 108-110, 295-301) 707 pp.
61. Macy TD, Loh A. Drugs in feeds: High pressure liquid chromatographic determination of monensin in feed premixes. J Assoc of Anal Chem 1983; 66 (2):284-286.
62. Barathova H, Betina V , Nemeč .Actividad antimicrobiana in vitro de los poliéteres. Folia Microbiol 1969; 21:355-361.
63. Liu CM, Westley J. Monensin urethane derivates. USA: Hoffman-La Roche Inc. Patente oficial US 964564, Date 781129 (p.12).
64. Animal drugs, feeds and related products; monensin, bacitracin, methylene disalicylate, roxarsone. V.S. Food and drug Adm. Fed Regist 1982 (p. 47, 212, 49639-40).
65. Willis Cm, Boling JA. Level of protein with and without monensin for finishing steers fed at controlled intake. Nutr Rep Int 1982; 25 (2):399-407.
66. Bakker P. Ionophore antibiotics: Antibiotics V-1. Mechanism of action of antibacterial agents. Alemania: Springer-Verlag Publ., 1979. (p. 67-97).
67. Jong A de, Buschauer. Adaption effects of ionophores on rumen fermentation. Symposium on herbivore nutrition in the subtropics and tropics. S Afr J Anim Sci 1983; 13 (1):67-70.
68. Bogan JA. Monensin. Med Actual 1976; 12(6):246-248.

69. Vijchulata P. Effect of monensin in ruminants feed diets varying in source of energy, fiber and nitrogen. Dissertation. USA: University of Florida, 1978. (p. 160).
70. Lui CM. Urethane derivatives and their salts and the use of these products in the promotion of the growth of animal. Hoffman-La Roche F. European Pat Appl. EP 11859 Date 800611. (Application:US 954564).
71. Boucque W, et al. Monensin -sodium as a performance-promoting additive for fattening bullr and its impact on carcass and meat quality characteristics. Anim Feed Sci Technol 1982; 7 (4):401-10.
72. Anónimo. New animal drug for use in animal feeds: monensin sodium and 3-nitro-4OH fenil arsonic acid. Fed Regist Food Drug Adm 1971. (p. 36, 138, 13268).
73. Varel VH, Hashimoto AG. Efecto de la dieta con monensin o clorotetraciclina sobre la producción de metanol por desechos de ganado. USA: Appl Environ Microbiol 1981; 41 (1):29-34.
74. Marsh M, et al. Monensin inhibits semliki forest virus penetration into culture cells. USA: Proc Natl Acad Sci. 1982; 79 (17):52-97-5301.
75. Chen M, Wolin MJ. Efecto de monensin y lasalocid-Na sobre el crecimiento de bacterias metanogénicas y sacarolíticas del rumen. Appl Environ Microbiol 1979: 38 (1):72-77.
76. Microbiological assay of low levels of monensin in animal feeds. Antibiotics in animal feedinstuffs sub-comites. Analyst. 1981; 106 (1264): 788-89.
77. Golab T, Barton SJ, Scroggs RE. Colorimetric method for monen-

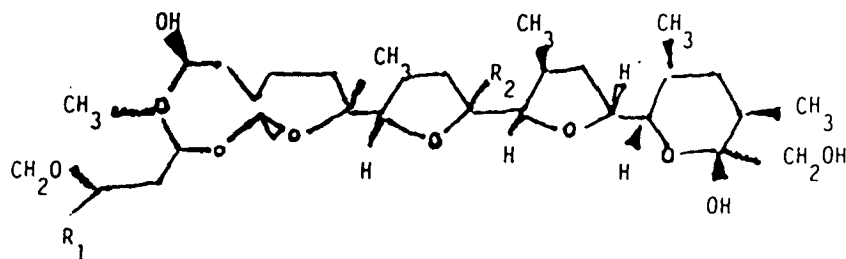
- sin. J of AOAC 1972; 56 (1):171-173.
78. Kline M, et al. Antibiotics: Microbiological assay of monensin in chicken rations. J of AOAC 1970; 53 (1):49-53.
79. Kavanagh , Willis M. Automated photometric microbiological assay for monensin in poultry rations. J of AOAC 1972; 55(1):114-118.
80. Abe T, Ono T. Determination of Monensin sodium in formulated feed. Tokyo Hishiryō Kenshō, 1980; 6:114-121.
81. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists (AOAC). USA: The Williams Byrd Press 14 ed, 1984. (p. 813-823) 1018 pp.
82. 21 CFR Ch1. 558.355
83. Fogarty W. Microbial enzymes and biotechnology. England: Applied science publishers, 1983. (p.3-72 y 184) 382 pp.
80. Smith RE. Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. Canada: Appl Environ Microbiol 1977; 33 (4):980-981.
84. Guibault GG. Enzymatic methods of analysis. Great Britain: Pergamon Press, 1973. (p.43-44, 289, 296) 347 pp.
85. Manual of microbiological methods. Society of American Bacteriologists. Magraw-Hill Co., 1957. (p. 55, 162-163) 315 pp.



