



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNO-  
LOGÍA Y MATERIALES

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AGENTES  
TERAPÉUTICOS EN *STREPTOMYCES*  
*LEEUWENHOEKII* C34 DEL DESIERTO DE ATACAMA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

MARTÍN CLEMENTE ALFONSO BONILLA ZÚÑIGA

PROFESOR GUÍA:  
BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE  
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE  
2019



**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:**  
Ingeniero Civil en Biotecnología e Ingeniero Civil Químico  
**POR:** Martín Clemente Alfonso Bonilla Zúñiga  
**FECHA:** 13/05/2019  
**PROFESOR GUIA:** Barbara Andrews Farrow

La resistencia a antibióticos generada en las bacterias es un fenómeno natural que se ve acelerado por el uso excesivo e inadecuado de los antibióticos, lo que genera una necesidad por descubrir nuevos compuestos bioactivos que puedan suplir esa función. *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 es una bacteria del desierto de Atacama que produce metabolitos llamados chaxamicinas y chaxalactinas, los cuales poseen bioactividad contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli*.

En este proyecto se buscan las condiciones óptimas para la producción de metabolitos especializados mediante la optimización de las condiciones de temperatura y pH, y concentración de glicerol en el medio de cultivo. Para ello, se estudia la diferencia en el nivel de producción de chaxamicinas mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento producidos en placas de Petri inoculadas con *S. aureus* y expuestas al medio de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34. Adicionalmente, se realizan simulaciones en el modelo de escala genómica iVR1007 de *S. leeuwenhoekii* C34 para realizar predicciones y comparar con los resultados experimentales.

Se obtuvo las condiciones óptimas de los parámetros, que corresponden a 33 [°C], pH 6 y 65 [g/L] de glicerol para crecimiento, y 37 [°C], pH 6,5-7 y 5 [g/L] de glicerol para producción de metabolitos especializados. A partir de la optimización de la concentración de glicerol, se obtuvo un valor máximo para la producción de metabolitos especializados de 5,428 [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>], que es 135 veces más alto que el caso no optimizado. Las condiciones óptimas obtenidas se encuentran dentro de los rangos entregados por estudios previos para el caso de producción y para el caso de crecimiento, salvo para pH. Se determinó que la mejor alternativa para producción industrial era separar el proceso en una fase de crecimiento y otra de producción. Dicho proceso tentativo utiliza menor cantidad de insumos que las alternativas de síntesis química (representados por la ciprofloxacina en este estudio) presentes en el mercado, insumos que, en contraste, no son tóxicos.

Las tendencias para crecimiento y producción de metabolitos predichas por las simulaciones coinciden en términos generales con las de los resultados experimentales. Sin embargo, se aprecian ciertas diferencias causadas en parte porque el modelo no incluye restricciones relacionadas con elementos regulatorios.

## Dedicatoria

Esta memoria está dedicada a mi padre, Jorge Enrique Bonilla Menchaca, y a mi madre María Cecilia Zúñiga Caro.

## Agradecimientos

Agradezco a mi padre, a mi madre y a mis hermanos por su infinito apoyo durante toda mi vida. Agradezco a mis amigos por haber compartido conmigo inolvidables momentos y haberme apoyado cuando lo necesité. Agradezco a la profesora Barbara Andrews, al profesor Juan Asenjo y a Valeria Razmilic por su apoyo y buena disposición para ayudarme a enfrentar los distintos desafíos que se presentaron a lo largo de este trabajo, y a Stephanie Brain y la profesora María Elena Lienqueo por su colaboración.

## Tabla de contenido

1. Introducción .....	1
1.1. Optimización de cultivos.....	5
1.2. Antibiograma .....	6
1.3. Efectos de T, pH y nutrientes sobre crecimiento y producción de metabolitos en <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> C34.....	8
1.3.1. Concentración de nutrientes.....	8
1.3.2. Variación de temperatura .....	8
1.3.3. Variación de pH .....	10
1.4. Modelos de escala genómica.....	12
1.2. Motivación.....	13
1.4. Justificación.....	13
1.5. Objetivos .....	13
1.6. Alcances.....	14
1.7. Limitaciones .....	14
2. Materiales y metodología.....	16
2.1. Materiales.....	16
2.1.1. Cultivos de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 .....	16
2.1.2. Extracción de proteínas .....	16
2.1.3. Bioensayos .....	16
2.1.4. Peso seco.....	16
2.2. Metodología .....	17
2.2.1. Cultivos de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 .....	17
2.2.2. Extracción de proteínas .....	18
2.2.3. Bioensayos .....	18
2.2.4. Peso seco.....	19
3. Resultados y Discusión.....	20
3.1. Resultados Experimentales.....	20
3.1.1. Variación de temperatura .....	21
3.1.2. Variación de pH .....	23
3.1.3. Variación de glicerol .....	25
3.1.4. Comparación entre dos fuentes de carbono.....	29
3.2. Sobre las simulaciones computacionales.....	35

3.2.1.	sim_1_fuente .....	37
3.2.2.	sim_1_fuente_pro .....	38
3.2.3.	sim_glic_alt .....	41
3.2.4.	sim_gli_vs_glu .....	44
3.2.5.	sim_u10i5_vs_i10 .....	50
3.2.6.	Comentarios generales .....	52
3.3.	Comparación entre las simulaciones y los resultados experimentales, y comentarios generales .....	54
3.4.	Comparación a nivel de producción industrial .....	58
	Metabolitos especializados de <i>S. leeuwenhoekii</i> .....	58
	Proceso productivo de antibióticos de origen sintético .....	59
	Ventajas y desventajas .....	61
4.	Conclusiones .....	62
5.	Bibliografía .....	64
6.	Anexos .....	71
1.	Ejemplos de cálculo .....	71
1.1.	Tratamiento de datos .....	71
1.2.	Contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de metabolitos. ....	72
2.	Composición detallada del medio de cultivo .....	73
3.	Medios .....	74
3.1.	Medios líquidos .....	74
3.2.	Medios sólidos .....	75
4.	Análisis de contribución relativa de glucosa y glicerol .....	75
5.	Producción de ciprofloxacina .....	77
6.	Rutas metabólicas relacionadas con el acetato .....	79

## Índice de Tablas

Tabla 1: Medios de producción de chaxamicinas y chaxalactinas. ....	5
Tabla 2: Condiciones óptimas experimentales de cultivo para el crecimiento y producción de metabolitos especializados. ....	28
Tabla 3: Crecimiento reportado por los experimentos (Biolog) y por las simulaciones realizadas en el GSM (V. R. y M. B.).....	37
Tabla 4: Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de metabolitos especializados según el modelo iVR1007.....	38
Tabla 5: Composición del extracto de levadura utilizada para las simulaciones [64], [65], [66]. ....	73
Tabla 6: Composición del extracto de malta utilizada para las simulaciones [64], [65] y [66]. ....	74
Tabla 7: Concentraciones de reactivos para el medio mISP2 en agua destilada[67] .....	74
Tabla 8: Concentración de los componentes del medio líquido LB en agua destilada [68]. ....	74
Tabla 9: Concentraciones de los componentes del medio LB agar con agua destilada como base[68]. ....	75
Tabla 10: Características de la glucosa y del glicerol.....	75
Tabla 11: Características de las alimentaciones u10i5 e i10.....	76
Tabla 12: Contribución de cada fuente de carbono a la “producción unitaria” de metabolitos especializados para cada alimentación.....	76
Tabla 13: Toxicidad de los reactivos utilizados en la producción de ciprofloxacina. ....	78
Tabla 14: Rutas metabólicas, genes asociados a la producción y consumo de acetato, y la relación que tienen con glucosa o glicerol dentro de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34.....	79



## Índice de Figuras

Figura 1: Estructura de las chaxamicinas y chaxalactinas. ....	4
Figura 2: Antibiograma de discos. ....	7
Figura 3: Efecto de la concentración de glucosa [g/L] sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en <i>S. tanashiensis</i> A2D. ....	8
Figura 4: Efecto de la temperatura de incubación [°C] sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en <i>S. tanashiensis</i> A2D. ....	9
Figura 5: Temperatura vs biomasa y radio del halo de inhibición en cultivos de <i>S. albidoflavus</i> . ....	9
Figura 6: Efecto del pH sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en <i>S. tanashiensis</i> A2D. ....	10
Figura 7: Efecto de la variación de pH sobre el crecimiento de <i>Streptomyces fhermoviolaceus</i> y producción de proteína extracelular (granaticina). ....	11
Figura 8: Variación de pH sobre producción de biomasa y metabolitos especializados en <i>S. albidoflavus</i> . ....	11
Figura 9: Resultados experimentales para la variación de temperatura [°C] vs producción de biomasa [gDW L <sup>-1</sup> ]. ....	21
Figura 10: Resultados experimentales para el radio del halo de inhibición de crecimiento para los distintos cultivos realizados a diferentes temperaturas. ....	22
Figura 11: Resultados experimentales para la razón halo/biomasa al realizar los cultivos a distintas temperaturas. ....	22
Figura 12: Resultados experimentales para la producción de biomasa obtenida en función de la variación de pH entre 6 y 8. ....	24
Figura 13: Resultados experimentales para el radio del halo de inhibición de crecimiento al variar las condiciones de cultivo entre pH 6 y 8. ....	24
Figura 14: Resultados experimentales para la razón entre el halo de inhibición de crecimiento [cm] y el peso seco de biomasa [gDW/L] obtenida al variar el pH. ....	25
Figura 15: Peso seco obtenido [g/L] a partir de la variación en la concentración de glicerol [g/L]. ....	26
Figura 16: Variación del radio del halo de inhibición de crecimiento en función de la cantidad de glicerol alimentada. ....	26
Figura 17: Resultados experimentales para la razón halo/biomasa al variar la cantidad de glicerol alimentada. ....	27
Figura 18: Comparación entre la producción de biomasa alcanzada para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la temperatura. ....	30
Figura 19: Contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de biomasa. ....	31
Figura 20: Comparación entre el radio del halo de inhibición de crecimiento obtenido para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la temperatura. ....	32
Figura 21: Comparación entre la producción unitaria obtenida para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la temperatura. ....	33
Figura 22: Contribución relativa de la glucosa y el glicerol a la producción unitaria de metabolitos especializados según la alimentación. ....	34
Figura 23: Tasa de crecimiento simulado para <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 en medio ISP2 con glicerol como principal fuente de carbono. ....	41

Figura 24: Producción de chaxamicina A al variar la concentración de glicerol y fijando la tasa de crecimiento en un 10, 30, 70 y 100 % de la correspondiente al caso default. ....	42
Figura 25: Producción de chaxalactina A al variar la concentración de glicerol. ...	43
Figura 26: Concentración de glucosa vs Tasa de crecimiento de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34 y uptake de glucosa. ....	44
Figura 27: Concentración de glucosa [g/L] vs Producción de chaxamicina A [ $\text{mmol gDW}^{-1}\text{hr}^{-1}$ ]. ....	45
Figura 28: Concentración de glucosa [g/L] vs producción de chaxalactina A [ $\text{mmol gDW}^{-1} \text{hr}^{-1}$ ]. ....	46
Figura 29: Efecto de la alimentación mixta [g/L] sobre la tasa de crecimiento de <i>S. leeuwenhoekii</i> C34. ....	47
Figura 30: Efecto de la alimentación mixta [g/L] sobre la producción de chaxamicina A en <i>S. leeuwenhoekii</i> C34. ....	48
Figura 31: Efecto de la alimentación mixta [g/L] sobre la producción de chaxalactina A en <i>S. leeuwenhoekii</i> C34. ....	49
Figura 32: Tasa de crecimiento para las alimentaciones u10i5 e i5. ....	50
Figura 33: Producción de chaxamicina A para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la tasa de crecimiento. ....	51
Figura 34: Producción de Chaxalactina A para las alimentaciones u10i5 e i10 para distintas tasas de crecimiento. ....	52
Figura 35: Diagrama de flujo de un proceso de producción de chaxamicinas a nivel industrial. ....	58
Figura 36: Diagrama de flujos de la producción de ciprofloxacina. ....	59
Figura 37: Reacciones de formación de ciprofloxacina [62]. ....	77

## 1. Introducción

Desde el comienzo de la historia de la humanidad, e incluso desde mucho antes, el hombre ha tenido que convivir con todo tipo de microorganismos, resultando en relaciones tanto beneficiosas como nefastas para las personas. Dentro de las últimas están las infecciones, que consisten en la proliferación de microorganismos patógenos en el cuerpo.

Los antibióticos son sustancias capaces de eliminar microorganismos de forma específica. En 1909, el doctor y bioquímico alemán *Paul Ehrlich* descubrió que cierto pigmento de anilina teñía de forma selectiva ciertas bacterias, lo que le dio la idea de utilizar dichas sustancias para tratar enfermedades causadas por bacterias [1][2]. En 1909 logró utilizar exitosamente la arsfenamina para tratar la sífilis. En 1928, el doctor, micólogo, microbiólogo y farmacólogo escocés Alexander Fleming vio contaminados sus cultivos de *Staphylococcus* por el hongo *Penicillium notatum*, y observó que *Staphylococcus* no crecía en las cercanías de las colonias de *P. notatum*. A partir de dicho hongo logró purificar el compuesto conocido como penicilina [2].

Según la World Health Organization [3] y otras fuentes [4][5], los términos antibacterial y antibiótico son sinónimos mientras que antimicrobial se refiere al conjunto de sustancias que elimina los distintos tipos de microorganismos. Sin embargo, otros expertos como el Dr. Godfred A. Menezes [6] y el profesor Alaa Hani Al-Charrakh<sup>1</sup> [7] concuerdan en que antibiótico en realidad es sinónimo de antimicrobial y no de antibacterial, que resulta más lógico dada la etimología de la palabra [8].

La resistencia a antibióticos es una característica que adquieren los microorganismos (es de interés el caso de las bacterias) que les confiere inmunidad frente a sustancias que originalmente eran capaces de eliminarlos [9]. Normalmente, la adquisición de esta característica se lleva a cabo a través de mutaciones en el genoma de las bacterias, que tienen lugar durante el transcurso de varias generaciones. Sin embargo, dicho proceso se ve acelerado por el uso innecesario o indebido de antibióticos, sumado a la capacidad de transferencia de genes por parte de las bacterias resistentes expuestas a antibióticos, hacia las bacterias no resistentes [10]. Todos estos factores provocan que los antibióticos conocidos pierdan su efectividad contra las bacterias que antes eran capaces de eliminar. Esto representa un gran riesgo para la salud humana y la seguridad de los alimentos, ya que el número de infecciones para las que los antibióticos ven reducida su actividad está en aumento [11].

Por lo anterior, se ha recurrido a ambientes aislados con condiciones extremas de salinidad y temperatura para encontrar microorganismos capaces de producir metabolitos especializados que aún no hayan sido utilizados, y que posean

---

<sup>1</sup> Professor and former head of Medical Microbiology department at Babylon University ([https://www.researchgate.net/profile/Alaa\\_Al-Charrakh](https://www.researchgate.net/profile/Alaa_Al-Charrakh))

bioactividad contra bacterias patógenas. Tal es el caso del filo actinomicetas, bacterias gram-positivas aeróbicas y anaeróbicas [12] que se caracterizan por formar hifas ramificadas. Las actinomicetas que se encuentran en ambientes aislados poseen un gran potencial para producir compuestos bioactivos inexplorados [13] y son la principal fuente de antibióticos clínicamente relevantes, que suelen ser muy complejos para ser sintetizados a través de combinaciones de reacciones químicas [14].

Entre las actinomicetas se encuentran los órdenes *actinobacteria*, *actinoplanetes*, *maduromycetes*, *micropolysporas*, *multilocular*, *nocardioform*, *streptomyces* y *thermomonosporas*. Sus hábitats incluyen el suelo, el agua, nódulos de raíces de plantas y materia orgánica en descomposición [15]. Son conocidas por su capacidad de producir compuestos bioactivos, entre los cuales destacan los antibióticos eritromicina, streptomycin, vancomicina, actinomicina, daptomicina, streptotricina y tetraciclina [14].

Dentro de las actinomicetas se encuentra el género *Streptomyces*, compuesto por bacterias aeróbicas, quimioorganotróficas, filamentosas, gram positivas que contienen un alto contenido de GC (guanina y citosina) en sus genomas (70 %) [16]. Son responsables del 32,1 % de la producción de sustancias bioactivas, representando un 45,6 % de los antifúngicos y antibacterianos registrados en la ABL2 en 2001 [17].

Dentro del género *Streptomyces* se encuentra *Streptomyces leeuwenhoekii* C34, una bacteria extremófila que fue aislada desde una muestra de suelo proveniente de la laguna de Chaxa, ubicada en el desierto de Atacama [11], y descrita como nueva especie en 2014. Su línea filogenética se encuentra alejada de otras especies de su género, como lo respalda el análisis de secuencia de multi-locus (MLSA por sus siglas en inglés) realizada usando 5 genes conservados (*atpD* (ATP synthase F1, beta subunit), *gyrB* (DNA gyrase B subunit), *rpoB* (RNA polymerase beta subunit), *recA* (recombinase A) and *trpB* (tryptophan synthetase, beta subunit)), y posee características químico taxonómicas distintas a las de otras especies del género *Streptomyces* [18]

*S. leeuwenhoekii* C34 se caracteriza por producir los metabolitos especializados chaxamicinas y chaxalactinas [18], los cuales poseen bioactividad contra *Staphylococcus aureus* y *E.coli*. El primero es responsable de enfermedades como septicemia, endocarditis infecciosa, infecciones del tejido suave y piel (por ejemplo, impétigo, foliculitis, furúnculos, carbúnculos, celulitis, síndrome de la piel escaldada, entre otras), osteomielitis, artritis séptica, infecciones en prótesis, infecciones pulmonares (por ejemplo, neumonía y empiema), gastroenteritis, meningitis, síndrome de shock tóxico, e infección del tracto urinario [19]; *E. coli* puede producir diarrea sangrienta, y en ocasiones falla renal e incluso la muerte.

Las chaxamicinas son policétidos estructuralmente similares a las ansamicinas. Actualmente se han descubierto 4 tipos de chaxamicinas llamadas chaxamicinas A, B, C y D. Se ha reportado que estas moléculas poseen actividad antibacteriana

---

<sup>2</sup> Antibiotic Literature Database

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, y adicionalmente, tienen la capacidad de inhibir la actividad ATPasa de la proteína Hsp90 [3][4][22], por lo que tienen potencial para ser usadas en terapias antitumorales[23].

A continuación, se puede apreciar la estructura de las chaxamicinas y chaxalactinas:

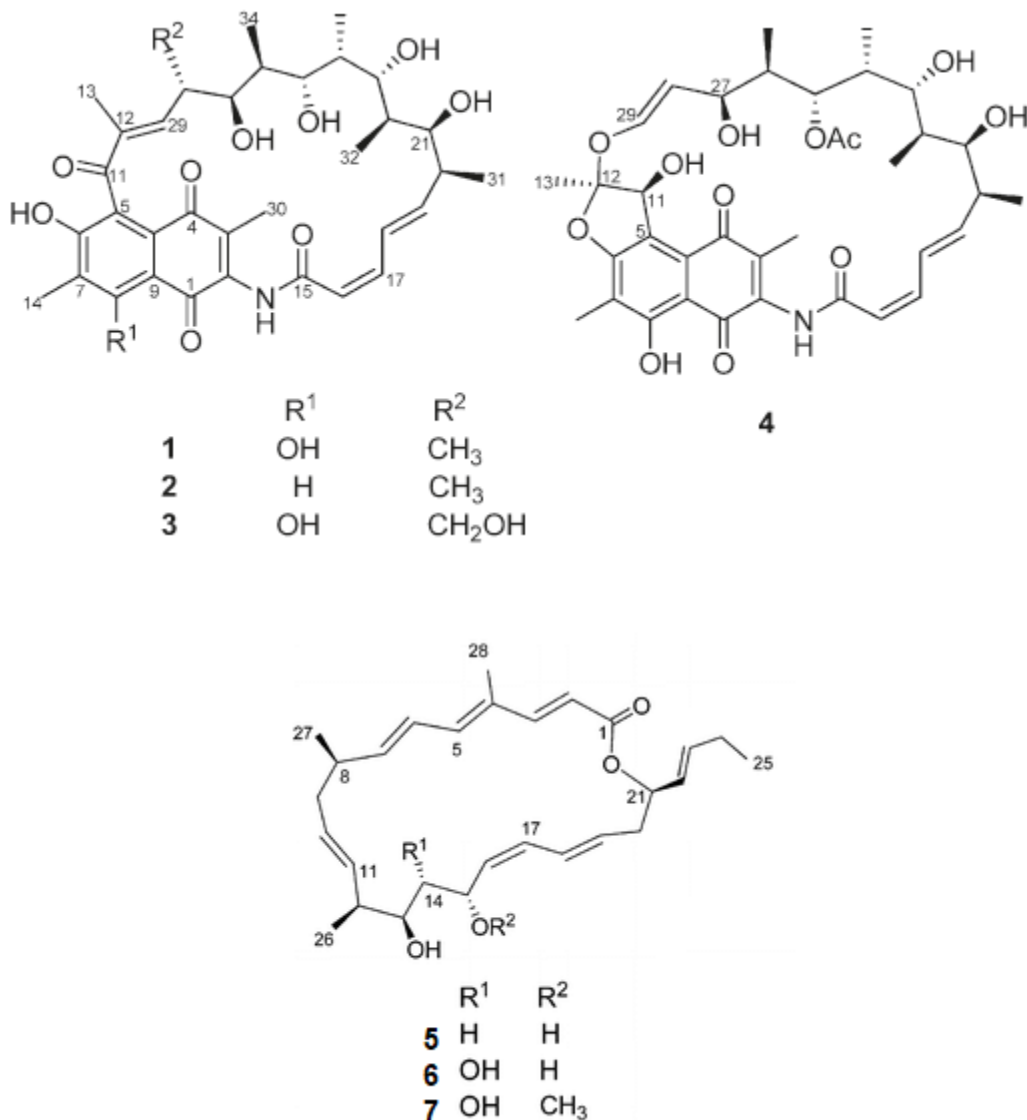


Figura 1: Estructura de las chaxamicinas y chaxalactinas.

Arriba a la izquierda se ve la estructura común para chaxamicinas A, B y C (o compuestos 1, 2 y 3) teniendo en cuenta las variaciones en  $R^1$  y  $R^2$  que se especifican bajo la molécula. Arriba a la derecha se encuentra el compuesto 4 (o chaxamicina D). Abajo se encuentra la estructura común para chaxalactinas A, B y C (o compuestos 5, 6 y 7) [20].

Se ha estudiado la producción de metabolitos especializados de *S. leeuwenhoekii* C34 en distintos medios de cultivo. En la Tabla 1 se muestran los resultados relevantes para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas [24]. Cabe mencionar que se encontraron numerosos y diferentes metabolitos especializados

distintos de las chaxamicinas y chaxalactinas, pero no se mencionan en este documento al no ser relevantes para el proyecto.

Tabla 1: Medios de producción de chaxamicinas y chaxalactinas.

Compuesto	Medios
Chaxamicina A	<i>Yeast extract glucose (GYE), soya flour mannitol (SFM), potato dextrose (PD).</i>
Chaxamicina B	<i>International Streptomyces Project (ISP)2, malt extract peptone (MEP), modified Fries media 1 &amp; 2.</i>
Chaxamicina C	<i>Modified ISP2 medium (glycerol instead of glucose).</i>
Chaxamicina D	<i>Modified ISP2 medium (glycerol instead of glucose).</i>
Chaxalactinas A-C	<i>Defined medium<sup>3</sup>, using glycerol as carbon source.</i>

Se encontró que chaxamicina A fue el metabólico más producido en todos los medios, por lo que esta molécula puede ser útil como un marcador para esta especie[24].

Adicionalmente, se determinó que el medio de cultivo utilizado no solo determina la cantidad producida de ciertos metabolitos, sino que también activa rutas metabólicas que provocan la producción de compuestos pertenecientes a variadas naturalezas químicas. Al cultivar la bacteria en medio ISP2, se obtuvieron los compuestos 1 y 2 (ver Figura 1), mientras que al realizar el cultivo en el medio modificado, reemplazando la glucosa por glicerol, se obtuvieron los compuestos 1,3 y 4 [20].

## 1.1. Optimización de cultivos

A continuación, se exponen los métodos de optimización para fermentaciones.

### 1.1.1. Un factor a la vez

En el método de un factor a la vez (OFAT por sus siglas en inglés) se dejan todos los factores constantes exceptuando el que se quiere variar. Éste último se hace variar en un rango determinado para estudiar el efecto que provocan sus cambios en la producción de un compuesto. Se divide en las siguientes categorías[25]:

**Experimentos de remoción:** En este tipo de método, se remueven los componentes del medio uno a la vez, y se estudia la producción de un metabolito en cada caso tras un periodo de incubación apropiado.

<sup>3</sup>Composición del medio definido [g/L]: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.0), NH<sub>4</sub>Cl (1.5), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.5), NaCl (0.5), glycerol (10), myo-inositol (0.4), monosodium l-glutamate monohydrate (5.0), NaF (0.084), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.025), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.01), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.01), CaCO<sub>3</sub> (0.25), p-aminobenzoic acid (0.001), pH 7.0 [24].

**Experimentos de suplementación:** Se añaden compuestos a modo de suplementos al medio de cultivo y se observa su efecto en la producción del compuesto de interés.

**Parámetros físicos:** Se hacen variar las condiciones físicas del medio, es decir, presión, temperatura, aireación y agitación dentro de rangos deseados y se observa el efecto obtenido en la producción del compuesto de interés.

### 1.1.2. Diseño de experimentos (DE)

En este método de optimización se realiza una serie de experimentos planeados estratégicamente para obtener mayor información sobre el efecto de más de un parámetro sobre la producción de un compuesto de interés [25]. Según propone Fisher en una teoría básica sobre diseño experimental, cambiar más de un parámetro del cultivo al mismo tiempo puede resultar más eficiente que variar solamente un parámetro a la vez [26].

Dentro de DE existen metodologías para determinar los componentes con efectos más relevantes sobre el cultivo, tales como *Plakett Burman* design (PBD) en el que se realizan experimentos clásicos para separar las variables relevantes de las irrelevantes, y se calcula su efecto. Si bien este método es útil para reducir el número de experimentos y variables a observar, y por ende gasto de tiempo y dinero, no toma en cuenta que hay efectos de factores que pueden ser dependientes de otros factores, y debería usarse únicamente cuando no existe interacción entre los factores o tienen efectos aditivos sobre la producción del metabolito. También está *Taguchi design*, que toma en cuenta PBD y las interacciones entre 2 factores a la vez, lo que aumenta la calidad del diseño final[25].

Luego, se tienen los métodos para optimizar la concentración de los componentes seleccionados anteriormente:

## 1.2. Antibiógrama

Es una técnica para determinar la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico. Consiste en inocular una placa de Petri con el microorganismo objetivo, y poner en contacto con la superficie expuesta y húmeda del medio de cultivo un disco de papel de filtro impregnado con el antibiótico que se quiere probar, el cual difundirá hacia el medio. Se deja incubar por entre 18 y 24 horas y luego se mide el halo de inhibición de crecimiento, o HIC, alrededor del disco de papel.

El tamaño del HIC está dado por la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico para un microorganismo determinado, que se encuentra en la frontera entre crecimiento y no crecimiento del microorganismo. Todos los puntos dentro del HIC poseen una concentración de antibiótico mayor que la CMI, por lo que dentro del HIC se inhibe el crecimiento del microorganismo. Mientras mayor sea la concentración del antibiótico en la solución, se podrá encontrar concentraciones mayores a la CMI más lejos del origen, y en consecuencia, el HIC será más grande.



Dependiendo del tamaño del HIC, la sensibilidad del microorganismo frente al antibiótico se clasifica como sensible (S), intermedia (I), o resistente (R) según los criterios de la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI por sus siglas en inglés)<sup>4</sup> [28], [29].

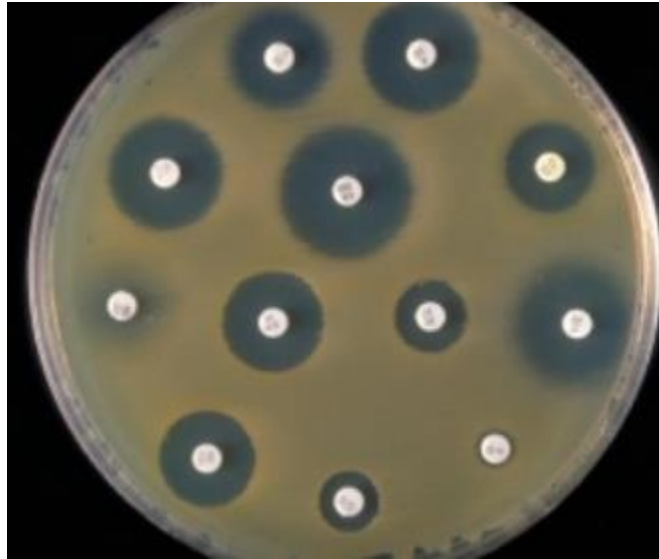


Figura 2: Antibiograma de discos.

Una alternativa al antibiograma de discos es el antibiograma de pozos mostrado en la Figura 2 [30], en el cual se hacen pozos cilíndricos en el agar seco y se introduce la solución con antibiótico al interior del pozo, que luego difundirá a través del agar. Esta variación ha sido utilizada anteriormente para la optimización de las condiciones de cultivo en otras cepas de *Streptomyces* para crecimiento y producción de antibióticos [31], [32].

---

<sup>4</sup> Hasta 2005 CLSI era conocida como National Comitee for Clinical Laboratory Standard.

### 1.3. Efectos de T, pH y nutrientes sobre crecimiento y producción de metabolitos en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34

#### 1.3.1. Concentración de nutrientes

A continuación, se muestran ejemplos de gráficos obtenidos para el crecimiento y producción de metabolitos especializados en cultivos de distintas cepas de *Streptomyces*, sometidos a variaciones en la concentración de su fuente de carbono principal:

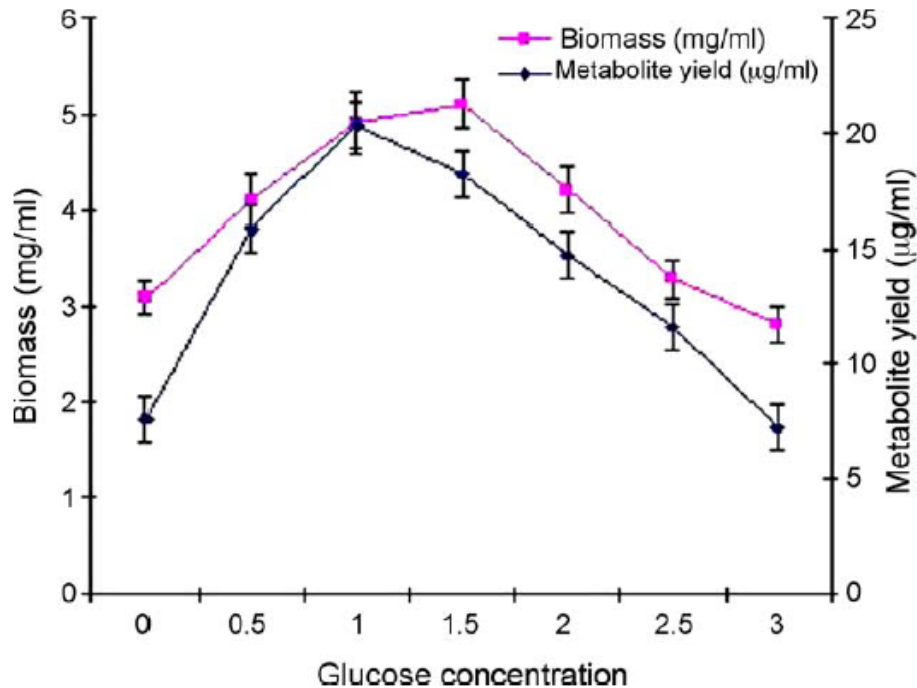


Figura 3: Efecto de la concentración de glucosa [g/L] sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en *S. tanashiensisA2D*.

Según lo mostrado en la Figura 3 [33], tanto para el crecimiento como para la producción de metabolitos, *Streptomyces. tanashiensis* presenta un comportamiento tipo campana, alcanzando los 5,2 [g/L] de biomasa y 20 [µg/ml] para concentraciones de glucosa de 1,5 y 1 [g/L].

#### 1.3.2. Variación de temperatura

A continuación, se muestran ejemplos de gráficos obtenidos para el crecimiento y producción de metabolitos especializados en cultivos de distintas cepas de *Streptomyces* sometidos a variaciones de temperatura:

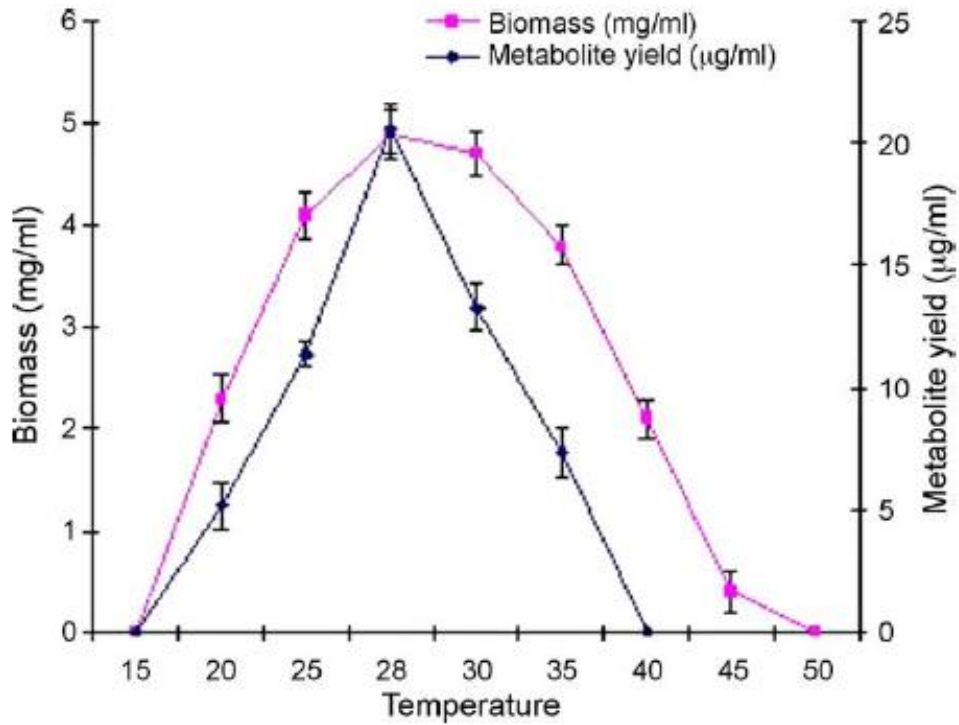


Figura 4: Efecto de la temperatura de incubación [°C] sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en *S. tanashiensisA2D*.

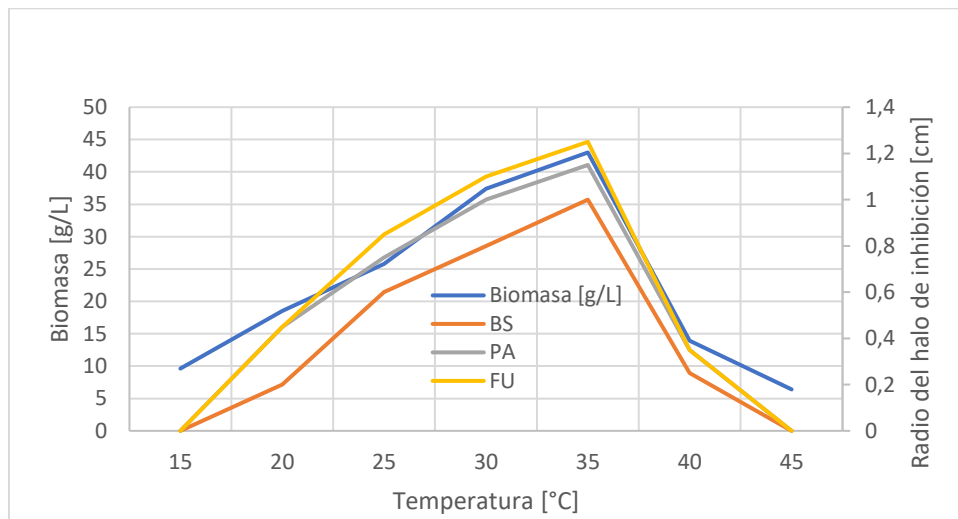


Figura 5: Temperatura vs biomasa y radio del halo de inhibición en cultivos de *S. albidoflavus*.

En la Figura 5 [31], se muestran los datos obtenidos para la variación de temperatura [°C] sobre un cultivo de *Streptomyces albidoflavus* en medio líquido YMD con un tiempo de incubación de 120 horas: En el eje izquierdo la biomasa [g/L] (azul) y en el eje derecho el radio del halo de inhibición de crecimiento [cm] para BS (*Basilus subtilis*) en naranja, PA (*Pseudomonas aeruginosa*) en gris, FU (*Fusarium*

*udum*) en amarillo [31].se aprecia un máximo tanto de crecimiento como de producción a los 35 °C], mientras que en la Figura 4 [33], los máximos se obtienen para 28 °C].

Para el caso de *Streptomyces ERI3*, la temperatura óptima para crecimiento corresponde a 28°C [34] mientras que para *Streptomyces pluripotens* se obtuvo un rango de entre 28 y 32 °C [35][36] para crecimiento y 35 °C] para producción, y para *Streptomyces sp.* Se obtuvo una temperatura óptima de 37,5 °C] para producción de metabolitos [36].

### 1.3.3. Variación de pH

A continuación, se muestran ejemplos de gráficos obtenidos de bibliografía para el crecimiento y producción de metabolitos especializados en cultivos de distintas cepas de *Streptomyces* sometidos a variaciones de pH:

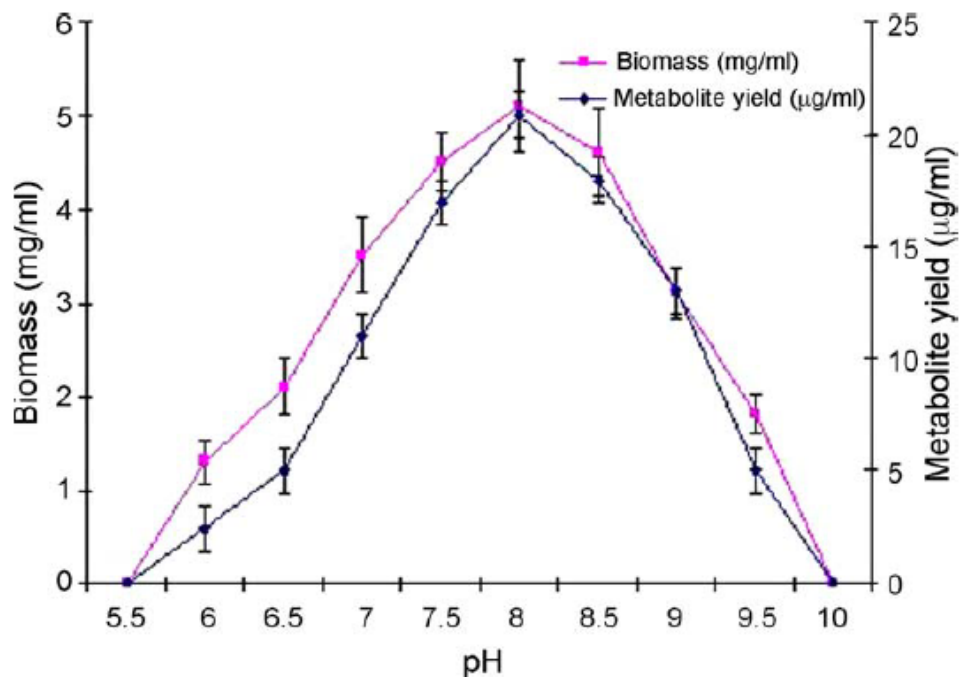


Figura 6: Efecto del pH sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en *S. tanashiensisA2D*.

En la Figura 6 [33] se puede observar el efecto variar el pH sobre la concentración de biomasa alcanzada (en rosado).

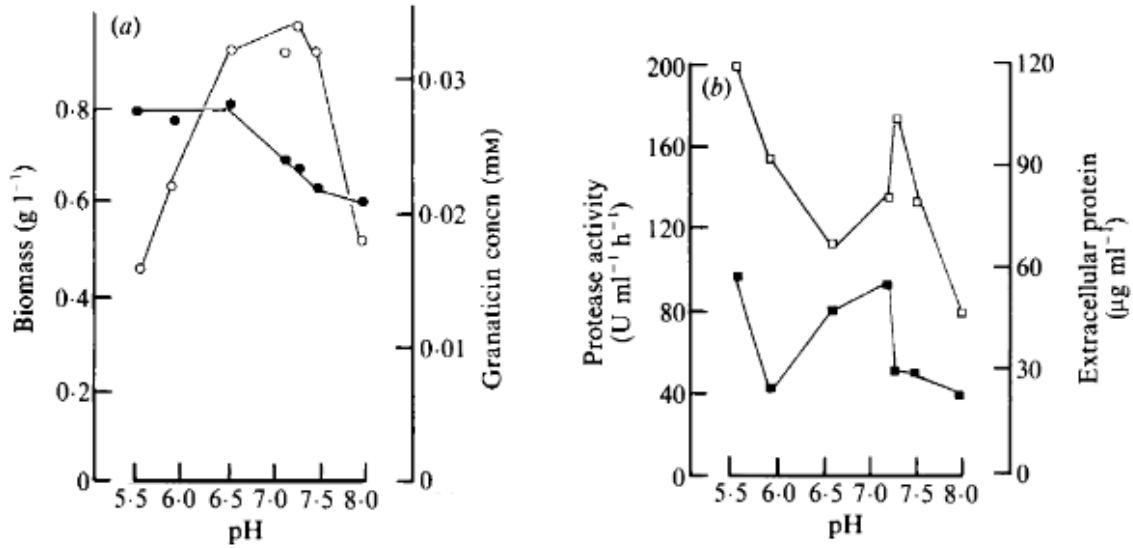


Figura 7: Efecto de la variación de pH sobre el crecimiento de *Streptomyces fhermoviolaceus* y producción de proteína extracelular (granaticina).

En la Figura 7 se ve el efecto de la variación de pH sobre el crecimiento de *Streptomyces fhermoviolaceus* y producción de proteína extracelular (granaticina) en un biorreactor de régimen continuo bajo alimentación limitada de glutamato a 45  $^{\circ}\text{C}$  y una tasa de dilución de 0.15  $[\text{h}^{-1}]$ . En el gráfico de la izquierda se observa la biomasa alcanzada (negro)  $[\text{g/L}]$ , en el gráfico de la derecha se observa la producción de proteína extracelular (negro)  $[\mu\text{g/ml}]$  [37].

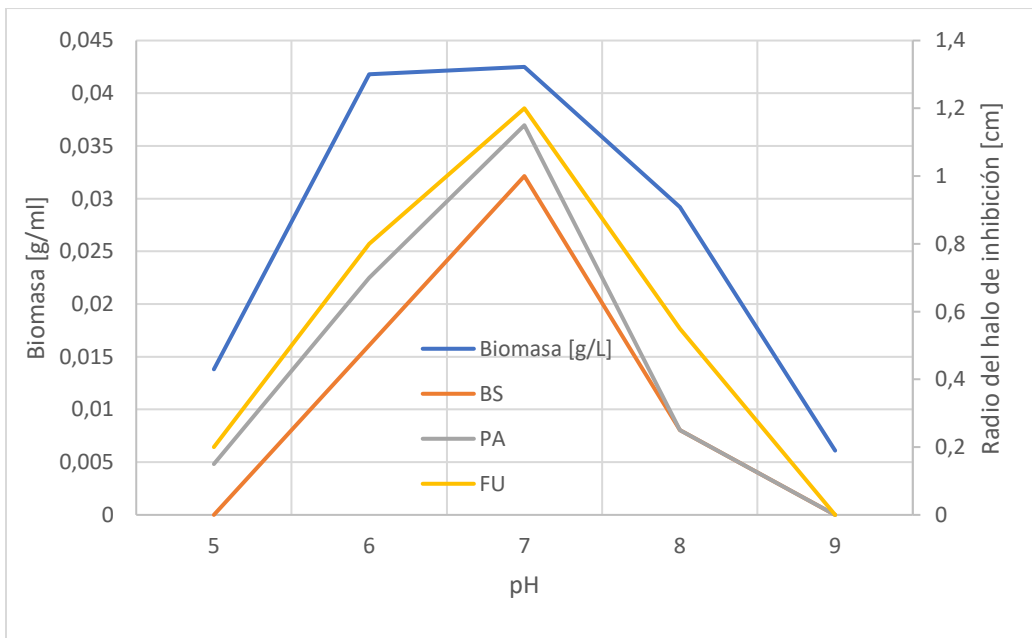


Figura 8: Variación de pH sobre producción de biomasa y metabolitos especializados en *S. albidoflavus*

En la Figura 8, se muestran los datos obtenidos para un cultivo de *Streptomyces albidoflavus* en medio líquido YMD con un tiempo de incubación de 120 hrs: En el eje izquierdo la biomasa  $[\text{g/ml}]$  (azul) y en el eje derecho el radio del halo de

inhibición de crecimiento [cm] para BS – *Basilus subtilis* (naranja), PA – *Pseudomonas aeruginosa* (gris), FU – *Fusarium udum* (amarillo) [31]. Estudios adicionales afirman que las condiciones óptimas para crecimiento corresponden a pH 7 [34] [35].

Se puede apreciar un comportamiento tipo “campana” tanto para el crecimiento como para la producción de metabolitos en los casos de la variación de concentración de nutrientes y la variación de temperatura. Sin embargo, para el caso de variación de pH existen estudios en los que se observa el comportamiento tipo “campana” para crecimiento y producción, y otros estudios en los que para crecimiento se observa solo comportamiento decreciente en los mismos rangos de pH y comportamiento errático para la producción de metabolitos.

#### 1.4. Modelos de escala genómica

Los modelos de escala genómica, o *genome-scale-model* (GSM), están compuestos de una red de reacciones construidas en base a la relación gen-enzima-reacción. Dicha red de reacciones químicas, que tienen lugar en el interior de un microorganismo, se reconstruye utilizando información del genoma del organismo en estudio en conjunto con información detallada sobre las reacciones proveniente de literatura, que incluye anotación funcional del genoma, estequiometría, composición de la biomasa, requerimientos energéticos, entre otros [38].

Las simulaciones en los modelos de escala genómica utilizan el análisis de balance de flujos (FBA) para calcular los flujos de cada metabolito a través de una red metabólica perteneciente a un modelo de escala genómica, para lograr un objetivo en particular (por ejemplo, maximizar o minimizar el flujo a través de una determinada reacción) mediante el comando *model.optimize()*. Funciona imponiendo restricciones basadas en la estequiometría de cada reacción y en las restricciones adicionales que puede poner el usuario, limitando la entrada y salida de reactivos a una cierta reacción mediante los comandos *lower\_bound* y *upper\_bound* [39],[40].

Existen GSMs para *Streptomyces* [41][42], algunos de los cuales se han utilizado anteriormente para estudiar cambios en la producción de metabolitos especializados [43], y para llevar a cabo análisis de variabilidad de flujo (FVA)<sup>5</sup> para modelar la entrada de un proceso productivo de antibióticos [44].

El modelo de escala genómica iVR1007 para *S. leeuwenhoekii* C34 fue desarrollado por Razmilic [45] para estudiar las rutas de síntesis de sus distintos metabolitos especializados y para determinar genes de interés para aumentar la producción de dichos metabolitos. En este modelo se incluyen 1.722 reacciones, 1,463 metabolitos

---

<sup>5</sup> FVA: Herramienta computacional utilizada comúnmente en modelos de escala genómica para determinar un rango de valores para el flujo de metabolitos en cada reacción que hace que el problema planteado tenga solución [87].

y 1.007 genes, además de las rutas metabólicas para la síntesis chaxamicinas, chaxalactinas y desferrioxaminas entre otros. Fue validado utilizando datos experimentales de crecimiento bajo 166 fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, con un 83,7% de exactitud. Es importante notar que el modelo iVR1007 no incluye restricciones relacionadas con elementos de regulación de genes ni reacciones.

## 1.2. Motivación

Las infecciones bacterianas en el cuerpo humano, causadas tanto por heridas como por ingesta de alimentos contaminados, pueden ser combatidas a menudo mediante el uso de antibióticos que funcionan atacando específicamente a las bacterias responsables de la infección. Las bacterias pueden, sin embargo, mutar con el paso de las generaciones y adquirir resistencia al antibiótico que antes era capaz de eliminarlas. Esta cualidad es potenciada mediante el uso excesivo o indebido de antibióticos.

En vista de lo anterior, existe a nivel mundial una creciente necesidad de descubrir antibióticos nuevos. Para ello, los ambientes que poseen condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad representan una alternativa prometedora, ya que en estos ambientes se desarrollan microorganismos únicos que producen metabolitos secundarios útiles para tratar infecciones bacterianas. *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 produce compuestos llamados chaxamicinas que han demostrado tener actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichai coli*.

Este proyecto pretende maximizar la producción de estos antibióticos en *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 mediante la optimización de las condiciones y composición de su medio de cultivo de manera que, si se lleva a producción de gran escala, los costos de producción sean menores y por lo tanto, las chaxamicinas puedan ser vendidas a menores precios que sus alternativas.

## 1.4. Justificación

Este proyecto representa un aporte para medicina y para la industria farmacéutica, ya que la optimización de las condiciones y parámetros del medio de cultivo se traducen en un aumento de producción para un gasto similar de recursos en comparación con el caso inicial, lo que se traduce en una reducción de costos de producción por gramo de antibiótico. Esto permite que las farmacéuticas vendan el antibiótico a un precio menor que en caso no optimizado. Esto permitirá que el antibiótico sea más accesible sobre todo para pacientes con poco poder adquisitivo en caso de llegar al mercado. Además, este trabajo no solo provocará un aumento en la producción chaxamicinas, sino que también para la producción de metabolitos en general dentro de esta especie, lo que resulta bastante útil si se encuentra otro metabolito de interés en esta especie.

## 1.5. Objetivos

El objetivo general de este proyecto consiste en encontrar de forma experimental las condiciones de temperatura, pH y concentración de glicerol, que maximizan la producción de metabolitos especializados, y comparar los resultados obtenidos para



la variación de glicerol con las simulaciones realizadas en el modelo de escala genómica.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Encontrar los valores óptimos de temperatura, pH y concentración de glicerol, para maximizar la producción de metabolitos especializados.
- Comprobar el manejo de las herramientas computacionales y del modelo de escala genómica.
- Predecir el comportamiento de los experimentos de variación de nutrientes, para luego comparar ambos.
- Diseñar un proceso productivo industrial tentativo para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas, y compararlo con alternativas de mercado provenientes de síntesis química.

## 1.6. Alcances

Esta tesis pretende estudiar los efectos de las variaciones, dentro de los rangos especificados posteriormente, en temperatura, pH y concentración de glicerol en el medio de cultivo de *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 sobre la producción de metabolitos especializados, encontrando las condiciones que maximicen la producción. El glicerol no es el único nutriente para la bacteria en cuestión, pero solo se estudiará éste por motivos de tiempo.

Además, se estudiará el modelo de escala genómica de la bacteria confeccionado por Valeria Razmilic [46] y se realizarán simulaciones de su metabolismo bajo distintas condiciones de alimentación para predecir aumentos en los niveles de producción de metabolitos especializados.

La medición de los niveles de producción de chaxamicinas se realizará mediante halos de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ya que la cromatografía por afinidad es costosa y los anticuerpos para el reconocimiento de la molécula de interés demoran en mandarse a hacer, y la técnica HPLC, y no se cuenta con un estándar (muestra purificada del compuesto de interés) para poder identificar y cuantificar una sustancia en particular.