## 13. ANEXOS

## Anexo 1

## ESTRUCTURA MOLECULAR DE MONENSIN



MONENSIN:  $R_1 = -CH(CH_3)COOH$

$R_2 = C_2H_5$

FACTOR B:  $R_1 = -CH(CH_3)COOH$

$R_2 = CH_3$

FACTOR C:  $R_1 = -(CH_2)_3COOH$

$R_2 = CH_3$

Ref.: 8

## Anexo 2

Medio para mantenimiento y producción de esporas

Componente	Cantidad (g/l)
Casaminoácidos	5
Glicerol	5
Dextrina	5
Melaza	10
Levadura	5
$K_2HPO_4$	1
Solución Patrón	5 ml
Agar	20
Agua deionizada	1000 ml

Ajustar Ph entre 7.6 a 7.8

Ref. 5

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

## Solución Patrón

Componente	Cantidad (g/l)
KCl	100
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100
FeSO <sub>4</sub>	2 ml
HCl (c)	2 ml

Ref. 5

## Anexo 3

## Medio para Crecimiento Vegetativo

Componente	Cantidad (g/l)
Glucosa	15.0
Peptona	5.0
Extracto de levadura	5.0
CaCl <sub>2</sub>	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.6
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0.3
Ref. 5	

## Anexo 4

Componente	Cantidad (g/l)
$K_2HPO_4$	0.69
$KH_2PO_4$	0.45
Extracto de Levadura	2.50
Glucosa Anhydra	10.00
Agar	15.00

Ajustar Ph a 6.0 con HCl

Ref. 76

## Anexo 5

## Medio para la prueba de Rojo Congo

Componente	Cantidad (g/l)
Agar	0.800
Carboximetilcelulosa	0.100
Celobiosa	0.025
Almidón	0.050
Xilano	0.050
Solución mineral 1	1.870 ml
Solución mineral 2	1.870 ml
Tripticasa	0.200
Agua deionizada	92.260 ml

Ref. 79

## Solución mineral 1:

Componente	Cantidad (g/l)
$K_2HPO_4$	$1.3 \times 10^{-3}$ M
NaCl	$7.6 \times 10^{-4}$ M
$(NH)_2SO_4$	$3.4 \times 10^{-3}$ M
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$3.8 \times 10^{-4}$ M

## Solución mineral 2:

Componente	Cantidad (g/l)
$K_2HPO_4$	$1.7 \times 10^{-3}$ M
CaCl	$4.1 \times 10^{-4}$ M
Ref. 79	

ANEXO 6

PROCEDIMIENTO

I. CULTIVO DEL MICROORGANISMO ( etapa de esporulación )  
Sembrar una asada del microorganismo en tubos con agar inclinado.



Incubar de 30 - 32°C / 5 días

Raspar la superficie del agar con 5 ml de agua estéril. Hacer un inóculo al 1% de esta suspensión en un fermentador de 5 litros de capacidad.



Incubar a 30°C / 48 hrs y 280 RPM

II. PRODUCCION DE ANTIBIOTICO

Inóculo al 5%



Inóculo al 10%



A 50 gramos del sustrato agregar igual peso en agua desionizada.

Incubar a 28°C / 15 días

Muestree cada 5 días por duplicado.



## ANEXO 7

### COMPOSICION MACROCOMPONENTE FRUTA FRESCA (BANANO) EN 100 kg.

#### PULPA

Peso (fresca)	59
Peso seca:	15.3
azúcar	0.36
almidón	11.55
fibra	0.24
grasa	0.06
Prot. cruda	0.71
cenizas	0.48

#### CASCARA

Peso (fresca)	41
Peso seca:	4.1
azúcar	0.22
almidón	1.78
fibra	0.40
grasa	0.22
Prot. cruda	0.28
minerales	0.52

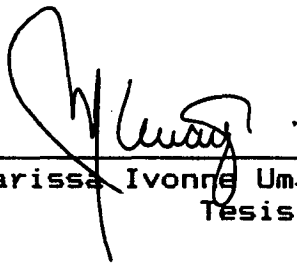
## ANEXO 8

## COMPOSICION DEL GRANO DE SORGO

COMPONENTE*	PROMEDIO
Humedad	15.5
Proteína	11.2
Grasa	3.7
Cenizas	1.5
Azúcares reductores	1.8
Almidón	74.1
Fibra cruda	2.6

\* en base seca

Ref. 29



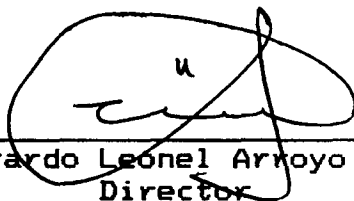
---

Marissa Ivonne Umaña Velásquez  
Tesisista



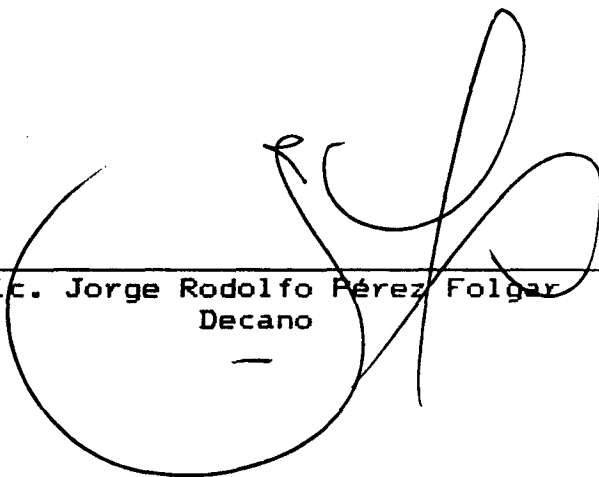
---

Lic. Roberto De León  
Asesor



---

Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Director



---

Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar  
Decano