## 1.7. Limitaciones

Las limitaciones de este proyecto son las siguientes:

- Las variaciones en la producción de metabolitos se evaluarán cualitativamente mediante halos de inhibición de crecimiento debido a la falta de un estándar para la cuantificación.
- Se mide bioactividad de metabolitos especializados en general (no de cada tipo de chaxamicina) contra *S. aureus*.
- La optimización de la composición del medio de cultivo se hace tomando en cuenta únicamente la cantidad de glicerol, ya que existen muchas fuentes de carbono que



pueden ser utilizadas por la bacteria, pero por motivos de tiempo solo se estudiará la concentración de glicerol.

- Por motivos de tiempo y factibilidad, no se estudiará el efecto de variar la temperatura, pH y composición del medio de cultivo fuera de los rangos estipulados. No se estudiarán más parámetros.

- Las comparaciones realizadas entre las simulaciones y los experimentos se llevan a cabo a nivel cualitativo, debido a la imposibilidad de cuantificar la producción de metabolitos especializados de forma exacta.

- El planteamiento y análisis del proceso productivo de metabolitos a nivel industrial se lleva a cabo de forma superficial, ya que no es el objetivo principal de este proyecto.

## 2. Materiales y metodología

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34

- Extracto de malta (BD Bacto™ 218630)
- Extracto de levadura (BD Bacto™212750)
- Glicerol (winkler BM-0800)
- D (+)-Glucose (Reag.Ph Eur 1.08337.1000)
- Agua destilada.
- NaOH 4M.
- Dilución de HCL al 50% en agua destilada.
- pHmetro (Corning pH meter 320)
- Balanza (Equilab Chyo MP-3000G)
- Incubadora (SHEL LAB SHAKING INCUBATOR)

#### 2.1.2. Extracción de proteínas

- Tubos Eppendorf de 15 [ml].
- Tubos de microcentrífuga de 2 ml estériles.
- Pipeta P100.
- Puntas de pipeta P1000.
- Medios de cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34.
- Centrífuga (eppendorf 5804 R)

#### 2.1.3. Bioensayos

- Placas de Petri estériles.
- NaCl (AppliChem Panreac 131659.1211)
- Agar (BD Bacto™ 214010)
- Triptona (BD Bacto™211705)
- Extracto de levadura (BD Bacto™212750)
- Pipetas P200 y P1000.
- Puntas de pipetas para P200 y P1000.
- Extractos de proteínas.
- Balanza (Equilab Chyo MP-3000G)
- Espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 3000)

#### 2.1.4. Peso seco

- Tubos Eppendorf con pellets
- Balanza (OHAUS ANALYTICAL Plus)
- Estufa (GALLENKAMP *Hotbox with fan, Size 2*)

## 2.2. Metodología

Los protocolos de cultivos y bioensayos deben ser realizados bajo campana o mechero, utilizando elementos estériles y los elementos de seguridad apropiados (delantal, guantes de vinilo y mascarilla).

### 2.2.1. Cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34

#### 2.2.1.1. Variación de temperatura

- a. Por cada temperatura perteneciente al conjunto {27, 30, 33, 37, 40} °C, se preparan 3 matraces como se indica a continuación: En cada matraz de 250 ml se introducen 50 [ml] de agua destilada y los componentes del medio mISP2 según se indica en el anexo 3.1.1 para en medio mISP2.
- b. Se fija el pH de cada matraz en 7,2 utilizando el pHímetro y diluciones de HCl y NaOH para bajar o subir el pH, respectivamente, según fuera necesario.
- c. Se rotulan 3 matraces para cada temperatura de la siguiente forma: Fecha, C34, mISP2 TX<sup>y</sup>, con x indicando la temperatura a la que se incubaba, e y el número de triplicado (1,2 o 3).
- d. Se autoclava durante 1 hora a 121 °C.
- e. Se inocula cada matraz con 10 µL de stock de glicerol de *S. leeuwenhoekii* C34.
- f. Se deja incubar a 200 rpm durante 108 horas a la temperatura correspondiente de variación (27, 30, 33, 37 y 40°C).

#### 2.2.1.2. Variación de pH

- a. Se preparan 15 matraces según se indica a continuación: En un matraz de 250 ml se introducen 50 [ml] de agua destilada, y las cantidades de YE, ME y glicerol indicadas en el anexo 3.1.1.
- b. Se rotulan 3 matraces para cada pH de la siguiente forma: Fecha, C34, mISP2 pHX<sup>y</sup>, con X indicando el pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0) al que se trabaja, e y el número de triplicado (1,2 o 3).
- c. Se fija el pH en el valor indicado en el rótulo de cada matraz (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0) utilizando el pHímetro y diluciones de HCl y NaOH para bajar o subir el pH, respectivamente, según fuera necesario.
- d. Se autoclava durante 1 hora a 121 °C.
- e. Se inocula con 10 µL de stock de glicerol de *S. leeuwenhoekii* C34.
- f. Se deja incubar a 30 °C y 200 rpm durante 108 horas.

#### 2.2.1.3. Variación de concentración de glicerol

- a. Se rotulan 15 matraces de 250 [ml] de la siguiente forma: Fecha, C34, mISP2 GHX<sup>y</sup>, con X indicando la concentración de glicerol (5, 25, 45, 65, 85 [g/L]) a la que se trabaja, e y el número de triplicado (1,2 o 3).
- b. En cada matraz de los recién rotulados, se introducen 50 [ml] de agua destilada, las cantidades de extracto de levadura y extracto de malta indicadas en el anexo 3.1.1 para el medio mISP2, y la cantidad de glicerol correspondiente a la variación (ver rótulo del matraz).

- c. Se fija el pH en 7,2 utilizando el pHímetro y diluciones de HCl y NaOH para bajar o subir el pH, respectivamente, según fuera necesario.
- d. Se autoclava durante 1 hora a 121 °C.
- e. Se inocula con 10 µL de stock de glicerol de *S. leeuwenhoekii* C34.
- f. Se deja incubar a 30 °C y 200 rpm durante 108 horas.

Para realizar los experimentos de alimentaciones mixtas, se requiere seguir la metodología para variación de pH pero en vez de variar el glicerol entre 5 y 85 [g/L], se debe preparar 3 matraces rotulados como u10i5 e i10 que contendrán 10 [g/L] de glucosa y 5 [g/L] de glicerol, y 10 [g/L] de glicerol respectivamente, además de las cantidades de extracto de malta, extracto de levadura y agua destilada indicadas en el anexo 3.1.1 para el medio ISP2.

### 2.2.2. Extracción de proteínas

- a. Se rotula un tubo Eppendorf de 15 ml por cada matraz, y se registra su peso sin tapa.
- b. Para cada matraz se toma una muestra de 10 ml del medio de cultivo, que se inserta en el tubo Eppendorf rotulado correspondiente, y se centrifuga a 4 °C durante 10 minutos.
- c. Se extraen 2 ml de sobrenadante y se introducen en tubos estériles de 2 ml. Se descarta el resto del sobrenadante y se guarda el tubo con el pellet para la medición de peso seco.
- d. Luego, se centrifugan a 4 °C y 12500 rpm durante 10 min, se extrae el sobrenadante y se pone en un tubo rotulado de 2 mL.
- e. Finalmente se guardan los extractos de proteínas a -20 °C.

### 2.2.3. Bioensayos

- a. Se prepara un matraz con 50 ml de medio líquido LB y un matraz con agar LB según se indica en los anexos 3.1.2 y 3.2.1, respectivamente. Para determinar el volumen de agar LB a preparar, se deben considerar 25 ml por cada placa necesaria de agar LB.
- b. Se autoclava durante 1 hora a 121 °C.
- c. Se prepara el cultivo semilla: Se inocula *Micrococcus luteus*, proveniente de un cultivo en agar LB, directamente en 10ml de medio LB líquido. Se deja incubando durante la noche a 200 rpm y 37 °C.
- d. Del cultivo semilla se inocula 1 ml en el matraz con 50 ml de medio líquido LB y se deja incubando.
- e. Periódicamente, se toman muestras de 1 [ml] del cultivo y se introducen en cubetas de microcentrifuga para medir su absorbancia a 600 nm.
- f. Una vez alcanzados la OD<sub>600</sub> de 0,6, se inocula un volumen del cultivo del punto anterior tal que, tras inocular el agar LB (en su forma líquida) cuando baje su temperatura a 50 °C, éste quede con una OD<sub>600</sub> de 0,0125. Dicho cálculo puede realizarse mediante la siguiente ecuación:

$$V_i = \frac{OD_{600_f} \cdot V_f}{OD_{600_i}} \quad (1)$$

- g. En placas de Petri estériles previamente rotuladas se vierte el agar LB inoculado hasta que éste cubra todo el fondo de la placa (aproximadamente 20-25 ml) y se deja secar durante 30 minutos.
- h. Se hacen 4 pozos en el agar utilizando el extremo ancho de una punta de pipeta en cada placa, y se introducen 50  $\mu$ L de cada extracto de proteínas, proveniente de cada cultivo, en los pozos de la placa correspondiente.
- i. Se sellan las junturas de las placas con tiras de Parafilm.
- j. Se incuban las placas a 37°C por 24 hrs.
- k. Se mide y registra el diámetro del halo de inhibición de crecimiento en cada caso. Como control positivo se utiliza una dilución a 100  $\mu$ g/ml de carbencilina, y como control negativo, medio LB.

#### 2.2.4. Peso seco

- a. Se toman los tubos Eppendorf con los *pellets* (provenientes del paso de extracción de proteínas) y se ponen a secar en la estufa durante entre 15 y 24 horas o hasta que se observe que el *pellet* está seco.
- b. Una vez que los pellets están secos, se registra el peso de cada tubo con su *pellet*.
- c. Para obtener el valor del peso seco, se toma la diferencia entre los pesos de cada tubo con y sin pellet.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Resultados Experimentales

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés)[47][48] permite separar los componentes de una solución basándose en la diferencia de los tiempos de residencia al interior de la columna. Podría ser utilizada en este proyecto para purificar los metabolitos especializados, producidos por *S. leeuwenhoekii* C34, presentes en el sobrenadante obtenido de la centrifugación del medio de cultivo al concluir el experimento. Sin embargo, no se cuenta con un estándar (o muestra purificada de un componente en particular) para para identificar las fases correspondientes a los compuestos deseados y, por lo tanto, estos no pueden ser purificados.

El halo de inhibición de crecimiento da cuenta de la efectividad que tiene el sobrenadante del medio de cultivo al finalizar el cultivo para inhibir el crecimiento de *M. luteus*. Como tal, no es una medida cuantitativa directa de la producción de metabolitos, pero como se ha explicado anteriormente, una mayor concentración de un antibiótico en la solución utilizada en un bioensayo implica un halo de inhibición de crecimiento más grande, debido a que la concentración mínima inhibitoria se encontrará más alejada del pozo. Adicionalmente, al no contar con una muestra del metabolito de interés purificada de concentración conocida, tampoco se puede construir una curva de calibración para relacionar directamente la concentración del metabolito de interés con el tamaño del halo de inhibición de crecimiento, por lo que el bioensayo solamente puede ser utilizado como una medida indirecta para comparar la producción de metabolitos especializados de *S. leeuwenhoekii* C34 con bioactividad contra *S. aureus* entre cultivos realizados a distintas condiciones.

De aquí en adelante, se considera que la producción de metabolitos especializados producidos por el cultivo, es decir, sin tener en cuenta la densidad de biomasa alcanzada, está representada por el radio del HIC de *M. luteus*. También, se considera que la producción de metabolitos por unidad de densidad de biomasa (o producción unitaria) puede ser representada utilizando el radio del halo de inhibición de crecimiento (HIC) normalizado por la densidad de biomasa,  $d_{cel}$  [gDW/L]. La producción unitaria quedará representada por las letras “pu”.

Luego, la producción unitaria puede ser calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$pu = \frac{HIC}{d_{cel}} [cm \cdot gDW^{-1} \cdot L^{-1}] \quad (2)$$

### 3.1.1. Variación de temperatura

Se realizaron los cultivos de variación de temperatura de acuerdo a lo estipulado en la sección de Metodología, incubando los matraces a temperaturas entre los 27 y los 40 °C, trabajando al menos con triplicados.

A continuación, se muestran los gráficos obtenidos para peso seco de biomasa por litro de cultivo [ $grDW \cdot L^{-1}$ ], radio del halo de inhibición de crecimiento [cm], y la razón entre HIC y la biomasa obtenida.

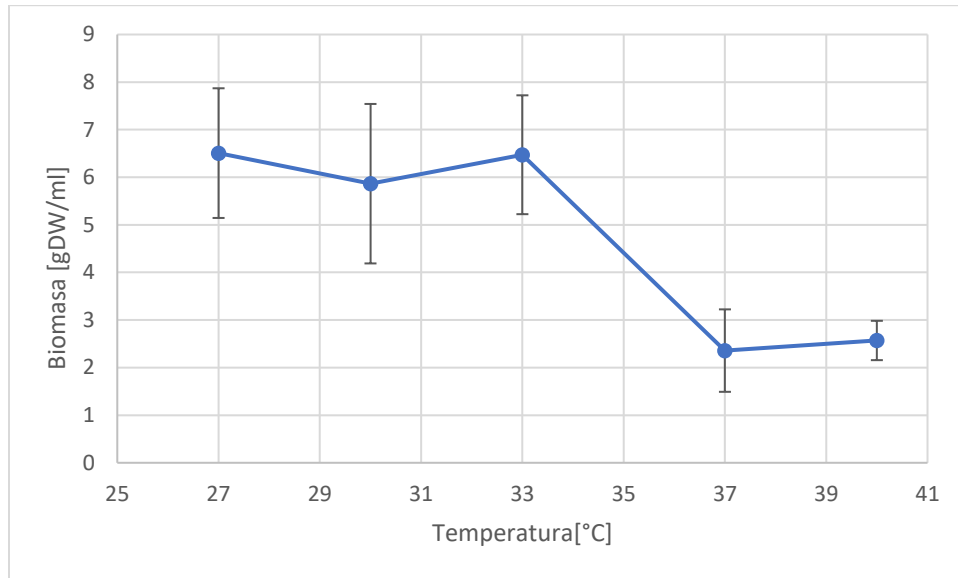


Figura 9: Resultados experimentales para la variación de temperatura [°C] vs producción de biomasa [ $gDW L^{-1}$ ].

En la Figura 9, se puede ver que entre los 27 y los 33 °C se cuenta con un comportamiento oscilante con un máximo de 6,47 [ $gDW L^{-1}$ ] a los 33 °C, para luego decrecer hasta el mínimo de 2,4 a los 37°C. Posteriormente se estanca (la diferencia de crecimiento entre 37 y 40 °C es de 0,2 [ $gDW L^{-1}$ ] aproximadamente, es decir, despreciable). Las diferencias observadas indican que la temperatura es un factor relevante para el crecimiento de *S. leeuwenhoekii*.

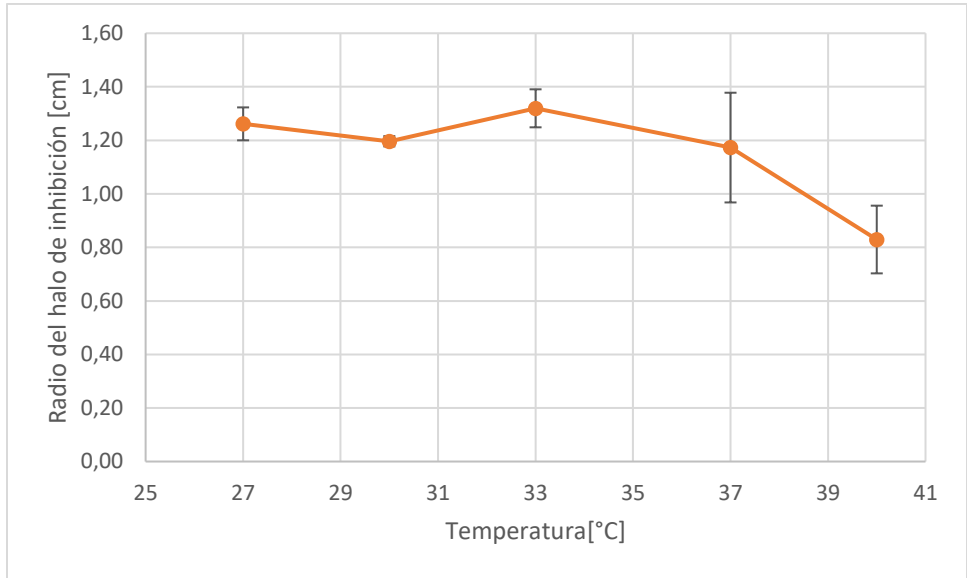


Figura 10: Resultados experimentales para el radio del halo de inhibición de crecimiento para los distintos cultivos realizados a diferentes temperaturas.

Para el caso de producción de metabolitos especializados a nivel de cultivo, representada por el halo de inhibición de crecimiento de *M. luteus*, se observa un comportamiento tipo campana como los expuestos en la introducción. El máximo promedio alcanzado corresponde a 1,32 [cm] a los 33 °C, mientras que el mínimo es de 0,83 [cm] a los 40 °C, siendo un 62 % del máximo. Esto da cuenta de la relevancia de la temperatura sobre la producción de metabolitos especializados.

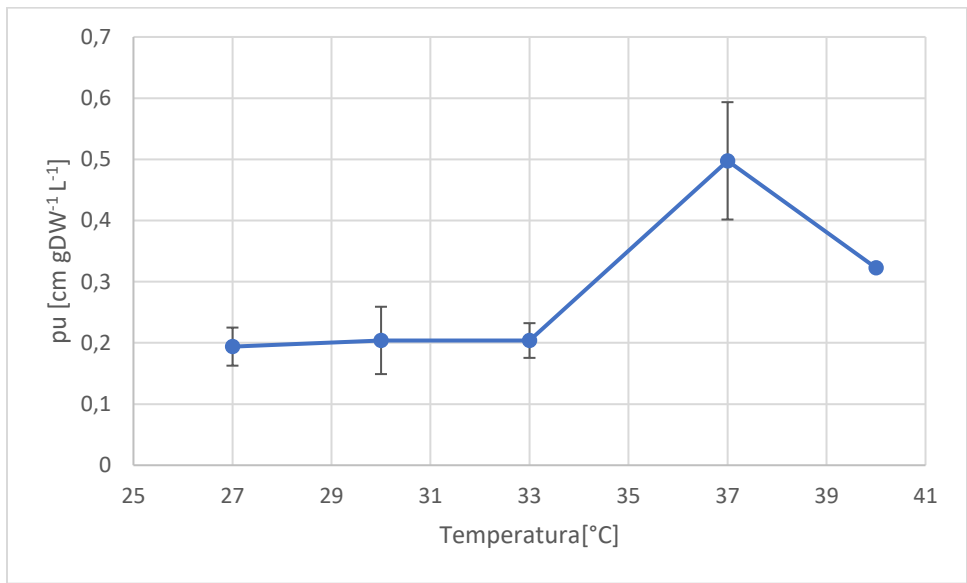


Figura 11: Resultados experimentales para la razón halo/biomasa al realizar los cultivos a distintas temperaturas.



Para el caso de la producción unitaria (pu), se aprecia un comportamiento tipo campana, con su máximo de 0,5 a los 37 °C y un mínimo de 0,2 a los 30 °C. Según la tendencia exhibida se puede esperar que, al aumentar la temperatura sobre los 40°C, se obtenga un mínimo menor que el ya encontrado, lo que puede deberse a la termo estabilidad de las enzimas involucradas en metabolización del glicerol la producción de los metabolitos. El hecho de que *S. leeuwenhoekii* C34 sea extremófilo implica que puede sobrevivir en cierta medida en condiciones extremas, pero esto no implica que crezca mejor ni que produzca mayor cantidad de metabolitos en esas condiciones que a condiciones templadas, solamente que se han adaptado para sobrevivir bajo esas condiciones.

Es razonable pensar que al aumentar la temperatura, *S. leeuwenhoekii* C34 producirá mayor cantidad de metabolitos para disminuir sus competidores, y así poder aprovechar mejor los nutrientes disponibles bajo condiciones desfavorables. Sin embargo, se observa una clara disminución al llegar a los 40°C, que puede deberse a que las enzimas que metabolizan las fuentes de carbono comienzan a perder su estabilidad al aumentar la temperatura sobre un umbral.

Cabe destacar que el máximo de producción de metabolitos por densidad de células (pu) ocurre a los 37 °C mientras que el cultivo a nivel general produce mayor cantidad de metabolitos a los 33 °C. Esta diferencia puede deberse a que, al estar en condiciones más desfavorables y alejadas de su temperatura óptima de crecimiento, las bacterias se ven más presionadas para eliminar la competencia al ver su supervivencia más incierta.

### 3.1.2. Variación de pH

Se llevó a cabo los cultivos de *S. leeuwenhoekii* en medio ISP2 modificado con 10 [g/L] de glicerol a 30 °C, pero variando el pH entre 6 y 8. A continuación, se muestran los gráficos obtenidos para peso seco de biomasa por litro de cultivo [ $grDW \cdot L^{-1}$ ], radio del halo de inhibición de crecimiento [cm], y la producción unitaria de metabolitos [ $cm \cdot grDW^{-1} \cdot L^{-1}$ ].

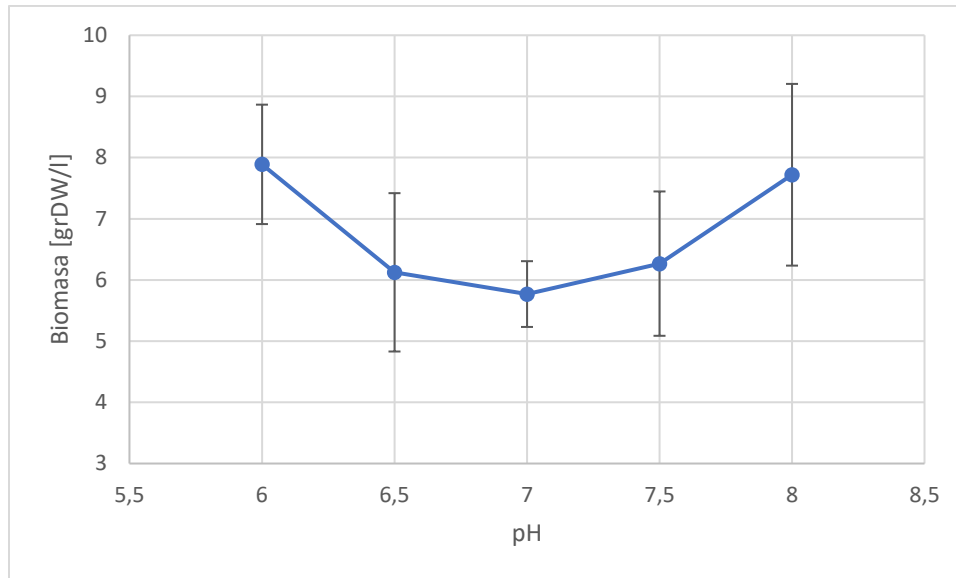


Figura 12: Resultados experimentales para la producción de biomasa obtenida en función de la variación de pH entre 6 y 8..

Para el caso del crecimiento de *S. leeuwenhoekii*, se observa que al aumentar el pH se obtiene un comportamiento atípico en forma de campana inversa, alcanzándose un mínimo a pH 7 sin un máximo claro. Este comportamiento no se ha observado anteriormente en otros estudios y la causa se desconoce, pero no puede atribuirse a errores humanos, ya que los experimentos se realizaron entre 4 y 6 veces cada uno obteniendo tendencias similares.

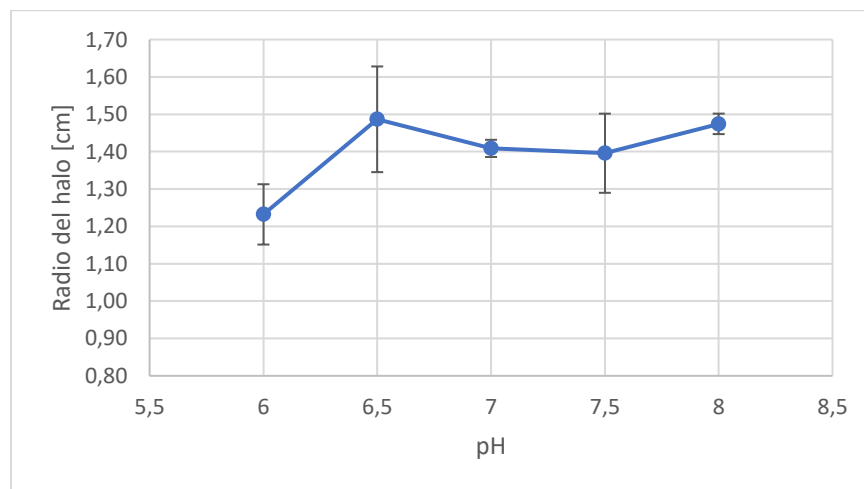


Figura 13: Resultados experimentales para el radio del halo de inhibición de crecimiento al variar las condiciones de cultivo entre pH 6 y 8.

En la Figura 13, se exponen los resultados experimentales para el radio del halo de inhibición de crecimiento al realizar los cultivos a pH entre 6 y 8. Se observa que al aumentar el pH desde 6, aumenta el radio del HIC desde 1,23 [cm] hasta 1,49 [cm], y luego se mantiene entre los 1,40 [cm] y los 1,5 [cm] hasta llegar a pH 8. Esto implica que los pH probados no son suficientes para determinar un máximo al no haber experimentado una baja al subir el pH. Sería interesante probar pH más

alcalinos para determinar un máximo, y dar cuenta a través de dichos resultados, sobre la adaptabilidad de *S. leeuwenhoekii* C34 a pH extremos que se esperaría en un ambiente con condiciones extremas de salinidad propias de suelos de salares.

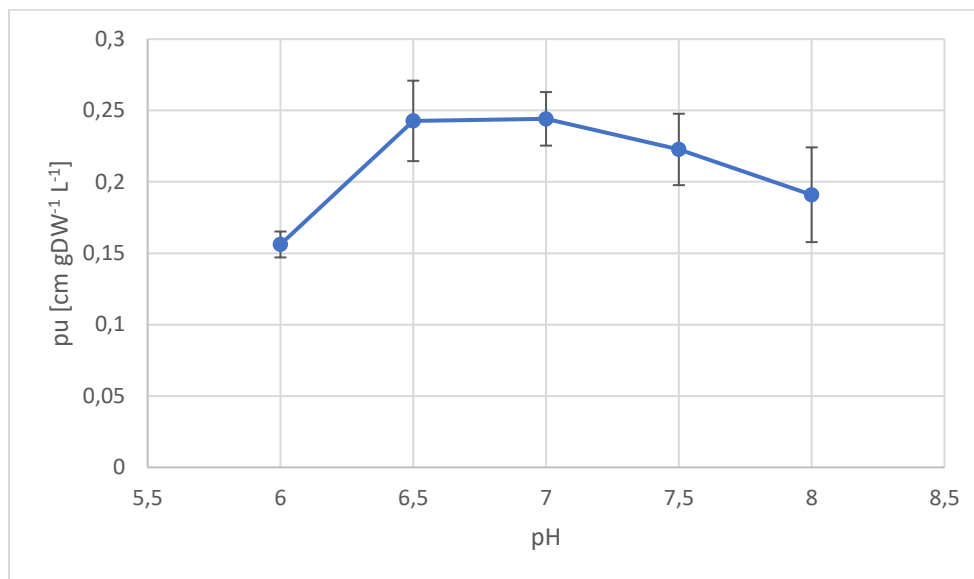


Figura 14: Resultados experimentales para la razón entre el halo de inhibición de crecimiento [cm] y el peso seco de biomasa [gDW/L] obtenida al variar el pH.

Para el caso de la producción unitaria por unidad de volumen [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>] se aprecia un comportamiento tipo campana, con su máximo de 0,244 [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>] a pH 7 y un valor muy similar (0,242 [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>]) a pH 6,5, con un mínimo de 0,156 [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>] a pH 6. El pH también es un factor importante para la producción de metabolitos en los rangos medidos siendo el mínimo un 64% del valor máximo para los valores de pH probados.

### 3.1.3. Variación de glicerol

Se llevaron a cabo cultivos bajo condiciones de pH 7,2 y temperatura 30°C variando la concentración de glicerol desde 5 a 85 [g/L] con intervalos de 20 [g/L]. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para el radio del HIC [cm], peso seco de biomasa [gDW/L], y producción unitaria [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>].

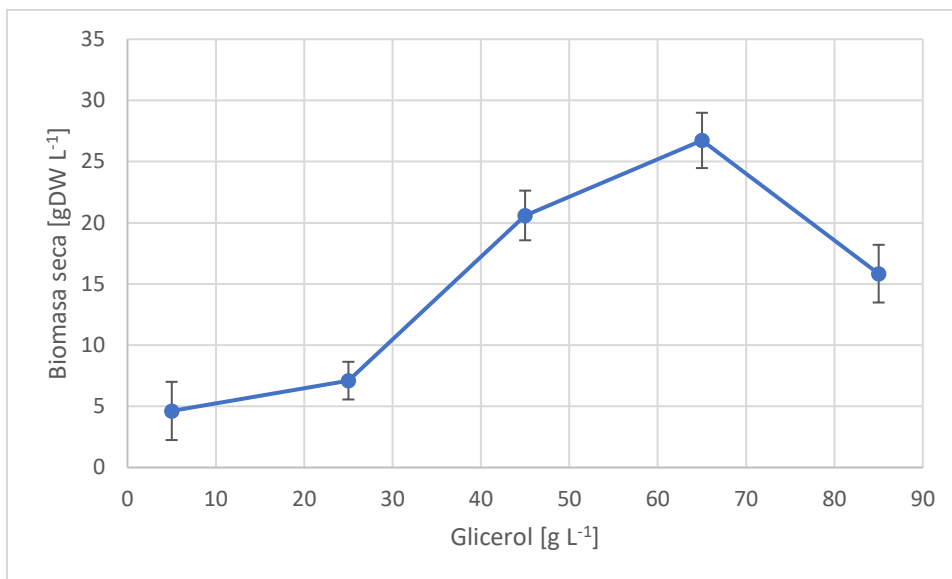


Figura 15: Peso seco obtenido [g/L] a partir de la variación en la concentración de glicerol [g/L].

Para el caso de crecimiento de biomasa, se observa que al aumentar el glicerol aumenta consistentemente la cantidad de biomasa por litro, sin llegar a estancarse dentro de los valores de glicerol probados. Se obtuvo un máximo de 26,73 [gDW L<sup>-1</sup>] con 85 [g L<sup>-1</sup>] y un mínimo de 4,6 [gDW L<sup>-1</sup>] con 5 [g L<sup>-1</sup>] de glicerol, siendo el mínimo un 17,2 % del máximo. Por lo tanto, el glicerol es un factor determinante en el crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34.

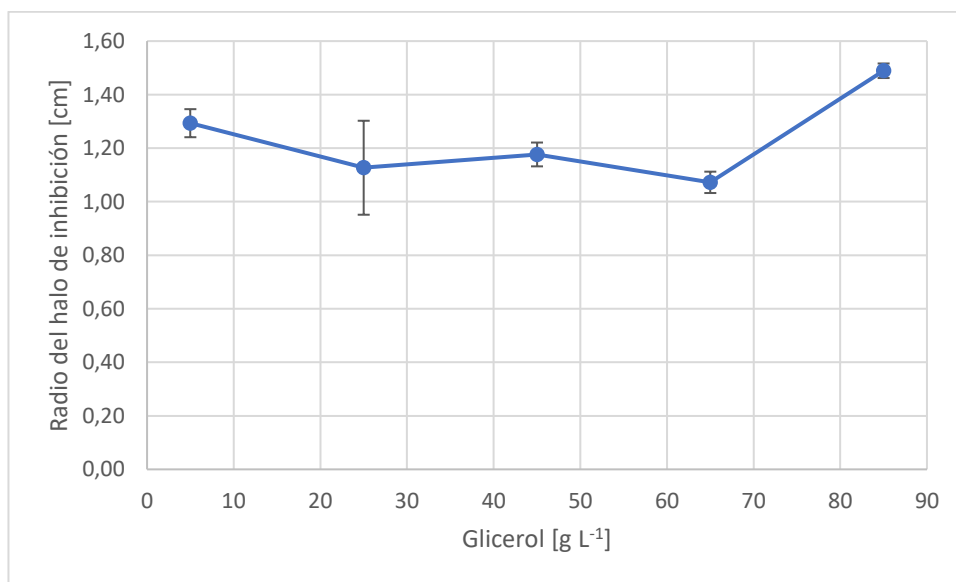


Figura 16: Variación del radio del halo de inhibición de crecimiento en función de la cantidad de glicerol alimentada.

Respecto a la producción de metabolitos especializados a nivel de cultivo, representado por radio del HIC, se puede ver que sus valores oscilan entre los 1,07

[cm] y los 1,29 [cm] hasta los 65 [g/L] de glicerol, pero aumenta hasta 1,49[cm] para 85 [g/L] de glicerol, teniendo que el mínimo es un 71,8 % del máximo. Se puede decir que la concentración de glicerol es un factor relevante para la producción de metabolitos especializados a nivel de cultivo, pero menos relevante que la temperatura o el pH.

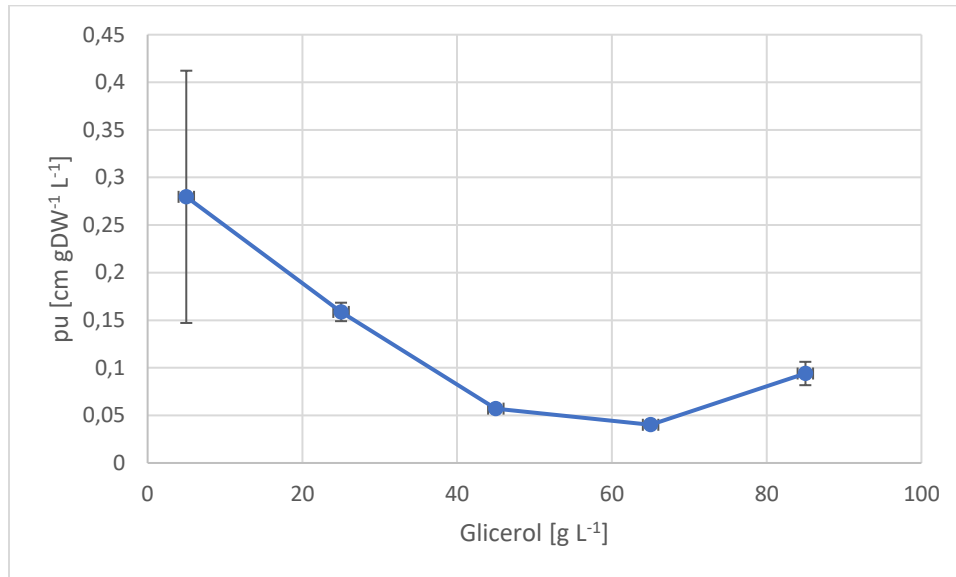


Figura 17: Resultados experimentales para la razón halo/biomasa al variar la cantidad de glicerol alimentada.

Para la producción unitaria de metabolitos especializados [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>] se observa que, al aumentar la concentración de glicerol en el cultivo, disminuye drásticamente la producción de metabolitos. El máximo alcanzado para este parámetro es de 0,27 [cm gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>], y se da a los 5 [g/L] de glicerol; mientras que el mínimo se da a los 85 [g/L] y con un valor de 0,04, corresponde a un 14,8 % del máximo. Luego, se puede decir que la concentración de glicerol en el medio de cultivo es un factor muy relevante para la producción de metabolitos por densidad de células.

De los gráficos anteriores se puede extraer lo siguiente: Al aumentar la concentración de glicerol, el peso seco aumenta notablemente, pero el tamaño de los halos de inhibición no varía significativamente. En consecuencia, se ve que la producción de metabolitos por gramo de bacteria presente en un litro disminuye. Es posible que esta disminución se deba a que, al haber mucho alimento disponible la competencia se vea disminuida, lo que puede volver menos necesaria la producción de metabolitos que eliminen otros microorganismos.

Las condiciones óptimas de cultivo para *S. leeuwenhoekii* C34, derivadas de la optimización de parámetros realizada experimentalmente, se encuentran resumidas en la siguiente tabla:

Tabla 2: Condiciones óptimas experimentales de cultivo para el crecimiento y producción de metabolitos especializados.

Parámetro	Temperatura [°C]	pH	Glicerol [g/L]
Densidad de células [gDW L <sup>-1</sup> ]	33	6	65
Producción por cultivo [cm]	33	6,5	85
Producción por densidad de células [cm gDW <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup> ]	37	6,5-7	5

El máximo valor para producción de metabolitos corresponde a 26,7 [gDW L<sup>-1</sup>], obtenido para una concentración de 65 [g L<sup>-1</sup>] en los experimentos de variación de la concentración de glicerol.

Al comparar las condiciones óptimas obtenidas experimentalmente, resumidas en la Tabla 2, con las condiciones encontradas en bibliografía, se observa que la temperatura óptima para crecimiento es cercana al rango encontrado (28-32[°C]), y que la temperatura óptima para producción (37[°C]) coincide con la encontrada en un caso particular (37,5 [°C]). Sin embargo, otros estudios encontraron un óptimo cercano a los 28 y a los 35[°C], lo que da cuenta de la diversidad del género *Streptomyces*.

Se han encontrado cepas que crecen óptimamente a pH 6 y otras a pH 8. Pese a que no se encontró un pH óptimo para el crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34, se determinó que los valores más altos para crecimiento se obtuvieron a pH 6 y pH 8. A pesar de que esos valores de pH coinciden con los óptimos de crecimiento en otros estudios de *Streptomyces*, el comportamiento tipo campana inversa no se ha visto anteriormente. La producción de metabolitos especializados fue máxima para pH entre 6,5 y 7 en los experimentos, que es bastante cercano al rango encontrado en bibliografía (pH 7-8), y también presenta un comportamiento de tipo campana.

No resulta pertinente comparar valores exactos para los experimentos de variación de glicerol con los de bibliografía, ya que los distintos estudios encontrados no coinciden completamente en medio y/o fuente de carbono con los experimentos realizados. En contraste, se encontraron tendencias similares (comportamiento tipo campana) a las encontradas en bibliografía para crecimiento y producción de metabolitos.

Se puede observar que las condiciones para crecimiento y para producción son distintas, por lo que, para maximizar la cantidad total de metabolitos producida por el cultivo, resulta inevitable que se deba separar el cultivo en una etapa de crecimiento y una de producción.

Para la etapa de crecimiento las condiciones óptimas a utilizar, derivadas de los rangos en los que se probaron los parámetros, corresponden a 33 °C, pH 6 y una concentración de 65 [g/L] de glicerol. Para la etapa de producción se deben utilizar los parámetros correspondientes a “producción por densidad de células”, ya que se cuenta con una densidad de células óptima derivada de la primera etapa. Utilizar los parámetros de “producción por cultivo” no entregaría una máxima producción

total de metabolitos ya que las células no se encontrarían en las condiciones que las incitan a producir más. En consecuencia, los parámetros óptimos para la etapa de producción son 37 °[C], pH 7 y 5 [g/L] de glicerol.

Es pertinente realizar una comparación entre los parámetros “Producción por cultivo” y “Producción por densidad de células” en torno a su utilidad para determinar las condiciones óptimas de producción: en el primer caso, los halos de inhibición de crecimiento entregan una medida indirecta de la producción de metabolitos especializados por parte del cultivo como una unidad, es decir, sin hacerse cargo de la producción individual de cada célula, por lo que carece de una visión más acabada del comportamiento de *S. leeuwenhoekii* C34 bajo determinadas condiciones. En cambio, saber cómo cambia la producción de metabolitos por “densidad de células” al variar un parámetro permite comprender en mayor profundidad que está ocurriendo con la producción a nivel celular.

Se determinó experimentalmente que estos parámetros no siempre coinciden, por lo que si se utiliza la estrategia de dos etapas de cultivo, resulta más conveniente utilizar las condiciones encontradas para “Producción por densidad de células”, contar previamente con la densidad de células óptima resultante de la primera etapa. Solamente resultaría más conveniente utilizar las condiciones encontradas para “Producción por cultivo” en caso de no poder separar el cultivo en dos etapas, caso que como se explicó anteriormente, no es la mejor estrategia para maximizar la producción.

De realizar el cultivo en dos etapas, debe tenerse en consideración la densidad de células [gDW L<sup>-1</sup>] exacta a la que el cultivo produce en mayor medida los metabolitos especializados, y al alcanzar ese punto, cambiar las condiciones de temperatura y alimentación (el pH es el mismo) a las correspondientes a “Producción por densidad de células”. En el caso de la temperatura el cambio resulta trivial, pero para el caso de la alimentación, se debe cambiar el medio de cultivo completo. Para lograr esto, se recomienda centrifugar el cultivo a 12500 rpm (para no dañar las células), y re suspender el pellet celular en el medio con la alimentación deseada.

#### 3.1.4. Comparación entre dos fuentes de carbono

Se realizaron cultivos de *S. leeuwenhoekii* C34 en medio ISP2 modificado utilizando dos regímenes distintos de alimentación para comprobar el efecto de utilizar glicerol y/o glucosa sobre el crecimiento y sobre la producción de metabolitos especializados. La alimentación u10i5 utiliza 10 [g/L] de glucosa y 5 [g/L] de glicerol como fuente de carbono, mientras que la alimentación i10 utiliza 10 [g/L] de glicerol como fuente de carbono. Se utilizó la misma variación de temperatura mencionada anteriormente, es decir, entre 27 y 40 °C.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la biomasa, los radios de los halos de inhibición de crecimiento [cm], y la razón entre ambos [cm gDW<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup>] para ilustrar los metabolitos producidos por cantidad de biomasa.

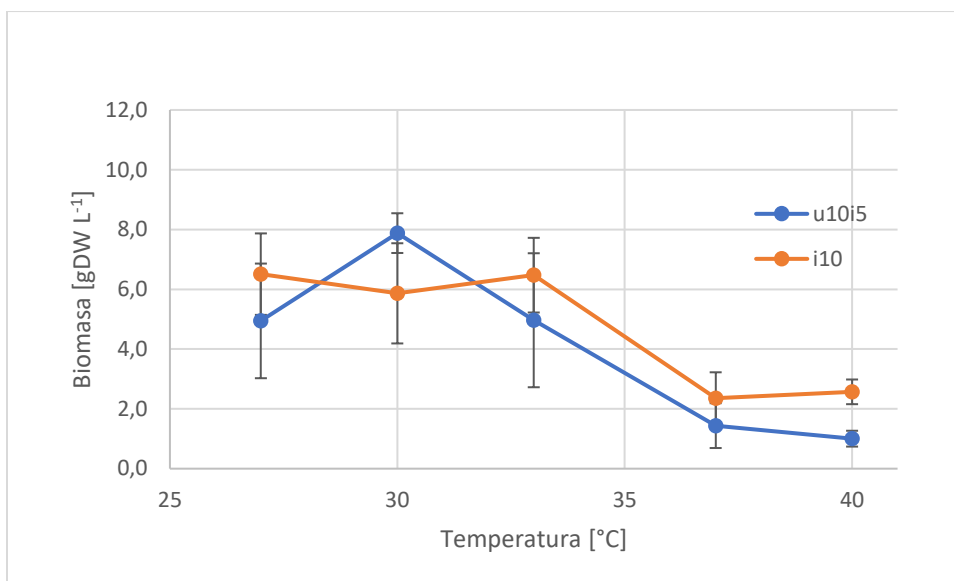


Figura 18: Comparación entre la producción de biomasa alcanzada para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la temperatura.

En la Figura 18, se contrasta la producción de biomasa [gDW L<sup>-1</sup>] según la alimentación a la que fue sometido el cultivo, es decir 10 gr/L de glucosa y 5 g/L de glicerol (u10i5) o 10 g/L de glicerol (i10), y a la temperatura [°C] a la cual se incubaron los matraces. El máximo crecimiento obtenido con la alimentación i10 es un 82% del máximo de la alimentación u10i5, mientras que el mínimo de la alimentación u10i5 es un 39 % del mínimo de la alimentación i10., siendo sus valores 6,5, 7,9, 1 y 2,57 [gDW L<sup>-1</sup>] respectivamente.

Se observa que el máximo alcanzado por la alimentación u10i5 es mayor que el alcanzado por la alimentación i10 a los 30 [°C], pero al resto de las temperaturas la dieta i10 presenta mayor crecimiento. Esto implica que en general las reacciones involucradas en la metabolización del glicerol para producción de biomasa están más activas que las correspondientes a la glucosa, excepto para los 30 [°C].



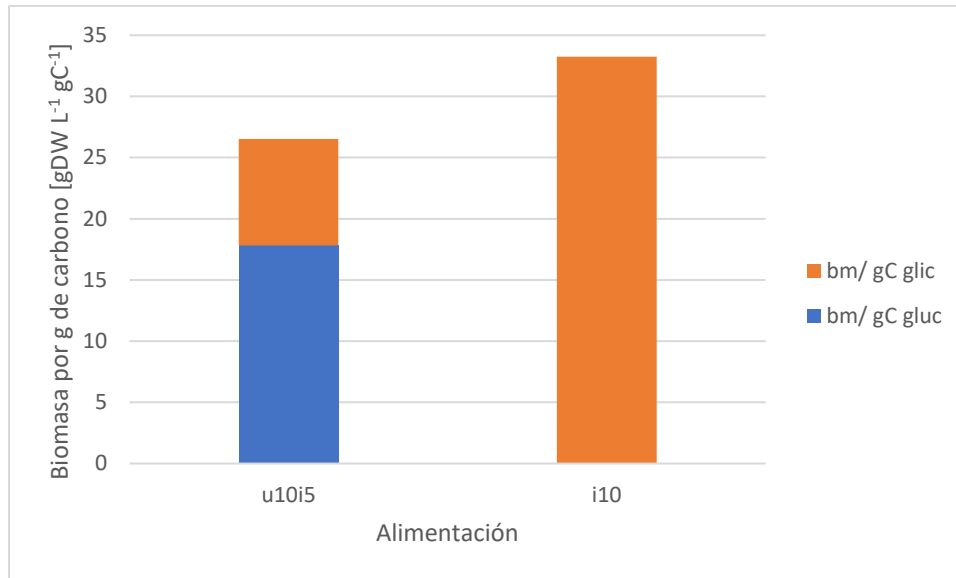


Figura 19: Contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de biomasa.

Para realizar un análisis más completo del fenómeno, se construyó un gráfico de contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de biomasa (Figura 19) de acuerdo a lo dispuesto en el anexo 4, para lo que se utilizó el supuesto de que todo el glicerol y toda la glucosa fueron consumidos por las bacterias, y los datos de cada alimentación en su máximo crecimiento. De este gráfico se tiene que la producción de biomasa debida al glicerol en la alimentación i10 es 81 % más alta que la debida a la glucosa en la alimentación u10i5, y que dentro de la alimentación u10i5, la producción de biomasa debido a la glucosa es el doble (un 104 % más alta) que la debida al glicerol, que no es de extrañar si se tiene en cuenta que la dieta contiene el doble de glicerol que de glucosa.

Es decir, la bacteria utiliza el glicerol y la glucosa en la misma proporción para la producción de biomasa. Sin embargo, como el carbono también se utiliza para la producción de metabolitos especializados, se tiene que la producción de biomasa en i10 es 90 % proporcionalmente más alta que la producción de biomasa debida al glicerol en u10i5. Lo anterior sugiere que el resto del carbono proveniente del glicerol fue utilizado en otras tareas, como la producción de metabolitos. Si este fuera el caso, la producción de metabolitos debería ser más alta para la alimentación i10 en su valor máximo.

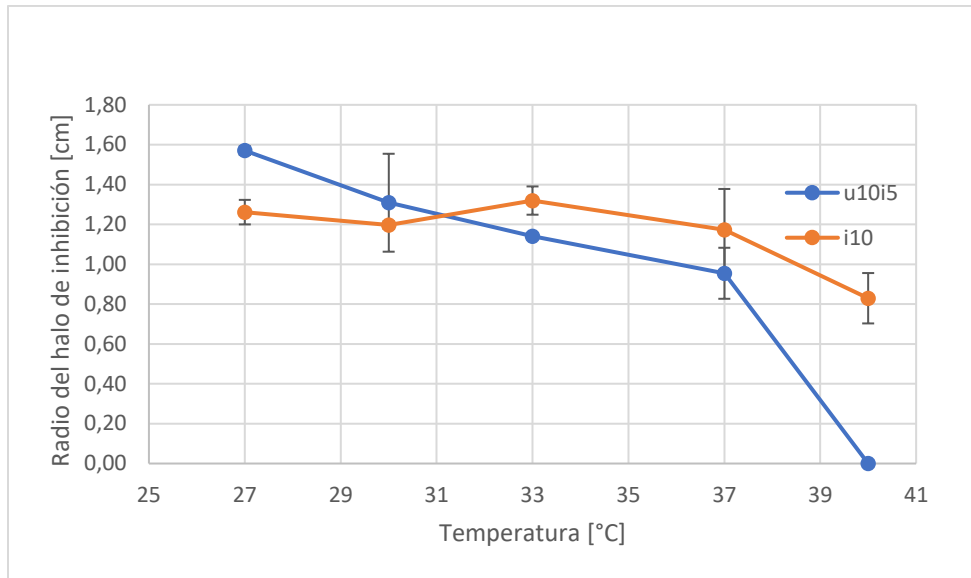


Figura 20: Comparación entre el radio del halo de inhibición de crecimiento obtenido para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la temperatura.

En la Figura 20, se contrasta el radio del halo de inhibición de crecimiento [cm] de *M. luteus* según la alimentación a la que fue sometido el cultivo ( es decir, 10 gr/L de glucosa y 5 gr/L de glicerol (u10i5) o 10 g/L de glicerol (i10)) y a la temperatura [°C] bajo la que se llevó a cabo. Se observa que el halo de inhibición de crecimiento ocasionado por los metabolitos producidos por el cultivo es mayor a los 27 y 30 [°C] para u10i5, pero a partir de los 33 [°C] es mayor para i10, es decir, para el caso con mayor glicerol. El halo de inhibición para u10i5 a 40 [°C] es 0 [cm]. Esto último puede deberse a que, como se mencionó anteriormente, las enzimas encargadas de la metabolización de la glucosa pierdan en gran medida su estabilidad a 40°C. De ser el caso, el crecimiento de u10i5 sería menor que i10 a dicha temperatura, hipótesis que es avalada por la evidencia experimental, ya que el crecimiento u10i5 el 39 % del crecimiento en i10 a 40 [°C]. Esto tendría sentido si el glicerol presente en u10i5 se haya utilizado prioritariamente en el crecimiento y mantención del cultivo por sobre la producción de metabolitos especializados. Puede ser que exista producción de metabolitos especializados, pero que la concentración sea menor a la CMI, y por lo tanto, no será visible en los bioensayos.

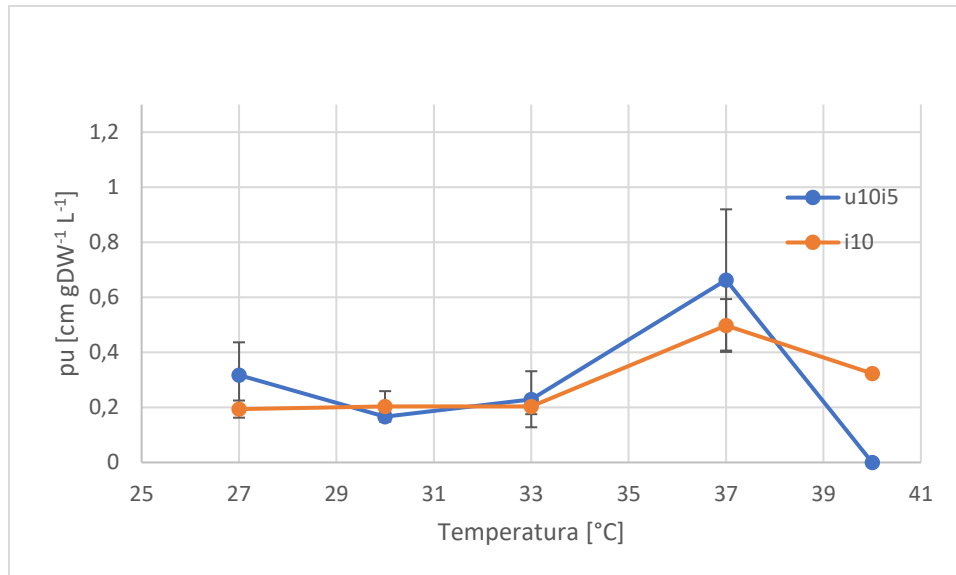


Figura 21: Comparación entre la producción unitaria obtenida para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la temperatura

En la Figura 21 se contrasta la producción de metabolitos especializados por densidad de biomasa [ $\text{cm gDW}^{-1}\text{L}^{-1}$ ] según la alimentación a la que fue sometido el cultivo, es decir 10 g/L de glucosa y 5 g/L de glicerol (u10i5) o 10 g/L de glicerol (i10); y a la temperatura [°C] bajo la que se llevó a cabo. Se observa la producción de metabolitos por parte de la biomasa, bajo los distintos regímenes de alimentación y bajo las distintas temperaturas. Se puede ver que para ambas alimentaciones, a los 37 °C se tiene la mayor producción unitaria. Se puede ver que a los 40°C se tiene producción nula de metabolitos especializados con bioactividad contra *M. luteus* para el caso u10i5, pero se cuenta con una producción relevante para i10 si se compara con las producciones para temperaturas menores a 37° C. El hecho de que ambos *peaks* sean a 37 °C sugiere que esta puede ser la temperatura óptima de funcionamiento para las enzimas que metabolizan el glicerol y la glucosa, que estén involucradas en la producción de metabolitos especializados.

Con respecto al *peak* de producción a los 37 [°C], a dicha temperatura se tiene un bajo crecimiento para ambas alimentaciones, teniendo u10i5 un 62% de la biomasa de i10, pero i10 produce un 75 % de lo que produce u10i5. Dado que u10i5 posee 50% más átomos de carbono (ver Tabla 11) y presenta menor crecimiento, tiene sentido que presente mayor producción de metabolitos. Sin embargo, resulta curioso que al tener carbono disponible para producción de metabolitos, este no se ocupe en aumentar la biomasa. Es posible que esto se deba a la que al encontrarse a temperaturas más elevadas que la óptima, y por lo tanto ver amenazada su supervivencia (al poseer baja densidad de células), la bacteria produzca metabolitos para intentar eliminar la competencia. La alimentación i10 presenta una producción unitaria por gramo de carbono alimentado un 67 % más alta que la producción unitaria máxima, lo que avala la hipótesis de que, al verse amenazada, *S. leeuwenhoekii* C34 tiende a producir metabolitos especializados en mayor cantidad para eliminar la competencia.

Otro fenómeno interesante que ocurre a los 40[°C] es que la biomasa total producida por gramo de carbono alimentado es 2,95 veces más alta para i10 que para u10i5, siendo que u10i5 tiene 50 % más carbono que i10. Si bien no se puede determinar con exactitud que porcentaje del crecimiento obtenido para u10i5 se debe a cada fuente de carbono a 40 [°C] debido a la potencial pérdida de actividad de ciertas enzimas, es posible que por lo menos las rutas metabólicas relacionadas con producción de metabolitos especializados a partir de glucosa se encuentren inutilizadas (ya que no presenta producción de metabolitos especializados), y que si las relacionadas con crecimiento también lo están, dada la baja concentración de glicerol y la elevada temperatura, las bacterias se vean obligadas a emplear todo su carbono en crecimiento y mantención de biomasa.

En el siguiente gráfico se analiza la “Producción unitaria” (producción de metabolitos especializados por densidad de células) a 37 [°C], debido a la metabolización del carbono proveniente de ambas fuentes de carbono según corresponda a cada alimentación [ $\text{cm gDW}^{-1} \text{L}^{-1} \text{g C}^{-1}$ ] suponiendo que la bacteria consumió todo el glicerol y la glucosa alimentados. Para mayor información sobre la confección del gráfico, ver anexo 4.

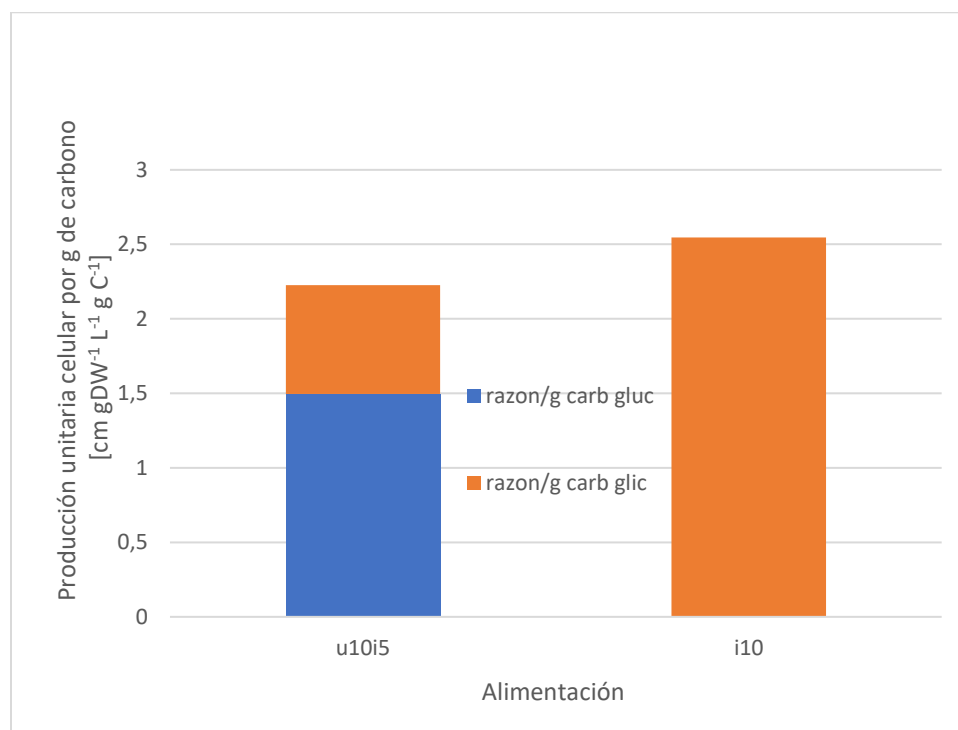


Figura 22: Contribución relativa de la glucosa y el glicerol a la producción unitaria de metabolitos especializados según la alimentación.

En la Figura 22, se muestra la contribución relativa de la glucosa y el glicerol a la "producción unitaria" de metabolitos especializados según la alimentación con la que se alimentó el cultivo. En naranja se ve la producción de metabolitos especializados debido a los carbonos provenientes del glicerol, y en azul se ve el

caso análogo para los carbonos provenientes de la glucosa (bajo el supuesto de que se consume toda la glucosa y todo el glicerol).

La alimentación u10i5 posee 0,298 g de carbono en un medio de 50 ml, mientras que i10 posee 0,196 g de carbono, es decir, la alimentación i10 aporta el 65,8 % del carbono que aporta la alimentación u10i5 a su respectivo cultivo. Pese a esto, la producción unitaria es menor en la alimentación u10i5 que en la alimentación i5.

Hay dos cosas que pueden resultar interesantes: Por un lado, u10i5 tiene la mitad de glicerol que i10, pero la producción debida a glicerol en u10i5 corresponde al 27% de la lograda en i10 debido al glicerol, y no al 50 % que se esperaría al ser la mitad.

Por otro lado, los gramos de carbono aportados por la glucosa en la alimentación u10i5 y por el glicerol en la alimentación i10 son 0,2 y 0,196 respectivamente. Sin embargo, la producción unitaria por gramo de carbono es menor incluso si se cuenta el aporte del glicerol en la alimentación u10i5. Esto implica una clara diferencia en el uso de cada fuente de carbono, siendo el glicerol el predominante para producción de metabolitos. Esto puede deberse a las rutas metabólicas implicadas en la metabolización de la glucosa y el glicerol.

Cabe mencionar que no se tiene una medida real del consumo de nutrientes en los cultivos debido a la falta de los implementos necesarios suficientes y el tiempo adicional requerido para llevar a cabo las mediciones pertinentes. Ya que para la construcción del gráfico de contribuciones relativas (Figura 22) se supuso que las bacterias consumieron todos los nutrientes disponibles, las comparaciones y los análisis realizados a partir de este gráfico podrían perder su validez si este supuesto se aleja significativamente de la realidad. Sin embargo, las simulaciones indican que se toda la glucosa y el glicerol son consumidos por las bacterias, por lo que como el modelo posee un 83% de exactitud, es probable pero no necesariamente cierto que la mayor parte de la glucosa y el glicerol hayan sido consumidos en los experimentos.

### 3.2. Sobre las simulaciones computacionales

Se utilizó el programa Python y su extensión Cobrapy para poder trabajar con el modelo de escala genómica *iVR1007* de *S. leeuwenhoekii* C34 construido por Razmilic en el mismo software. Sobre dicho modelo se realizaron distintas simulaciones para predecir el comportamiento de la bacteria bajo las variadas condiciones de alimentación, para su posterior comparación.

A continuación, se presenta una lista con los distintos programas utilizados y el propósito de cada uno:

- *sim\_1\_fuente*: Se prueba el crecimiento del microorganismo en presencia de una sola fuente de carbono a la vez, comparando los resultados con la simulación realizada por la Dra. Razmilic y con los resultados experimentales de *Biolog*. Su propósito es comprobar el manejo del estudiante sobre el GSM *iVR1007* en Cobrapy.

- *sim\_1\_fuente\_pro*: Al igual que el caso anterior, se utiliza solamente una fuente de carbono a la vez, pero el objetivo es comprobar la producción de chaxamicina A y chaxalactina A en cada caso. Su propósito determinar el efecto particular de cada fuente de carbono sobre la producción de ambos metabolitos para futuros experimentos.
- *sim\_glic\_alt*: Se simula el crecimiento de *S. leeuwenhoekii* y la producción de chaxamicina A y chaxalactina A bajo distintas concentraciones de glicerol como principal fuente de carbono, utilizando como base el medio ISP2.
- *sim\_gli\_vs\_glu*: Se prueba el efecto de variar la glucosa como fuente de carbono para crecimiento y producción de metabolitos, y se rescatan los valores que optimizan crecimiento y producción. Luego, se hace variar el glicerol y se alimenta el valor óptimo de glucosa, simulando para crecimiento y producción de metabolitos. Su propósito es determinar la importancia de cada nutriente para crecimiento y para producción de metabolitos especializados.
- *sim\_u10i5\_vs\_i10*: Se realizan simulaciones con las concentraciones exactas de glicerol y glucosa correspondientes a las alimentaciones i10 y u10i5, con el propósito de tener una comparación más cercana entre las simulaciones y los experimentos para dar cuenta de las diferencias en crecimiento y producción de metabolitos para ambas alimentaciones.

Se muestran los resultados obtenidos para cada programa:

### 3.2.1. sim\_1\_fuente

Para poder llevar a cabo distintas simulaciones en el GSM, fue necesario un estudio previo del modelo de escala genómica de *S. leeuwenhoekii* y del funcionamiento de dichos modelos en el software Cobrapy de Python. Esto se llevó a cabo utilizando la documentación de la plataforma Cobrapy [49] y la asesoría de Valeria Razmilic.

En la Tabla 3 se muestra el crecimiento se *S. leeuwenhoekii* alimentadas con una única fuente de carbono. Biolog representa los datos experimentales, mientras que V. R. y M. B. representan los resultados de las simulaciones realizadas por Razmilic [50] (La autora del modelo de escala genómica utilizado en este trabajo) y Martín Bonilla (el autor de este trabajo), respectivamente.

Tabla 3: Crecimiento reportado por los experimentos (Biolog) y por las simulaciones realizadas en el GSM (V. R. y M. B.).

Fuente de carbono	Abreviación	Biolog	V. R.	M. B.	Fuente de carbono	Abreviación	Biolog	V. R.	M. B.
N-Acetyl-D-glucosamine	ExNAceDglu_e				D-Galacturonate	ExDGala_e			
Succinate	ExSucc_e				N-Acetylneuraminate	ExNAceneu_e			
D-Galactose	ExDGal_e				Deoxyribose	ExDxr_e			
L-Aspartate	ExLAsp_e				Raffinose	ExRaf_e			
L-Proline	ExLPro_e				Salicin	ExSal_e			
D-Alanine	ExDAla_e				Stachyose	ExSta_e			
alpha,alpha-Trehalose	ExaaTre_e				4-Aminobutanoate	ExqArmit_e			
D-Mannose	ExDMan_e				2-Methylmaleate	ExdMjmal_e			
D-Sorbitol	ExDSor_e				4-Hydroxybenzoate	ExqHxybze_e			
Glycerol	ExGlyc_e				Oxalate	ExOxala_e			
D-Glucuronate	ExDGluce_e				N-Acetyl-L-glutamate	ExNAceLglu_e			
D-Gluconic acid	ExDGluca_e				L-Arginine	ExLArg_e			
D-Xylose	ExDXylo_e				Glycine	ExGly_e			
(S)-Lactate	ExSLac_e				L-Histidine	ExLHis_e			
Formate	ExFor_e				L-Homoserine	ExLHomo_e			
L-Glutamate	ExLGlu_e				Hydroxyproline	ExHxy_e			
D-Glucose 6-phosphate	ExDGlu6p_e				L-Isoleucine	ExLIsoleu_e			
(S)-Malate	ExSMal_e				L-Leucine	ExLLeu_e			
D-Ribose	ExDRib_e				L-Lysine	ExLLys_e			
L-Rhamnose	ExLRha_e				L-Methionine	ExLMet_e			
D-Fructose	ExDFru_e				L-Ornithine	ExLOrn_e			
Acetate	ExAce_e				L-Phenylalanine	ExLPhenylala_e			
D-Glucose	ExDGlu_e				L-Valine	ExLVal_e			
Maltose	ExMal_e				Putrescine	ExPut_e			
Melibiose	ExMel_e				L-Arabinose	ExLArab_e			
Thymidine	ExThym_e				D-Glucarate	ExDGluca_e			
L-Asparagine	ExLAspa_e				Lactose	ExLac_e			
2-Oxoglutarate	ExdOglu_e				Glyoxylate	ExGlyc_e			
2-Oxobutanoate	ExdObutte_e				Dextrin	ExDex_e			
Sucrose	ExSuc_e				Arbutin	ExArb_e			
Uridine	ExUri_e				D-Glucosamine	ExDGluco_e			
L-Glutamine	ExLGlut_e				2-Amino-2-deoxy-D-gluconate	ExdAmi2deoDglu_e			
D-Glucose 1-phosphate	ExDGlu1p_e				(R)-3-Hydroxybutanoate	ExR3Hxyte_e			
D-Fructose 1-phosphate	ExDFru1p_e				3-Oxalomalate	ExtOxa_e			
2-Hydroxybutanoic acid	ExdHxybad_e				Quinate	ExQuin_e			
Deoxyadenosine	ExDxade_e				Pidolic acid	ExPidoad_e			
Adenosine	ExAden_e				Glycerone	ExGlyce_e			
Citrate	ExCit_e				L-Threonine	ExLThr_e			
myo-Inositol	Exmyoino_e				L-Alanine	ExLAla_e			
Fumarate	ExFum_e				Acetoacetate	ExAcet_e			
Propanoate	ExProte_e				N-Acetyl-D-mannosamine	ExNAceDman_e			
Glycolate	ExGlyco_e				(S)-Malate	ExSMal_e			
Cellobiose	ExCell_e				Tyramine	ExTyr_e			
Inosine	ExIno_e				Pyruvate	ExPyr_e			
L-Serine	ExLSer_e								

En la Tabla 3 se muestra una comparación entre los resultados experimentales y los de las simulaciones para crecimiento de *S. leeuwenhoekii* utilizando los

compuestos mostrados en la tabla como principal fuente de carbono, uno a la vez. Para las simulaciones, se consideró un umbral del 10 % del crecimiento obtenido con las condiciones default [45] para determinar el crecimiento. Los casos que presentaron una concentración de biomasa mayor o igual al umbral, se clasificaron como favorables y se les asignó el color verde, mientras que a los casos desfavorables se les asignó el color rojo.

Se puede ver que en todos los casos la simulación del alumno coincide con la simulación original, lo que implica que el modelo fue utilizado apropiadamente para llevar a cabo las simulaciones de fuente única de carbono y, por lo tanto, que se logró un manejo suficiente del modelo de escala genómica iVR1007 a través de la herramienta Cobrapy, para realizar simulaciones por cuenta propia.

### 3.2.2. sim\_1\_fuente\_pro

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la simulación obtenida del programa sim\_1\_fuente\_pro para el crecimiento, producción de chaxamicina A y chaxalactina A al utilizar solamente la fuente de carbono indicada.

Tabla 4: Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de metabolitos especializados según el modelo iVR1007.

Compuesto	Abreviación	Crecimiento	Producción de Chaxamicina A	Producción de Chaxalactina A
Raffinose	ExRaf_e	1,205	3,464	4,536
Stachyose	ExSta_e	1,205	4,555	5,964
Dextrin	ExDex_e	1,205	4,555	5,964
Melibiose	ExMel_e	0,904	2,373	3,107
Lactose	ExLac_e	0,904	2,373	3,107
Sucrose	ExSuc_e	0,904	2,373	3,107
alpha,alpha-Trehalose	ExaaTre_e	0,800	2,100	2,750
Cellobiose	ExCell_e	0,800	2,100	2,750
Maltose	ExMal_e	0,800	2,100	2,750
Adenosine	ExAden_e	0,641	1,645	2,155
Inosine	ExIno_e	0,639	1,645	2,155
D-Glucose 1-phosphate	ExDGLu1p_e	0,592	1,555	2,036
D-Glucose 6-phosphate	ExDGLu6p_e	0,592	1,555	2,036
D-Fructose 1-phosphate	ExDFru1p_e	0,586	1,541	2,036
Uridine	ExUri_e	0,548	1,429	1,786
Deoxyadenosine	ExDxade_e	0,533	1,280	1,618
N-Acetyl-D-glucosamine	ExNAceDglu_e	0,490	1,282	1,679
D-Glucosamine	ExDGLuco_e	0,490	1,282	1,679



D-Mannose	ExDMan_e	0,488	1,282	1,679
D-Fructose	ExDFru_e	0,488	1,282	1,679
D-Glucose	ExDGLu_e	0,488	1,282	1,679
D-Galactose	ExDGal_e	0,488	1,282	1,679
Thymidine	ExThym_e	0,434	1,163	1,440
D-Gluconic acid	ExDGlucad_e	0,419	1,100	1,440
L-Arabinose	ExLAra_e	0,419	1,100	1,440
D-Xylose	ExDXylo_e	0,419	1,100	1,440
2-Amino-2-deoxy-D-gluconate	ExdAmi2deoDglu_e	0,384	1,009	1,321
D-Glucarate	ExDGLuca_e	0,380	1,000	1,321
D-Glucuronate	ExDGLuc_e	0,380	1,000	1,321
Deoxyribose	ExDxr_e	0,380	1,000	1,321
L-Phenylalanine	ExLPhenylala_e	0,371	0,959	1,272
D-Ribose	ExDRib_e	0,315	0,827	1,083
L-Histidine	ExLHis_e	0,285	0,900	1,125
Citrate	ExCit_e	0,283	0,900	1,125
2-Oxoglutarate	ExdOglu_e	0,283	0,900	1,125
L-Glutamate	ExLGLu_e	0,283	0,900	1,125
3-Oxalomalate	ExtOxa_e	0,283	0,900	1,125
D-Galacturonate	ExDGala_e	0,283	0,900	1,125
L-Homoserine	ExLHomo_e	0,283	0,900	1,125
L-Proline	ExLPro_e	0,283	0,900	1,125
4-Hydroxybenzoate	ExqHxybzte_e	0,282	0,730	0,964
Hydroxyproline	ExHxy_e	0,277	0,730	0,964
2-Oxobutanoate	ExdObutte_e	0,277	0,730	0,964
2-Hydroxybutanoic acid	ExdHxybad_e	0,277	0,730	0,964
L-Lysine	ExLLys_e	0,277	0,730	0,964
Glycerone	ExGlyce_e	0,277	0,730	0,964
L-Threonine	ExLThr_e	0,277	0,730	0,964
L-Valine	ExLVal_e	0,277	0,730	0,964
2-Methylmaleate	ExdMylmal_e	0,277	0,730	0,964
Glycerol	ExGlyc_e	0,277	0,730	0,964
L-Glutamine	ExLGLut_e	0,182	0,567	0,708
L-Arginine	ExLArg_e	0,181	0,567	0,708
L-Asparagine	ExLAspa_e	0,179	0,567	0,708
L-Ornithine	ExLOrn_e	0,178	0,567	0,708
Fumarate	ExFum_e	0,178	0,567	0,708
Pidolic acid	ExPidoad_e	0,178	0,567	0,708
4-Aminobutanoate	ExqAmite_e	0,178	0,567	0,708
(S)-Malate	ExSMal_e	0,178	0,567	0,708
Succinate	ExSucc_e	0,178	0,567	0,708
L-Aspartate	ExLAsp_e	0,178	0,567	0,708

(S)-Malate	ExSMal_e	0,178	0,567	0,708
L-Leucine	ExLLeu_e	0,175	0,459	0,607
(R)-3-Hydroxybutanoate	ExR3Hxyte_e	0,175	0,459	0,607
L-Rhamnose	ExLRha_e	0,175	0,459	0,607
Glycine	ExGly_e	0,175	0,459	0,607
Acetoacetate	ExAcet_e	0,175	0,459	0,607
L-Serine	ExLSer_e	0,175	0,459	0,607
D-Alanine	ExDAla_e	0,175	0,459	0,607
L-Alanine	ExLAla_e	0,175	0,459	0,607
Glyoxylate	ExGlyo_e	0,175	0,459	0,607
(S)-Lactate	ExSLac_e	0,175	0,459	0,607
Glycolate	ExGlyco_e	0,175	0,459	0,607
Pyruvate	ExPyr_e	0,175	0,459	0,607
Putrescine	ExPut_e	0,073	0,233	0,292
Quinate	ExQuin_e	0,073	0,189	0,250
Formate	ExFor_e	0,072	0,189	0,250
Acetate	ExAce_e	0,072	0,189	0,250
Propanoate	ExProte_e	0,066	0,168	0,210
Oxalate	ExOxala_e	0,000	0,000	0,000
N-Acetyl-L-glutamate	ExNAceLglu_e	0,000	0,000	0,000
Tyramine	ExTyr_e	0,000	0,000	0,000
L-Isoleucine	ExLIsoleu_e	0,000	0,000	0,000
L-Methionine	ExLMet_e	0,000	0,000	0,000
Salicin	ExSal_e	0,000	0,000	0,000
myo-Inositol	ExmyoIno_e	0,000	0,000	0,000
Arbutin	ExArb_e	0,000	0,000	0,000
D-Sorbitol	ExDSor_e	0,000	0,000	0,000
N-Acetylneuraminate	ExNAceneu_e	0,000	0,000	0,000
N-Acetyl-D-mannosamine	ExNAceDman_e	0,000	0,000	0,000

De la Tabla 4, se puede determinar que las fuentes de carbono que más aportan al crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34 corresponden a rafinosa, estaquiosa y dextrina (marcadas en rojo); mientras que para la producción de chaxamicinas A y chaxalactinas A los mayores valores se dieron con estaquiosa y dextrina, seguido de rafinosa. Para el caso de crecimiento, la D-glucosa quedó en lugar 21 y el glicerol en lugar 50; mientras que para producción de chaxamicinas A la D-glucosa queda en lugar 16 y el glicerol en lugar 43; para la producción de chaxalactinas A, la D-glucosa queda en lugar 18 y el glicerol queda en lugar 44. Sin embargo, cabe mencionar que como se ve en la Tabla 3, *S. leeuwenhoekii* C34 no crece en rafinosa ni estaquiosa como fuente única de carbono, por lo que, si se pretende utilizar estas fuentes de carbono para producción de metabolitos, sería necesario utilizar otra fuente de carbono adicional como base para crecimiento.

A continuación, se muestran los resultados de las simulaciones “sim\_glic\_alt” y “sim\_gli\_vs\_glu” realizadas para predecir los resultados experimentales, y para comparar entre el glicerol y la glucosa como fuentes de carbono. Los ejes de los gráficos fueron ajustados en los mismos valores para todos los gráficos con el propósito de facilitar las comparaciones a nivel visual.

### 3.2.3. sim\_glic\_alt

#### *Alimentación solo con glicerol*

A continuación, se muestran los resultados de la simulación sim\_glic\_alt para crecimiento y producción de metabolitos secundarios.

#### Tasa de Crecimiento

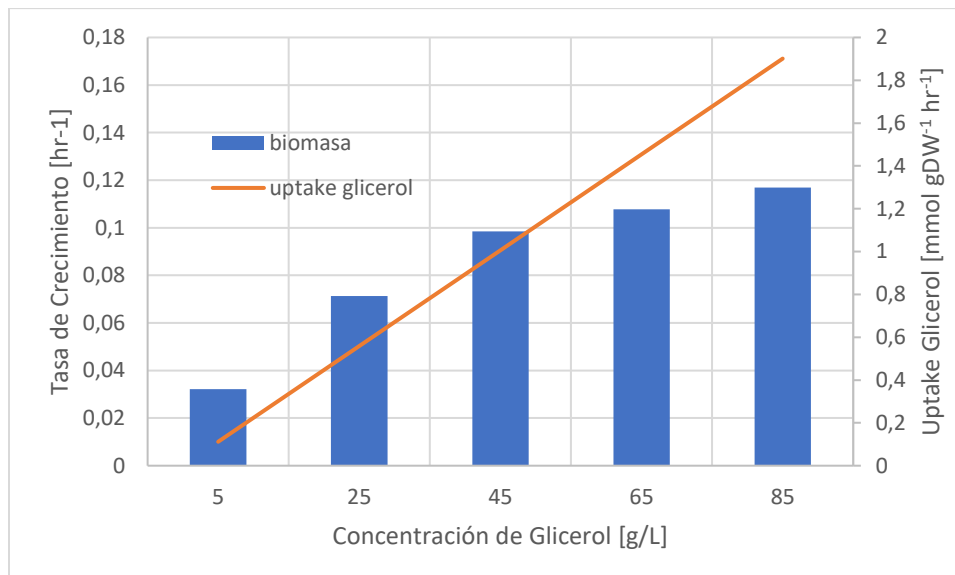


Figura 23: Tasa de crecimiento simulado para *S. leeuwenhoekii* C34 en medio ISP2 con glicerol como principal fuente de carbono.

En la Figura 23 se muestra la tasa de crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34 (barras azules) obtenida al simular las condiciones del medio ISP2 con glicerol como principal fuente de carbono, junto con su consumo (o *uptake*, línea naranja). Al aumentar la concentración de glicerol, la tasa de crecimiento adopta una tendencia lineal para concentraciones entre 5 y 45 [g/L] y logarítmica al aumentar desde 65 a 85 [g/L]. Se observa un aumento desde 0,032 a 0,117 [h<sup>-1</sup>]. Se puede ver, sin embargo, que el consumo de glicerol mantiene una tendencia creciente lineal al aumentar la concentración de glicerol, desde 0,117 a 1,90 [mmol DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], al aumentar el glicerol desde 5 a 85 [g/L].

## Producción de chaxamicina A

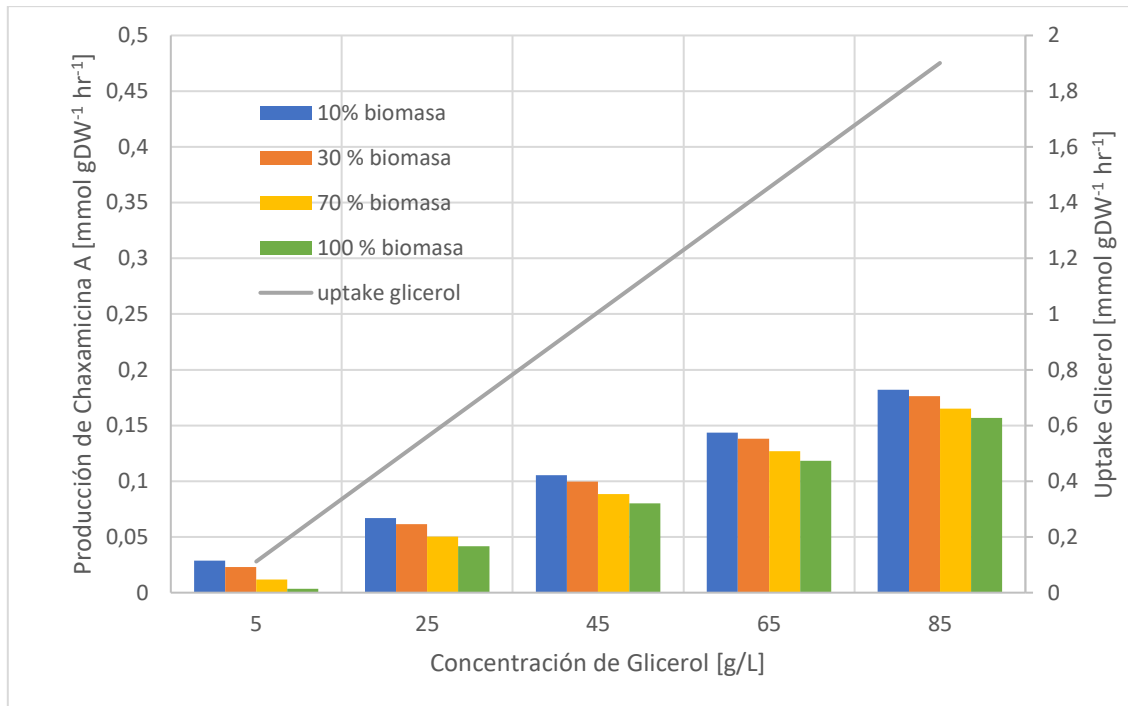


Figura 24: Producción de chaxamicina A al variar la concentración de glicerol y fijando la tasa de crecimiento en un 10, 30, 70 y 100 % de la correspondiente al caso default.

En la Figura 24 se observa la producción de chaxamicina A al variar la biomasa entre 10 y 100% del caso default (barras de colores) para distintas concentraciones de glicerol, junto con el consumo de glicerol (línea gris). Al aumentar el glicerol de 8 a 85 [g/L] se aprecia que para el 100 % de biomasa existe un aumento desde 0,033 hasta 0,157 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], mientras que para el 10 % de biomasa, se tiene un aumento desde 0,0286 hasta 0,1819 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], alcanzando un valor máximo 16 % más alto para el caso 10 % con respecto al de 100 %.

## Producción de chaxalactina A

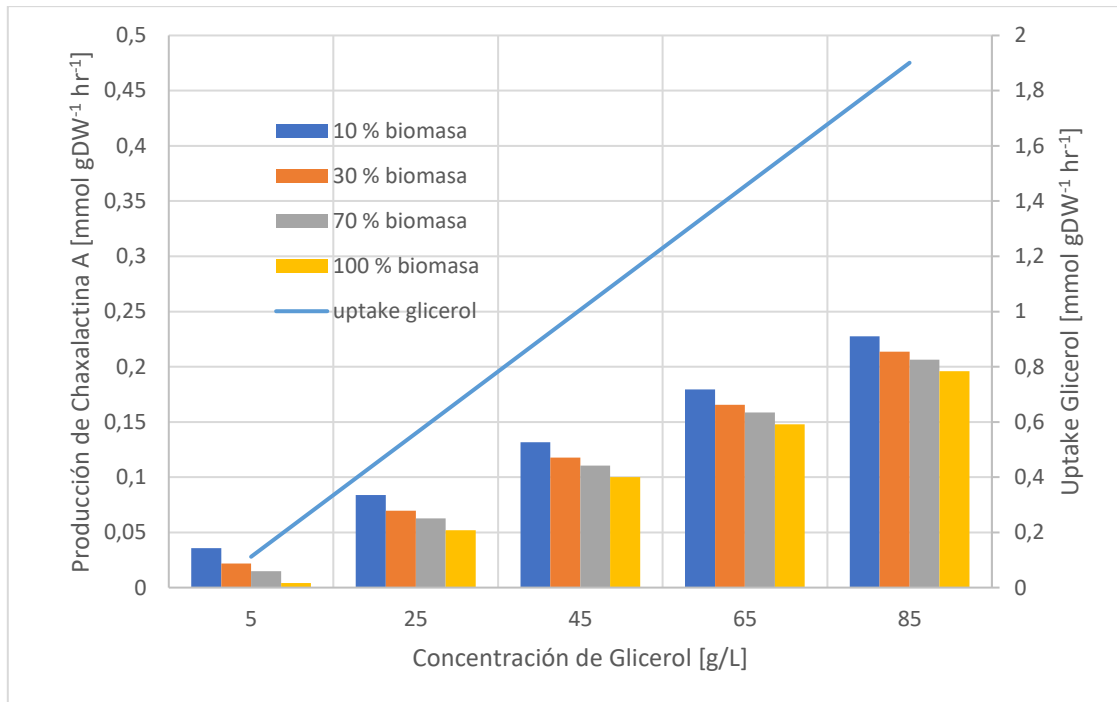


Figura 25: Producción de chaxalactina A al variar la concentración de glicerol.

En la Figura 25 se muestra la concentración de glicerol alimentada [g L<sup>-1</sup>] vs la producción de chaxalactina A [mmol gDW<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>] fijando el crecimiento en 10, 30, 70 y 100 % del alcanzado cuando el objetivo del modelo es crecimiento en medio ISP2 con 10 [g L<sup>-1</sup>] de glicerol. Al aumentar el glicerol, se aprecia que para el 100 % de biomasa existe un aumento desde 0,004 hasta 0,196 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], mientras que para el 10 % de biomasa, se tiene un aumento desde 0,036 hasta 0,228 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], alcanzando un valor máximo 16 % más alto para el caso 10 % con respecto al de 100 %.

### 3.2.4. sim\_gli\_vs\_glu

A continuación, se muestran los resultados de la simulación sim\_gli\_vs glu para crecimiento y producción de metabolitos secundarios tanto para la alimentación solo con glucosa como para la alimentación mixta, es decir, con los valores óptimos para glucosa y variando la concentración de glicerol.

#### 3.2.4.1. Alimentación solo con glucosa

Crecimiento

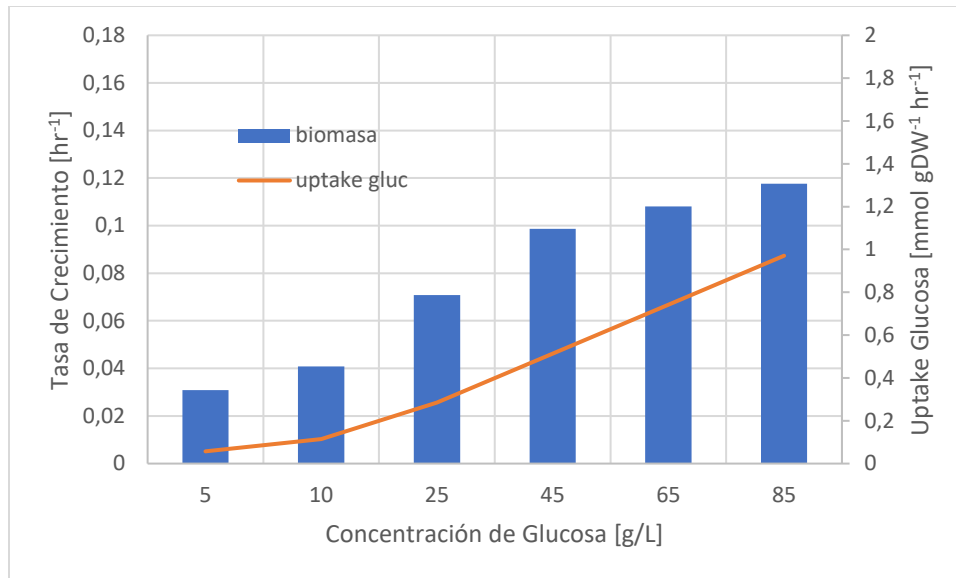


Figura 26: Concentración de glucosa vs Tasa de crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34 y uptake de glucosa.

En la Figura 26 se muestra el efecto de variar la concentración de glicerol sobre la tasa de crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34 (barras azules), además del consumo de dicho nutriente (línea naranja). Se puede ver un crecimiento de tipo logarítmico con un comienzo menos pronunciado que para el caso con glicerol, alcanzando valores extremadamente similares a concentraciones a partir de los 25 [g/L].

## Producción de chaxamicina A

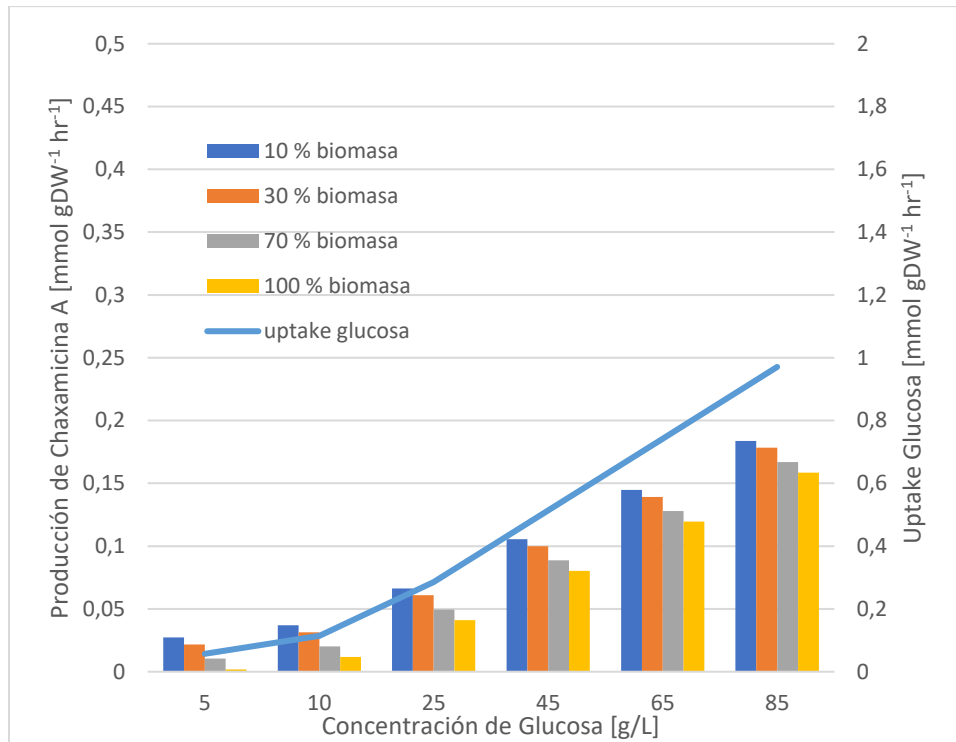


Figura 27: Concentración de glucosa [g/L] vs Producción de chaxamicina A [mmol gDW<sup>-1</sup>hr<sup>-1</sup>]

En la Figura 27 se aprecia el efecto de variar la concentración de glucosa [g/L] sobre la producción de chaxamicina A (barras de colores) para distintos porcentajes de la tasa de crecimiento default, junto con el consumo de glucosa (línea azul). Al aumentar la glucosa se aprecia que para el 100 % de biomasa existe un aumento desde 0,002 hasta 0,159 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], mientras que para el 10 % de biomasa, se tiene un aumento desde 0,02 hasta 0,184 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], alcanzando un valor máximo 16 % más alto para el caso 10 % con respecto al de 100 %.

## Producción de Chaxalactina A

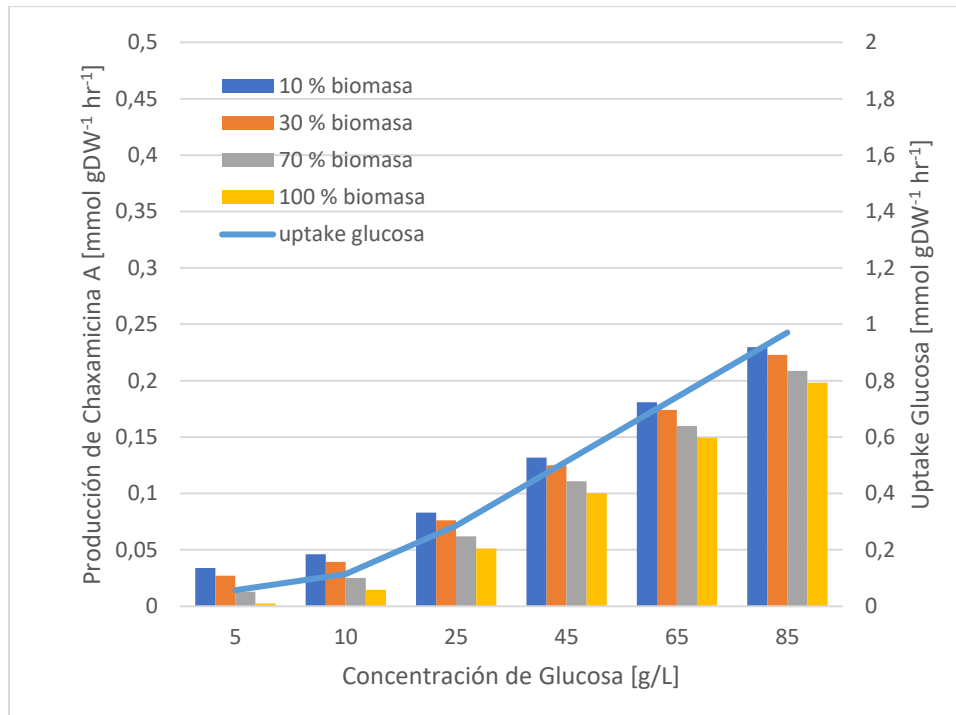


Figura 28: Concentración de glucosa [g/L] vs producción de chaxalactina A [mmol gDW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>].

En la Figura 28, se muestra el efecto de variar la concentración de glucosa entre los 5 y 85 [g/L] sobre la producción de chaxalactina A para distintos porcentajes de la tasa de crecimiento default, junto con el consumo de glucosa. Al aumentar la glucosa se aprecia que para el 100 % de biomasa existe un aumento desde 0,0024 hasta 0,198 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], mientras que para el 10 % de biomasa, se tiene un aumento desde 0,034 hasta 0,23 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], alcanzando un valor máximo 16 % más alto para el caso 10 % con respecto al de 100 %.



### 3.2.4.2. Alimentación con glicerol y glucosa

En esta sección, se realizaron simulaciones para crecimiento y producción de chaxamicina A y chaxalactina A utilizando como fuentes de carbono los valores máximos obtenidos de la alimentación solo glucosa, 85 [g/L] de glucosa para todos los objetivos, en conjunto con una variación de la concentración de glicerol desde 5 a 85 [g/L].

#### Crecimiento

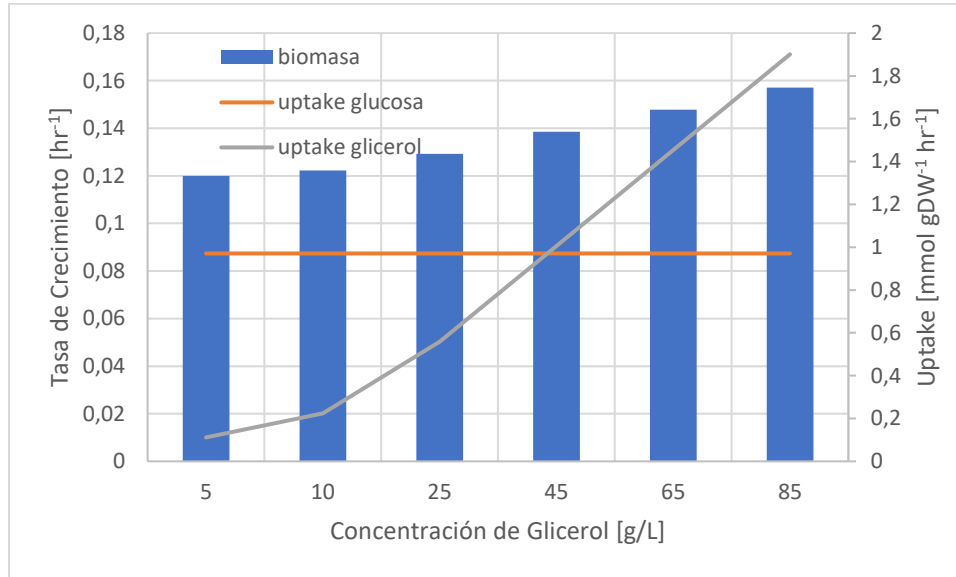


Figura 29: Efecto de la alimentación mixta [g/L] sobre la tasa de crecimiento de *S. leeuwenhoekii* C34.

En la Figura 29, se muestra el efecto de utilizar como fuente de carbono 85 [g/L] de glucosa y concentraciones variadas de glicerol [g/L] sobre la tasa de crecimiento [mmol gDW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>] de *S. leeuwenhoekii* C34 (barras azules), además del consumo de glucosa (línea naranja) y de glicerol (línea gris). Se observa un aumento desde 0,12 hasta 0,157 [h<sup>-1</sup>] para 5 y 85 [g/L] de glicerol respectivamente.

## Producción de chaxamicina A

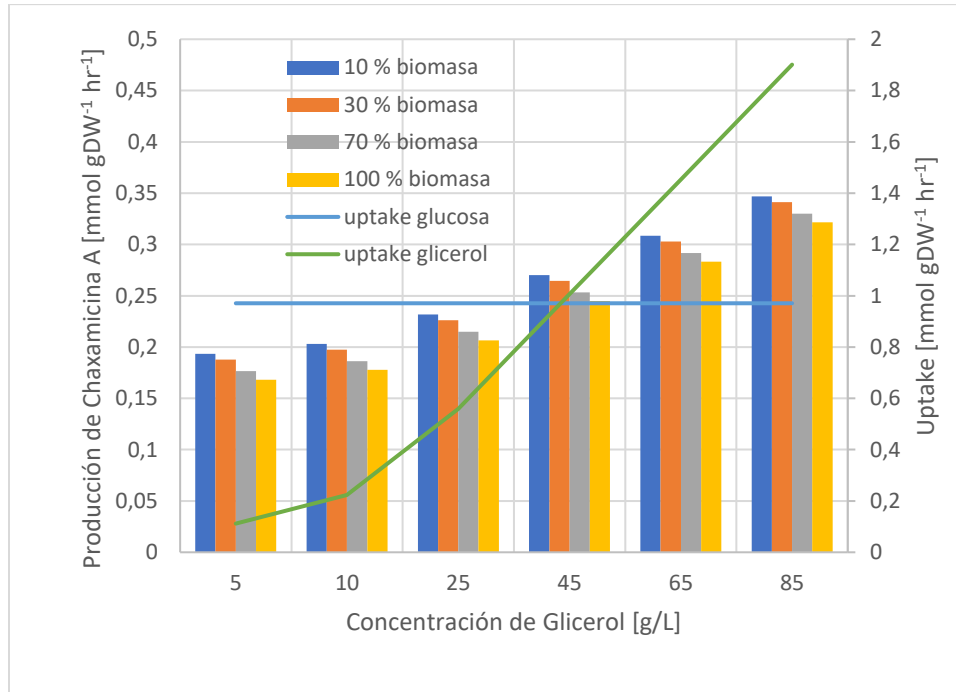


Figura 30: Efecto de la alimentación mixta [g/L] sobre la producción de chaxamicina A en *S. leeuwenhoekii* C34.

En la Figura 30, se muestra el efecto de utilizar como fuente de carbono 85 [g/L] de glucosa y concentraciones variadas de glicerol [g/L] sobre la producción de chaxamicina A [mmol gDW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>] en *S. leeuwenhoekii* C34 (barras azules), además del consumo de glucosa (línea azul) y de glicerol (línea verde). Al aumentar el glicerol desde 5 a 85 [g/L], se aprecia que para el 10 % de biomasa existe un aumento desde 0,193 hasta 0,347 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], mientras que para el 100 % de biomasa se tiene un aumento desde 0,169 hasta 0,322 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], alcanzando un valor máximo 8 % más alto para el caso 10 % con respecto al de 100 %.

## Producción de Chaxalactina A

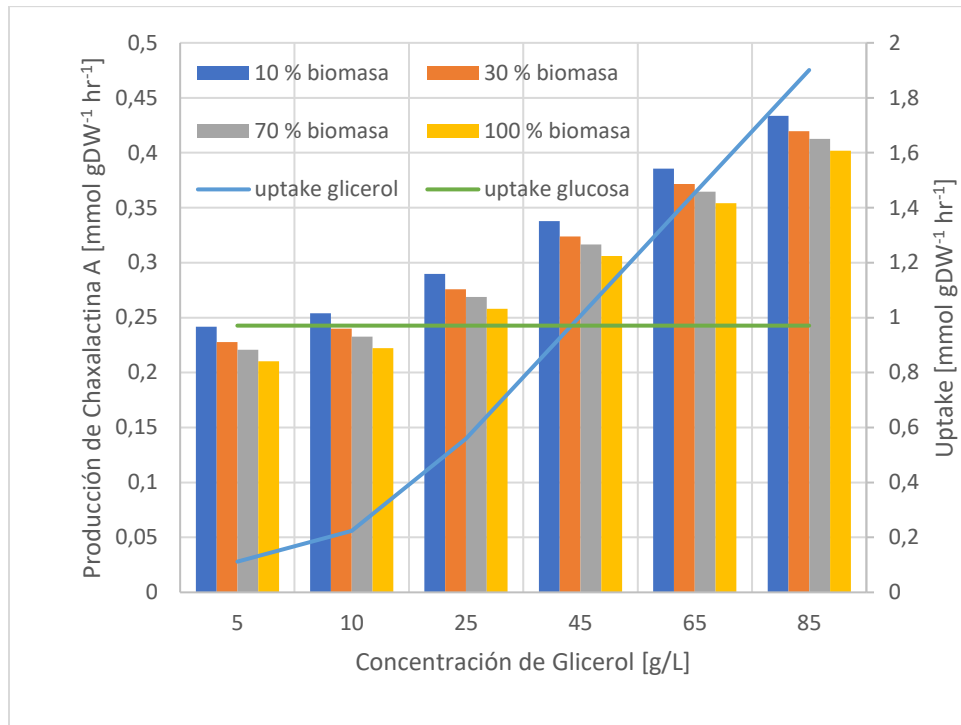


Figura 31: Efecto de la alimentación mixta [g/L] sobre la producción de chaxalactina A en *S. leeuwenhoekii* C34.

En la Figura 31, se muestra el efecto de utilizar como fuente de carbono 85 [g/L] de glucosa y concentraciones variadas de glicerol [g/L] sobre la producción de chaxalactina A [mmol gDW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>] en *S. leeuwenhoekii* C34 (barras azules) para distintos porcentajes de la tasa de crecimiento default, además del consumo de glucosa (línea azul) y de glicerol (línea verde). Al aumentar el glicerol desde 5 a 85 [g/L], se observa que para el 100 % de biomasa existe un aumento desde 0,21 hasta 0,402 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>], mientras que para el 10 % de biomasa, se tiene un aumento desde 0,242 hasta 0,43 [mmol g DW<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>].

### 3.2.5. sim\_u10i5\_vs\_i10

Se realizaron las siguientes simulaciones para obtener una comparación más cercana con los experimentos, utilizando las concentraciones exactas de glicerol y glucosa utilizadas en los experimentos.

#### *Crecimiento*

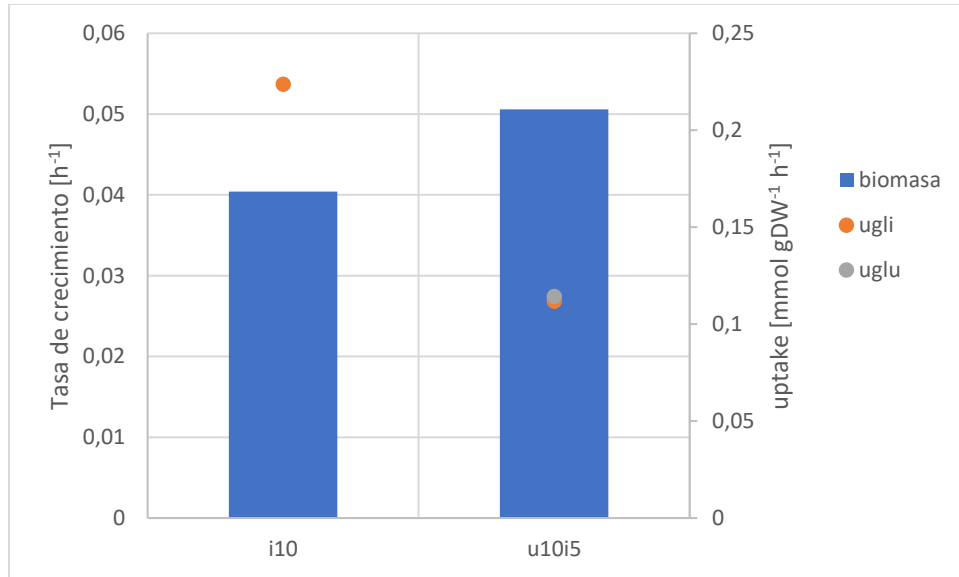


Figura 32: Tasa de crecimiento para las alimentaciones u10i5 e i5.

Se muestra la tasa de crecimiento (Figura 32) obtenida simulando las concentraciones de glicerol y glucosa (barras azules), junto con el consumo de ambos nutrientes para cada dieta (puntos de colores). La dieta u10i5 presenta una tasa de crecimiento un 25 % más alta que para la dieta i10. La

## Producción de metabolitos especializados

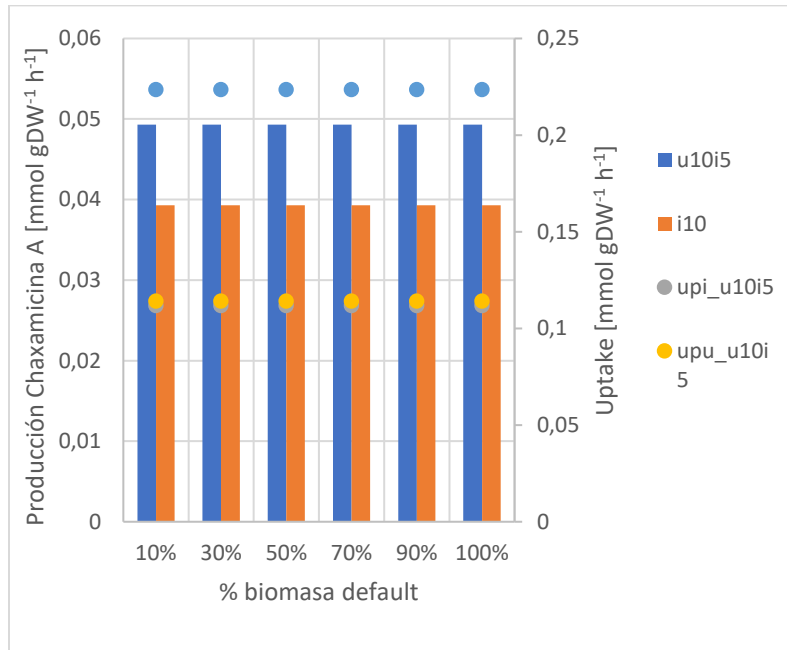


Figura 33: Producción de chaxamicina A para las alimentaciones u10i5 e i10 al variar la tasa de crecimiento.

Se muestra la producción de chaxamicina A (Figura 33) y Chaxalactina A (Figura 34) para ambas alimentaciones, u10i5 en azul e i10 en naranja, al variar la tasa de crecimiento en porcentajes respecto a la obtenida cuando el objetivo es crecimiento, junto con el consumo de ambos nutrientes en el eje izquierdo. Se puede observar que la producción de chaxamicina A no cambia significativamente en ambas alimentaciones independiente de la tasa de crecimiento, pese a que en todos los casos se consume todo el glicerol y la glucosa disponibles. Esto implica que el glicerol y la glucosa son limitantes para la producción de chaxalactina A y chaxamicina A, ya que incluso en el caso con menor crecimiento se consume todo el glicerol y la glucosa.

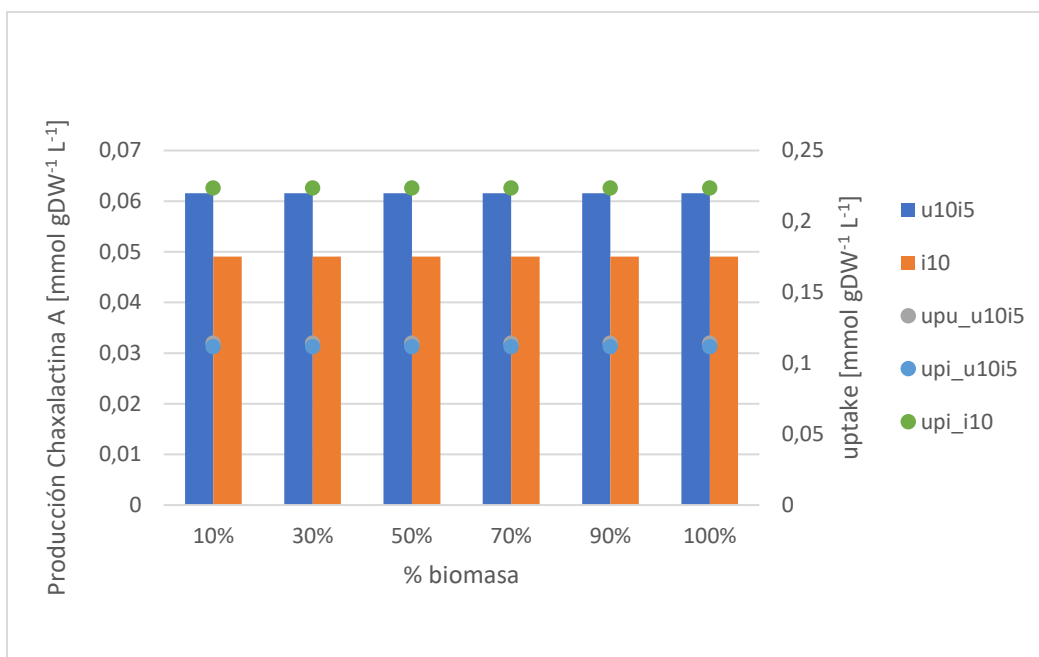


Figura 34: Producción de Chaxalactina A para las alimentaciones u10i5 e i10 para distintas tasas de crecimiento.

### 3.2.6. Comentarios generales

#### Consumo

El consumo de glicerol presenta una tendencia lineal creciente que se mantiene invariante en todas las simulaciones, independiente del objetivo (crecimiento o producción) o la alimentación (glicerol solo, o glicerol con glucosa). El consumo de glucosa también presenta una tendencia lineal creciente invariante respecto al objetivo, pero en la alimentación mixta se mantiene constante en el valor máximo de la alimentación solo glucosa. Sin embargo, alcanza la mitad de lo que se alcanza en el caso del glicerol. Esto puede deberse a que el peso molecular de la glucosa es el doble que el del glicerol (180,16 y 92 [g/mol]) y, por lo tanto, la misma cantidad de gramos contiene la mitad de moles de glucosa que de glicerol.

#### Crecimiento

El crecimiento máximo con la alimentación mixta es un 34 % más alto que los valores máximos alcanzados solo con glicerol o glucosa, que son prácticamente iguales (1 % de diferencia). Sin embargo, el crecimiento máximo de la alimentación conjunta (85 [g/L] para glicerol y glucosa) es solo un 67 % del alcanzado al sumar los crecimientos de las alimentaciones solo glicerol y solo glucosa

#### Producción de metabolitos especializados

Al analizar la producción de metabolitos especializados entre los casos con 10% y 100 % de biomasa, se tiene que para la alimentación solo glicerol se produce un 16

% más para 10% biomasa que para 100% biomasa tanto para chaxamicina A como chaxalactina A. Para la alimentación glucosa y alimentación mixta en cambio, se tiene una diferencia solamente del 8% en producción para 10 y 100 % de biomasa tanto para chaxamicina A como para chaxalactina A.

Al comparar la producción obtenida para la alimentación mixta con la obtenida con cada nutriente por separado, se tiene que tanto para chaxamicina A como para chaxalactina A, con el 100 % y 10% de biomasa la alimentación mixta excede en un 104 % y 90 % a alimentación de glucosa y de glicerol, respectivamente. Sin embargo, al comparar la alimentación mixta con la suma de lo obtenido con ambos nutrientes por separado, se tiene que para ambos metabolitos especializados, con 100 % y 10 % de biomasa la alimentación mixta produce 2% más y 5 % menos que la suma, respectivamente. Cabe mencionar que para todas las alimentaciones la producción máxima de chaxalactina A es un 25% más alta que la producción de chaxamicina A, con máximos obtenidos para el 10 % de biomasa.

Entre los supuestos utilizados para la construcción de simulaciones, se destacan los siguientes:

Los modelos de escala genómica se utilizan tradicionalmente para simular el metabolismo de un microorganismo, y como tal, la interacción con el medio de cultivo está dada por el consumo y producción de distintos compuestos. En este proyecto, el GSM se utilizó para simular las variaciones en las concentraciones de nutrientes presentes en el medio para la utilización de la bacteria, y para poder representar las concentraciones de nutrientes en la simulación, se debió realizar una transformación desde concentración [g/L] hasta consumo (*uptake*) [ $\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] según se explicita en el anexo 1.1.1. Para llevar a cabo esta tarea, se utilizó la densidad de biomasa [gDW/L] (encontrada en bibliografía [51]) correspondiente a la mitad del tiempo de cultivo de este proyecto como el promedio de la densidad de biomasa a lo largo de todo el cultivo, y que esa cantidad de biomasa invariante es capaz de consumir una cantidad de nutrientes por hora equivalente a la cantidad total de cada nutriente en particular dividido por el tiempo de cultivo.

Ambos supuestos restan exactitud a las simulaciones, ya que no toman en cuenta que al inicio del cultivo se cuenta con una cantidad pequeña de biomasa que irá consumiendo más nutrientes a medida que la bacteria crece. Siendo que el crecimiento de una bacteria normalmente posee cuatro etapas (lag, exponencial, estacionaria y fase de muerte)[52], tomar el promedio como cantidad de biomasa constante puede alejar los resultados de la realidad. Sin embargo, como las simulaciones son utilizadas para predecir tendencias y no resultados exactos, el efecto de este supuesto puede ser desestimado.

Cabe mencionar que no se tomaron en consideración los errores propios de los algoritmos de optimización utilizados por *Python* para realizar el FBA, ya que como se mencionó anteriormente, las simulaciones son utilizadas para predecir tendencias y no resultados exactos.

### 3.3. Comparación entre las simulaciones y los resultados experimentales, y comentarios generales

Con respecto a la optimización de parámetros, se utiliza el método de un factor a la vez, ya que resulta necesario obtener las curvas de crecimiento y producción de metabolitos sujetas a la variación de temperatura, pH o concentración de nutrientes, para poder realizar comparaciones con datos bibliográficos, tanto de valores como de tendencias. Esto no habría resultado posible con experimentos individuales planeados estratégicamente, o con variaciones de más de un parámetro a la vez.

No se puede comparar directamente el crecimiento de biomasa ni la producción de metabolitos entregada por la simulación con los obtenidos experimentalmente, ya que no poseen las mismas unidades ( $[h^{-1}]$  vs  $[gDW L^{-1}]$  y  $[mmol g DW^{-1} hr^{-1}]$  vs  $[cm gDW^{-1} L^{-1}]$ , respectivamente). Sin embargo, se podría esperar encontrar tendencias similares entre ambos.

Al comparar los resultados experimentales de la variación de glicerol con las simulaciones llevadas a cabo en el modelo de escala genómica iVR1007 para *S. leeuwenhoekii* C34, se pueden apreciar diferencias. Por ejemplo, al aumentar el glicerol hasta los 85 [g/L] en las simulaciones, estas predicen un aumento lineal en la tasa de crecimiento hasta los 45 [g/L] para luego aumentar en menor medida con el aumento de glicerol hasta los 85 [g/L]. Sin embargo, los experimentos muestran un aumento de la densidad celular hasta su máximo a los 65 [g/L], para luego disminuir con los 85 [g/L]. Dicha disminución del crecimiento observada experimentalmente ha sido reportada en estudios anteriores (ver Figura 3). Puede que la disminución en la generación de biomasa se deba a la producción de acetato predicha por el modelo bajo concentraciones altas de la fuente de carbono. El acetato es un inhibidor del crecimiento en concentraciones altas [53] (no se muestra).

Con respecto a la producción de metabolitos especializados, las simulaciones muestran un incremento lineal al aumentar la concentración de glicerol. Sin embargo, los experimentos demuestran que al aumentar la concentración de glicerol, se mantiene la producción de metabolitos a nivel de cultivo, pero se reduce la cantidad producida por densidad de células. Es decir, se ve el efecto contrario al que se aprecia en las simulaciones en la producción unitaria de metabolitos especializados. Esto puede deberse a que el GSM no toma en cuenta la composición del medio de cultivo, por lo que no incluye reacciones que describan un *feedback* negativo por parte de los metabolitos especializados producidos por la bacteria, efecto que parece ocurrir en los experimentos. Consistiría en que, una vez alcanzada una determinada concentración de determinado metabolito, éste inhiba su propia producción. Por otro lado, si se toma en cuenta que a mayor concentración inicial de glicerol se obtiene mayor producción de biomasa, el requerimiento de carbono de dicha densidad de biomasa para subsistir/ reproducirse es mayor, y el carbono que queda disponible para producción de metabolitos especializados es menor. Ambas hipótesis requieren de experimentos adicionales para su validación. La hipótesis del *feedback* negativo es cuestionable, ya que para 85 [g/L] se observa el máximo de producción a nivel de cultivo. Si en realidad la causa de la disminución



en la producción se debe a un *feedback* negativo, la producción a nivel de cultivo debería estancarse. En contraste, ya que a los 85 [g/L] de glicerol se tiene una disminución en la densidad de biomasa y un ligero aumento de pu respecto al caso con 65 [g/L] de glicerol, es más probable que la hipótesis de los recursos limitados sea la más acertada.

Con respecto a la alimentación mixta, las simulaciones inespecíficas (distintas concentraciones de glucosa y glicerol entre simulaciones y experimentos) indican que los cultivos con glicerol y glucosa (Figura 29) presentarían mayor crecimiento que los de solo glicerol (Figura 23) y solo glucosa (Figura 26), pero esto solo ocurre experimentalmente a los 30 [°C] (Figura 18), mientras que para el resto de las temperaturas se tiene mayor crecimiento para la dieta alimentada solo con glicerol. Para la producción de metabolitos a nivel de cultivo solamente se cuenta con halos más grandes para la alimentación mixta a las temperaturas 27 y 30°C (Figura 19), pero no se mantiene la tendencia predicha por las simulaciones para todos los casos (un nivel de producción significativamente más alto para la alimentación mixta). Si se compara la simulación mencionada con la producción unitaria, en el máximo de producción, que se obtuvo para ambas alimentaciones a los 37 [°C], se cumple que la alimentación mixta conlleva una producción más alta que la alimentación con glicerol, pero para el resto de las temperaturas, las diferencias son despreciables.

Las diferencias encontradas para crecimiento y producción al variar la temperatura se deben a un nivel de actividad enzimática distinto, causado por la diferencia de temperatura (dicho fenómeno ya ha sido documentado [54]–[57]), para los variados procesos celulares asociados a *S. leeuwenhoekii* C34. Sin embargo, el modelo no toma en cuenta el factor temperatura, por lo que sus predicciones corresponderán a los experimentos realizados a 30 °C, que es la temperatura a la que se cultiva normalmente *S. leeuwenhoekii* C34, y fue la utilizada a la hora de extraer la información para la construcción del GSM.

Si se comparan las simulaciones para tasa de crecimiento (Figura 32) con los experimentos para las alimentaciones u10i5 e i10 (Figura 18), realizadas con las mismas concentraciones de glucosa y glicerol que los experimentos, se tiene que en los experimentos hay mayor crecimiento para u10i5 que para i10, al igual que en las simulaciones. Adicionalmente, al comparar la simulación para producción de metabolitos especializados (Figura 33 y Figura 34), con la producción unitaria de ambas alimentaciones (Figura 21 y Figura 22), se aprecia que la producción en la alimentación u10i5 es más alta que en i10 tanto en las simulaciones como en los experimentos.

Como se mencionó anteriormente, el modelo no está completo. Esto puede ser la causa de que se esté simulando crecimiento con fuentes que en realidad no lo producen. Puede ser que, como se utilizaron datos de otras cepas de *Streptomyces* para completar el modelo, en *S. leeuwenhoekii* C34 no existan rutas metabólicas que en otras cepas si y, por lo tanto, *S. leeuwenhoekii* C34 sea incapaz de crecer con dichas fuentes de carbono como fuente única de carbono.

Un tema que puede resultar relevante para estudios futuros es la fuente de carbono utilizada, ya que como se mencionó anteriormente, el glicerol y la glucosa no se encuentran entre las fuentes de carbono más eficientes para crecimiento ni para producción de metabolitos. Dentro de las 3 más eficientes entregadas por las simulaciones, no se registró crecimiento en los experimentos de Biolog (Tabla 3) con rafinosa y estaquiosa, por lo que, si se quisiera utilizar la mejor alimentación, debería emplearse dextrina como base para el crecimiento y rafinosa como fuente de carbono para la producción.

Cabe destacar que las simulaciones fueron capaces de predecir que, tanto para crecimiento como para producción de metabolitos especializados, los valores obtenidos para la alimentación mixta serían menores que los resultantes de sumar los valores obtenidos para las alimentaciones con una sola fuente. Esto resulta relevante si se toma en cuenta que cuando el objetivo es crecimiento, el algoritmo desprecia todas las reacciones que no sean esenciales para el objetivo, lo que implica que la diferencia mencionada anteriormente se deba a genes asociados al mantenimiento de las bacterias.

En las simulaciones para crecimiento se produce 174 % más de acetato con glucosa y glicerol que solo con glucosa o solo con glicerol, y un 37% más que si se suma lo obtenido por glucosa y glicerol por separado. Si se analiza la ruta metabólica de la glicólisis (encontrada en el siguiente [link](#)<sup>6</sup>), se ve que parte de la glucosa se transforma en acetato, y parte de la glucosa se transforma en  $\alpha$ -D glucosa para luego ingresar al ciclo de producción de chaxamicinas y chaxalactinas. La producción de acetato a partir de glicerol también puede ser encontrada en el mapa metabólico que puede ser encontrado en las bases de datos de KEGG para *S. leeuwenhoekii* C34 ( el glicerol y el acetato aparecen como puntos rojos en el mapa metabólico presentado en el siguiente [link](#)<sup>7</sup> ) pero es mucho menos directo que el caso de la glucosa que solamente involucra la ruta metabólica de la glicolisis. En el caso del glicerol se atraviesan varias rutas metabólicas, entre las que se encuentran glicolisis/glucogénesis, metabolismo de fructosa y manosa, y el metabolismo del piruvato.

Dentro del mapa metabólico de *S. leeuwenhoekii* C34, la producción y el consumo de acetato se encuentran en los metabolismos del carbono, del metano, del glioxilato y dicarboxilato, del piruvato, de la taurina y la hipotaurina, y la glicolisis y glicogénesis. Dentro de estas rutas metabólicas existe 1 gen asociado a reacciones de producción, 12 genes asociados a reacciones de consumo, y 17 genes asociados a reacciones de producción y consumo. De dichos genes, solo 6 de los asociados a consumo comparten una misma ruta metabólica la glucosa, solo 5 de los asociados a producción y consumo comparten una misma ruta metabólica que la glucosa, y ninguno comparte una misma ruta metabólica con el glicerol. Mayor información al respecto puede encontrarse en el anexo 6.

---

<sup>6</sup> [https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=sle00010&keyword=c00033](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=sle00010&keyword=c00033)

<sup>7</sup> [https://www.kegg.jp/keggbin/highlight\\_pathway?scale=0.5&map=map01100&keyword=c00033%20c00116](https://www.kegg.jp/keggbin/highlight_pathway?scale=0.5&map=map01100&keyword=c00033%20c00116)

Se puede ver que la producción de acetato está mediada por varios genes asociados a distintas rutas metabólicas, y que algunas de estas rutas incluyen glucosa, pero ninguna incluye glicerol. Por lo tanto, la producción de acetato se llevará a cabo independiente de la fuente de carbono con que se alimente la bacteria mientras dicha fuente de carbono esté en altas concentraciones. Por lo anterior, llevar a cabo delecciones o silenciamiento de genes no sería una opción efectiva para evitar tener concentraciones altas de acetato y así remediar el efecto negativo de este compuesto sobre la formación de biomasa.

A partir de simulaciones realizadas en el modelo iVR1007 se observaron los siguientes fenómenos: Al utilizar la alimentación mixta en contraste con la individual de glucosa o glicerol, el crecimiento sufre un efecto negativo en términos de rendimiento de fuente de carbono a generación de biomasa. En contraste, la producción de acetato extracelular se ve potenciada. Por lo tanto, la célula utiliza parte del carbono que antes utilizaba en crecimiento para la producción de acetato. Esto se explica ya que el acetato es tóxico para las células en niveles altos e inhibe el crecimiento [53], por lo que la célula se deshace del exceso de acetato liberándolo al medio extracelular.

Se observa una producción de nitratos para la alimentación con glicerol, alcanzando valores de 7,5, mientras que con la alimentación mixta o solo con glucosa se libera muy poco nitrógeno y es en forma de nitritos. Puede que sea porque el glicerol está involucrado en menos procesos metabólicos que la glucosa (que involucran nitrógeno), y que por lo tanto, la producción de nitratos corresponda a la eliminación del exceso de nitrógeno. La producción de chaxamicinas y chaxalactinas mantiene su mismo rendimiento en todas las alimentaciones.

### 3.4. Comparación a nivel de producción industrial

En esta sección, se realiza una breve comparación entre el proceso de producción de antibióticos sintéticos vs el proceso de producción industrial para metabolitos especializados de *S. leeuwenhoekii* C34 tentativo que se muestra a continuación. Para realizar la comparación, se utilizan antibióticos sintéticos que poseen actividad contra *S. aureus* resistente a la metelicina (MRSA por sus siglas en inglés).

#### Metabolitos especializados de *S. leeuwenhoekii*

A continuación, se muestra un diagrama de flujo del proceso productivo tentativo para chaxamicinas y chaxalactinas a escala industrial, basándose en el proceso de producción a nivel de laboratorio:

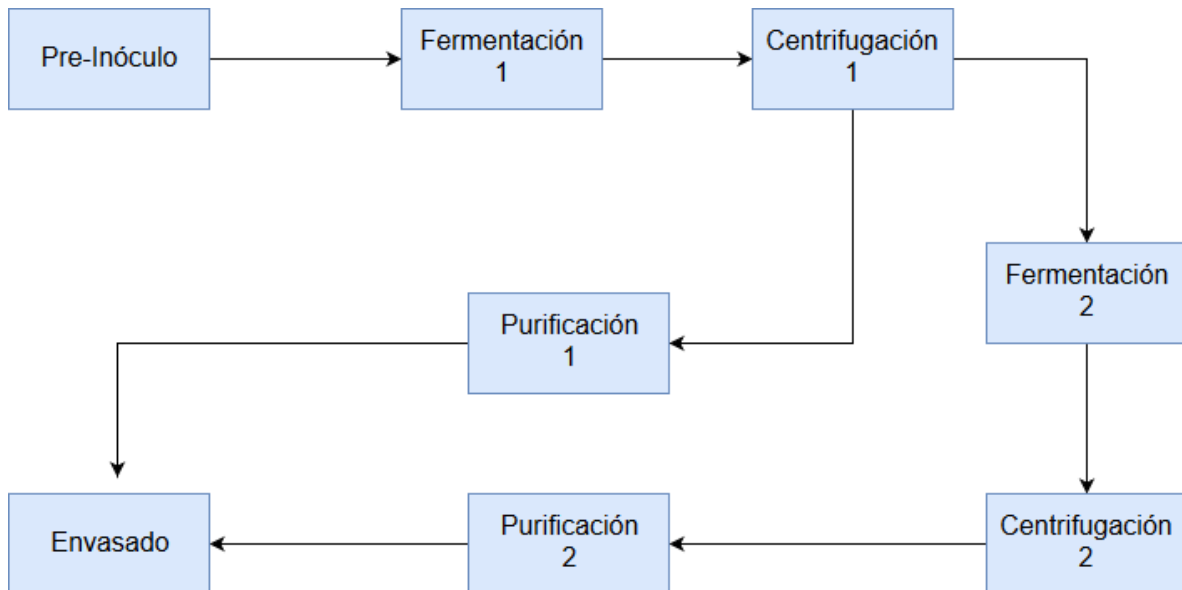


Figura 35: Diagrama de flujo de un proceso de producción de chaxamicinas a nivel industrial.

Las etapas se pueden describir brevemente de la siguiente forma:

**Cultivo semilla:** Se prepara un cultivo de *S. leeuwenhoekii* C34 con las condiciones resultantes de la optimización. Este cultivo servirá para inocular los reactores industriales.

**Fermentación para crecimiento:** Se inoculan los reactores industriales con litros del cultivo semilla en medio mISP2 utilizando las condiciones optimizadas para crecimiento, a 200 rpm durante 108 horas

**Centrifugación 1:** Se hacen pasar los medios de cultivo a través de una centrífuga para separar las proteínas del pellet celular.

**Purificación 1:** Se purifican los metabolitos especializados contenidos en el sobrenadante de la centrifugación 1 utilizando HPLC, con lo que se obtiene cada especie por separado.

**Fermentación para producción:** Se inoculan los reactores industriales el pellet celular proveniente de la centrifugación 1, y medio mISP2 utilizando las condiciones optimizadas para producción, a 200 rpm durante 108 horas.

**Centrifugación 2:** Se hacen pasar los medios de cultivo de la fermentación para producción a través de una centrífuga para separar las proteínas del pellet celular.

**Purificación 2:** Se purifican los metabolitos especializados contenidos en el sobrenadante de la centrifugación 2 utilizando HPLC, con lo que se obtiene cada especie por separado.

**Envasado:** Se envasan las fracciones obtenidas de la HPLC de las purificaciones 1 y 2. Cada metabolito se envasa por separado para aprovechar sus propiedades específicas contra distintos microorganismos.

### Proceso productivo de antibióticos de origen sintético

Existen varios tipos de sustancias químicas que tienen actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, tales como sulfonamidas, tales como sulfametoxazol [58], quinolonas tales como el ácido nalidixico, ácido oxonílico, ácido pipemídico, ácido piromídico [59], [60], fluoroquinolonas tales como ciprofloxacina, enoxacina y ofloxacina [61]. Tomaremos el proceso de producción de la ciprofloxacina como ejemplo para realizar la comparación.

Las etapas de producción de l-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-piperazino-quinolina-3- ácido carboxílico, más conocida como ciprofloxacina, a partir de 2,4,5-trifluorobenzoyl cloruro y amino acrilato son las siguientes [62], [63]:

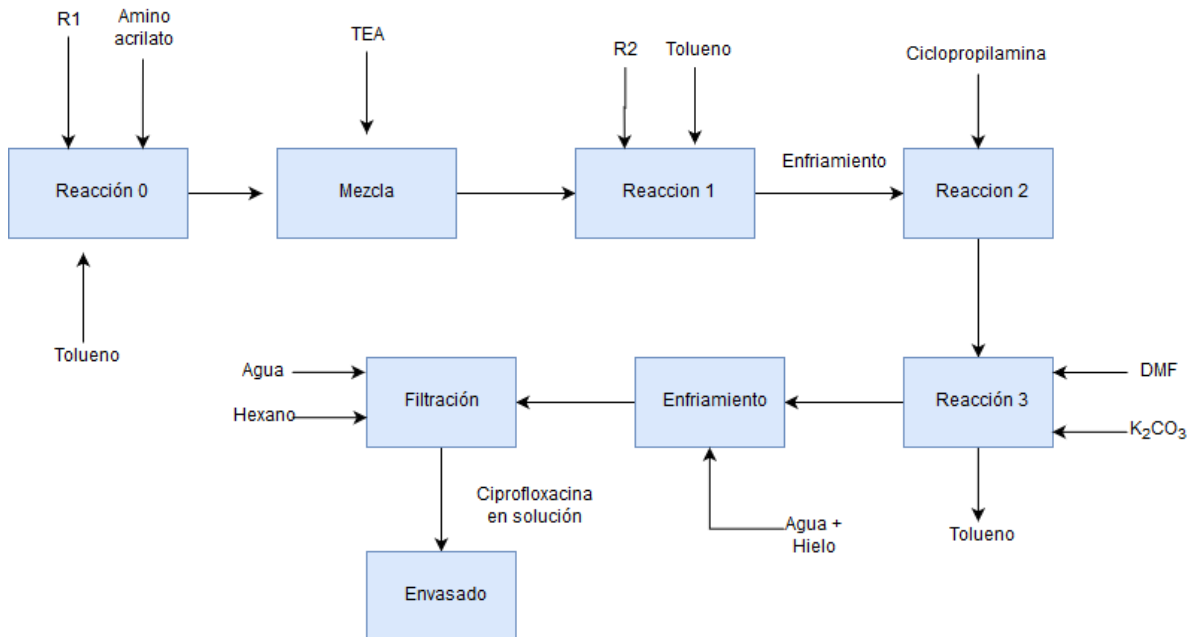


Figura 36: Diagrama de flujos de la producción de ciprofloxacina.

Información adicional sobre las reacciones necesarias para la formación de ciprofloxacina, y los compuestos que participan en ellas, puede encontrarse en el anexo 5.

1. **Reacción 0:** Se hace reaccionar 2,4,5-trifluorobenzoyl cloruro (R1) y amino acrilato en una solución de tolueno para formar *3-dimethylamino-acrylic acid methyl ester* (R1).
2. **Mezcla 1:** Se añade trietilalumina (TEA) a una solución de *3-dimethylamino-acrylic acid methyl ester* en tolueno, mezclando rigurosamente.
3. **Reacción 1:** Se añade una solución de *2,4-dichloro 5- fluoro benzoylchloride* (R2) en tolueno y se aplica calor.
4. **Reacción 2:** Después de un enfriamiento, se añade cyclopropilamina. Se deja reaccionar a temperatura ambiente.
5. **Reacción 3:** Se añade carbonato de potasio ( $K_2CO_3$ ) y *N,N-Dimethylformamide* (DMF) a la mezcla y se deja reaccionar en presencia de agitación. Luego, se extrae el tolueno.
6. **Enfriamiento:** Se enfría la mezcla utilizando agua con hielo.
7. **Filtración:** Se hace pasar la mezcla a través de un tamiz para separar los sólidos de los residuos de los reactantes.
8. **Lavado:** Se lava el tamiz con agua y hexano para obtener el producto.

## Ventajas y desventajas

Al comparar las etapas de ambos procesos, se aprecia que para la producción de ciprofloxacina, se requieren 4 reacciones que utilizan varios reactivos (ver detalle en el anexo 77), mientras que para la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34, solo se requiere agua, extracto de malta, extracto de levadura, glucosa y glicerol. Además, para la producción de ciprofloxacina resulta necesario subir y bajar la temperatura para permitir que ocurran las distintas reacciones, mientras que para el caso de biosíntesis solo se requiere mantener a 30 °C para crecimiento y 37°C para producción. Cabe mencionar que para la producción de metabolitos en *S. leeuwenhoekii* C34, el proceso de purificación requiere la tecnología HPLC, mientras que para ciprofloxacina es necesario un tamiz.

Por lo anteriormente descrito, la producción de ciprofloxacina debería costos mayores en términos de insumos debido al elevado número de reactivos requeridos, y de la energía requerida para el control de temperatura, por lo que la biosíntesis en *S. leeuwenhoekii* C34 implicaría costos de producción mucho menores. Sin embargo, no se puede realizar una comparación adecuada de costos sin hacer primero un escalamiento apropiado del proceso de producción en *S. leeuwenhoekii* C34 para conocer los requerimientos reales de insumos y sus costos.

Con respecto a la naturaleza de los reactivos utilizados, la producción de ciprofloxacina conlleva 4 reacciones y la adición de numerosos reactivos tóxicos para la salud y el medioambiente, como se detalla en el anexo 5. Para la producción de chaxamicinas y chaxalactinas se requiere solamente sustancias inocuas de origen natural que pueden ser consumidas por humanos, por lo que las únicas sustancias potencialmente tóxicas serían las producidas por la bacteria, pero aún no se han realizado estudios de toxicidad para dichas sustancias. En consecuencia, los reactivos utilizados en producción de ciprofloxacina representan un peligro para la salud humana y el medioambiente, requieren de extrema precaución durante su utilización y deben ser manejados apropiadamente a la hora de desechar los residuos de las reacciones. Por el contrario, para la biosíntesis se puede recurrir a plantas de tratamiento de RILes y compostaje (tras una esterilización por vapor) al tratarse principalmente de materia orgánica.

Otro aspecto que no puede ser ignorado, es que todos los antibióticos que se encuentran en el mercado están perdiendo su efectividad, con cada día que pasa, frente a los microorganismos que deben combatir [59], mientras que como provienen de extremófilos aislados geográficamente y aun no se lanzan al mercado, las chaxamicinas y chaxalactinas aún no han visto su efectividad menguada. Es decir, poseen una ventaja en su efectividad en un número arbitrario de años a futuro con respecto a los antibióticos que ya se encuentran en el mercado.

## 4. Conclusiones

Dado que las simulaciones para crecimiento y producción con varias fuentes de carbono (una a la vez) arrojaron que las mejores fuentes de carbono para ambos casos eran estaquiosa, dextrina y rafinosa, se recomienda realizar nuevos experimentos de optimización incluyendo estas fuentes de carbono a modo de suplemento para producción, pero no como fuente principal debido a que experimentalmente se determinó (Biolog) que el cultivo no crece bajo esas condiciones.

De forma general, se observa que los gráficos obtenidos a partir de los experimentos muestran tendencias similares a las encontradas en bibliografía sobre crecimiento y producción de metabolitos, tanto para la temperatura como para la concentración de nutrientes, es decir, en formas similares a una campana. Sin embargo, para la variación de pH solo se observan tendencias conocidas para la producción de metabolitos, ya que para el crecimiento se cuenta con resultados anómalos difíciles de explicar. Los experimentos para la variación de pH fueron repetidos hasta 6 veces obteniendo la misma tendencia, por lo que es poco probable que los resultados se deban a errores humanos.

Para la comparación entre las alimentaciones con glicerol y glucosa (u10i5) y solo con glicerol (i10), se determinó que la capacidad de *S. leeuwenhoekii* C34 para procesar ambas fuentes de carbono difiere con la temperatura, posiblemente debido a cambios en la actividad de las enzimas asociadas a la metabolización de cada fuente, y su utilización para producción de biomasa y de metabolitos especializados a lo largo de todas las rutas metabólicas involucradas. Lo anterior se ve reflejado en que para distintas temperaturas, la alimentación que produjo mejores resultados no siempre fue la misma. Adicionalmente, se observó que la termo estabilidad de las enzimas asociadas a la producción de metabolitos secundarios para u10i5 se vio seriamente comprometida para 40[°C], ya que no se produjo HIC a dicha temperatura. No se puede afirmar lo mismo con certeza para el caso de la utilización de u10i5 en crecimiento, ya que no es posible determinar si el escaso crecimiento obtenido se debe únicamente a la metabolización de glicerol o si la glucosa fue aprovechada para crecimiento. En el caso de que fuera solo por acción de glicerol, el hecho de que no se hayan producido metabolitos especializados podría indicar que la termo estabilidad de las enzimas relacionadas con la metabolización del glicerol también se haya visto comprometida en cierta medida, y/o que la cantidad de glicerol no era suficiente para permitir una producción de metabolitos en una concentración mayor o igual a la CMI para *S. aureus* dada la temperatura.

La mayoría de las tendencias de crecimiento y producción de metabolitos especializados coinciden entre las simulaciones y los experimentos. Sin embargo, como el modelo no incluye restricciones relacionadas con elementos regulatorios, existen diferencias tales como los efectos de *feedback* negativo mencionados anteriormente. El modelo tampoco considera las interacciones entre células, por lo que la producción unitaria de metabolitos especializados presenta tendencias opuestas, es decir, se producen menos metabolitos al aumentar el glicerol, lo que puede deberse a que al haber alta producción de biomasa, la cantidad de



metabolitos que debe producir cada célula para alcanzar una concentración óptima para *S. leeuwenhoekii* C34 sea menor. Dicha situación puede verse potenciada por un efecto de *feedback* negativo producido por la concentración de metabolitos en el medio.

Adicionalmente, solo es posible realizar las comparaciones entre las simulaciones y las variaciones de concentración de nutrientes, ya que el modelo no considera condiciones físicas como temperatura o pH.

Se encontraron condiciones óptimas distintas para la generación de biomasa y para la producción de metabolitos, por lo que se propuso un proceso productivo compuesto de dos fases. De esta forma, la cantidad total de metabolitos producida debería ser mayor que si se utilizan solamente las condiciones óptimas para producción, pero es necesario realizar pruebas para determinar la relevancia de la diferencia en producción para ambos casos.

Con respecto a la comparación del proceso productivo tentativo para chaxamicinas y chaxalactinas con el proceso de producción de ciprofloxacina (alternativa presente en el mercado producida a través de síntesis química), se determinó que producir chaxamicinas y chaxalactinas conlleva un menor riesgo para la salud humana y para el medioambiente al utilizar insumos inocuos en contraste con varios reactivos peligrosos para el caso de la ciprofloxacina. Adicionalmente, la producción de ciprofloxacinas requiere elevadas temperaturas mientras que para chaxamicinas no, es decir, ciprofloxacina requiere un gasto energético considerablemente mayor. No se realiza una comparación de costos acabada, ya que sería necesario realizar un escalamiento y cotizaciones completas para el proceso productivo de chaxamicinas, y comparar el mismo volumen de producción en ambos casos. Sin embargo, dados los insumos que se requieren en cada caso, sumado al gasto energético adicional para el caso de ciprofloxacinas, es probable que los costos de producción de ciprofloxacinas sean mayores que los resultantes para la producción de metabolitos especializados en *S. leeuwenhoekii* C34.

Gracias a las simulaciones realizadas en este trabajo sobre el crecimiento y producción de metabolitos en distintas fuentes de carbono, se puede realizar una optimización completa de la composición del medio para la producción de metabolitos. Además, se puede producir chaxamicinas y chaxalactinas de forma maximizada con glicerol como su fuente de carbono, utilizando las condiciones óptimas encontradas para pH, temperatura y concentración de nutrientes. Debido a la optimización realizada, es posible ahorrar dinero tanto en términos de materias primas como energía utilizada. Adicionalmente, se demostró que el proceso de producción de chaxamicinas y chaxalactinas no utiliza reactivos tóxicos para la salud humana ni para el medioambiente a diferencia de las alternativas de síntesis química, lo que en teoría abarataría los costos tanto por el precio de los reactivos como por la complejidad de la etapa de purificación y el manejo de residuos peligrosos.

Todo lo anterior permite que una vez que se tengan listos los estudios clínicos, el producto pueda ser comercializado a precios menores que la competencia, y ser más accesible para los pacientes con menor capacidad adquisitiva.

## 5. Bibliografía

- [1] "Paul Ehrlich | Science History Institute." [Online]. Available: <https://www.sciencehistory.org/historical-profile/paul-ehrllich>. [Accessed: 24-Mar-2019].
- [2] "The history of antibiotics | Microbiology Society." [Online]. Available: <https://microbiologysociety.org/education-outreach/antibiotics-uneearthed/antibiotics-and-antibiotic-resistance/the-history-of-antibiotics.html>. [Accessed: 24-Mar-2019].
- [3] "WHO EMRO | What is the difference between antibiotic and antimicrobial resistance? | Antimicrobial resistance | Health topics." [Online]. Available: <http://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/what-is-the-difference-between-antibiotic-and-antimicrobial-resistance.html>. [Accessed: 30-Mar-2019].
- [4] H. Nankervis, K. S. Thomas, F. M. Delamere, S. Barbarot, N. K. Rogers, and H. C. Williams, "Antimicrobials including antibiotics, antiseptics and antifungal agents," 2016.
- [5] "Antibiotic Side Effects, Resistance, Types & Drug Interactions." [Online]. Available: [https://www.emedicinehealth.com/antibiotics/article\\_em.htm](https://www.emedicinehealth.com/antibiotics/article_em.htm). [Accessed: 30-Mar-2019].
- [6] "Dr. Godfred A. Menezes | ResearchGate." [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/profile/Dr\\_Godfred\\_Menezes](https://www.researchgate.net/profile/Dr_Godfred_Menezes).
- [7] "What is the difference between Antibiotics and Antibacterials?" [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/post/What\\_is\\_the\\_difference\\_between\\_Antibiotics\\_and\\_Antibacterials](https://www.researchgate.net/post/What_is_the_difference_between_Antibiotics_and_Antibacterials). [Accessed: 30-Mar-2019].
- [8] "antibiotic | Origin and meaning of antibiotic by Online Etymology Dictionary." [Online]. Available: <https://www.etymonline.com/word/antibiotic>. [Accessed: 30-Mar-2019].
- [9] "Antibiotics: Are you misusing them? - Mayo Clinic." [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/consumer-health/in-depth/antibiotics/art-20045720>. [Accessed: 24-Mar-2019].
- [10] "Causes of Antimicrobial (Drug) Resistance | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases." [Online]. Available: <https://www.niaid.nih.gov/research/antimicrobial-resistance-causes>. [Accessed: 14-Mar-2019].
- [11] "Antibiotic resistance." [Online]. Available: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. [Accessed: 14-Jun-2018].
- [12] E. Stackebrandt and C. R. Woese, "Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms," *Curr. Microbiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 197–202, Jul. 1981.

- [13] K. Tiwari and R. K. Gupta, "Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 32, no. 2, pp. 108–132, Jun. 2012.
- [14] R. Baltz, "Antimicrobials from actinomycetes: Back to the future," *Microbe*, no. 2, pp. 125–131, 2007.
- [15] M. Goodfellow and S. T. Williams, "Ecology of Actinomycetes," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 37, no. 1, pp. 189–216, Oct. 1983.
- [16] A. Hasani, A. Kariminik, and K. Issazadeh, "Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities," *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 63–75, 2014.
- [17] A. Lazzarini, L. Cavaletti, G. Toppo, and F. Marinelli, "Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 78, no. 3/4, pp. 399–405, 2000.
- [18] K. Busarakam, A. T. Bull, G. Girard, D. P. Labeda, G. P. van Wezel, and M. Goodfellow, "Streptomyces leeuwenhoekii sp. nov., the producer of chaxalactins and chaxamycins, forms a distinct branch in Streptomyces gene trees," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 105, no. 5, pp. 849–861, May 2014.
- [19] T. A. Taylor and C. G. Unakal, *Staphylococcus Aureus*. StatPearls Publishing, 2018.
- [20] M. E. Rateb *et al.*, "Chaxamycins A–D, Bioactive Ansamycins from a Hyper-arid Desert *Streptomyces* sp.," *J. Nat. Prod.*, vol. 74, no. 6, pp. 1491–1499, 2011.
- [21] "Los peligros de la bacteria Escherischia coli enterohemorrágica." [Online]. Available: <https://salud.ccm.net/faq/5652-los-peligros-de-la-bacteria-escherischia-coli-enterohemorragica#sintomas>. [Accessed: 14-Jun-2018].
- [22] "Staph Infection Symptoms, Causes, Pictures & Treatment." [Online]. Available: [https://www.medicinenet.com/staph\\_infection/article.htm#what\\_is\\_staphylococcus\\_what\\_causes\\_a\\_staph\\_infection](https://www.medicinenet.com/staph_infection/article.htm#what_is_staphylococcus_what_causes_a_staph_infection). [Accessed: 14-Jun-2018].
- [23] A. T. Bull and J. A. Asenjo, "Microbiology of hyper-arid environments: recent insights from the Atacama Desert, Chile," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 103, no. 6, pp. 1173–1179, Jun. 2013.
- [24] M. E. Rateb *et al.*, "Diverse Metabolic Profiles of a *Streptomyces* Strain Isolated from a Hyper-arid Environment," *J. Nat. Prod.*, vol. 74, no. 9, pp. 1965–1971, Sep. 2011.
- [25] V. Singh, S. Haque, R. Niwas, A. Srivastava, M. Pasupuleti, and C. K. M. Tripathi, "Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review.," *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 2087, 2016.
- [26] R. A. Fisher, "The Arrangement of Field Experiments," Springer, New York, NY, 1992, pp. 82–91.
- [27] Y. Nagata and K. H. Chu, "Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, no. 21, pp. 1837–1842,

2003.

- [28] "Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica - Temas de bacteriología y virología médica." .
- [29] E. L. F. de Bobadilla, A. P. Reig, and M. R. Creixems, "Procedimientos en Microbiología Clínica, Hemocultivos 3a.2003," 2003.
- [30] "LA UTILIDAD DE LOS ANTIBIOGRAMAS - MiProma." [Online]. Available: <http://miproma.es/la-utilidad-de-los-antibiogramas/>. [Accessed: 19-Mar-2019].
- [31] K. Jayaprakash and M. Vijayalakshmi, "Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus*," *Medwell Journals. Res. J. Pharmacol.*, vol. 2, no. 1, pp. 4–7, 2008.
- [32] A. I. Khattab, E. H. Babiker, and H. A. Saeed, "Streptomyces: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites," *Int. Curr. J.*, vol. 5, no. 3, pp. 27–32, 2016.
- [33] L. S. Singh, S. Mazumder, and T. C. Bora, "Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D," *J. Mycol. Med.*, vol. 19, no. 4, pp. 225–233, Dec. 2009.
- [34] L. S. Singh, S. Mazumder, and T. C. Bora, "Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D," *J. Mycol. Med.*, vol. 19, no. 4, pp. 225–233, Dec. 2009.
- [35] L.-H. Lee *et al.*, "Streptomyces pluripotens sp. nov., a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 64, no. Pt 9, pp. 3297–3306, Sep. 2014.
- [36] S. Sultana Sathi, A. Abdur Rahman, and M. A. Gafur, "Identification and in vitro antimicrobial activity of a compound isolated from a *Streptomyces* Species," *Pakistan J. Biol. Sci.*, vol. 4, no. 12, pp. 1523–1525, 2001.
- [37] P. D. A. James, C. Edwards, and M. Dawson, "The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *Streptomyces thermoviolaceus* grown in a chemostat," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 137, no. 7, pp. 1715–1720, Jul. 1991.
- [38] G. J. E. Baart and D. E. Martens, "Genome-Scale Metabolic Models: Reconstruction and Analysis," in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 799, 2012, pp. 107–126.
- [39] J. D. Orth, I. Thiele, and B. Ø. Palsson, "What is flux balance analysis?," *Nat. Biotechnol.*, vol. 28, no. 3, pp. 245–248, Mar. 2010.
- [40] "Simulating with FBA." [Online]. Available: <https://cobrapy.readthedocs.io/en/latest/simulating.html>.

- [41] I. Borodina, P. Krabben, and J. Nielsen, "Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism," *Cold Spring Harb. Lab. Press*, no. 5, pp. 820–829, 2005.
- [42] P.-J. D’Huys, I. Lule, D. Vercammen, J. Anné, J. F. Van Impe, and K. Bernaerts, "Genome-scale metabolic flux analysis of *Streptomyces lividans* growing on a complex medium," *J. Biotechnol.*, vol. 161, no. 1, pp. 1–13, Sep. 2012.
- [43] M. T. Alam *et al.*, "Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, p. 202, Mar. 2010.
- [44] M. E. Bushell *et al.*, "The use of genome scale metabolic flux variability analysis for process feed formulation based on an investigation of the effects of the *zwf* mutation on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1347–1353, Oct. 2006.
- [45] V. Razmilic, J. F. Castro, B. Andrews, and J. A. Asenjo, "Analysis of metabolic networks of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 by means of a genome scale model: Prediction of modifications that enhance the production of specialized metabolites," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, no. 7, pp. 1815–1828, Jul. 2018.
- [46] V. Razmilic, J. F. Castro, B. Andrews, and J. A. Asenjo, "Analysis of metabolic networks of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 by means of a genome scale model: Prediction of modifications that enhance the production of specialized metabolites," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 115, no. 7, pp. 1815–1828, Jul. 2018.
- [47] "high performance liquid chromatography - hplc." [Online]. Available: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>. [Accessed: 27-Aug-2018].
- [48] Linde, "High performance liquid chromatography (HPLC) | HiQ." [Online]. Available: [http://hiq.linde-gas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/high\\_performance\\_liquid\\_chromatography.html](http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html). [Accessed: 01-Apr-2019].
- [49] "Documentation for COBRAPy — cobra 0.13.3 documentation." [Online]. Available: <https://cobrapy.readthedocs.io/en/latest/index.html>. [Accessed: 18-Mar-2019].
- [50] V. Razmilic, J. F. Castro, B. A. Andrews, and J. A. Asenjo, "Supplementary material - Analysis of metabolic networks of *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 by means of a genome scale model: prediction of modifications that enhance the production of specialised metabolites."
- [51] D. Huang, S. Li, M. Xia, J. Wen, and X. Jia, "Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement," *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, no. 1, p. 52, May 2013.
- [52] Microbe Online, "Bacterial growth curve: phases and significance -." [Online]. Available: <https://microbeonline.com/typical-growth-curve-of-bacterial-population-in-enclosed-vessel-batch-culture/>. [Accessed: 01-Apr-2019].

- [53] E. M. T. El-Mansi and W. H. Holms, "Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Cultures," *Microbiology*, vol. 135, no. 11, pp. 2875–2883, Nov. 1989.
- [54] M. E. Peterson, R. M. Daniel, M. J. Danson, and R. Eisinger, "The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters.," *Biochem. J.*, vol. 402, no. 2, pp. 331–7, Mar. 2007.
- [55] D. J. Hei and D. S. Clark, "Estimation of melting curves from enzymatic activity-temperature profiles," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 42, no. 10, pp. 1245–1251, Nov. 1993.
- [56] "Temperature Effects (Introduction to Enzymes)." [Online]. Available: <http://www.worthington-biochem.com/intro/biochem/tempEffects.html>. [Accessed: 30-May-2019].
- [57] Royal Society of Chemistry, "Chemistry for Biologists: Enzymes." [Online]. Available: <https://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/enzymes.htm>. [Accessed: 30-May-2019].
- [58] J. D. Smilack, "Trimethoprim-Sulfamethoxazole," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 74, no. 7, pp. 730–734, Jul. 1999.
- [59] D. Tibavizco, J. Y. Rodríguez, E. Silva, S. I. Cuervo, and J. A. Cortés, "Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus*," *Biomédica*, vol. 27, no. 2, Instituto Nacional de Salud, pp. 294–307, 2007.
- [60] S. Howie and T. J. Grinter, "Intermedios para la producción de derivados de ácido carboxílico de estructura quinolona.," ES2223570T3, 01-Sep-2000.
- [61] M. E. Mulligan *et al.*, "Ciprofloxacin for eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization.," *Am. J. Med.*, vol. 82, no. 4A, pp. 215–9, Apr. 1987.
- [62] V. R. Arava and P. Umareddy, "Ciprofloxacin: A Two Step Process," *Der Pharma Chem.*, vol. 10, no. 3, 2018.
- [63] V. Scherrer-Pangka, "Preparation of ciprofloxacin," CA1326239C, 12-Jan-1988.
- [64] BD, "BD Bionutrients™ Technical Manual," vol. Third Edit, pp. 28–29.
- [65] E. Y. Bridson and A. Brecker, "Chapter III Design and Formulation of Microbial Culture Media," *Methods Microbiol.*, vol. 3, pp. 229–295, Jan. 1970.
- [66] "Yeast extract spread: nutritional value and analysis." [Online]. Available: [https://www.nutritionvalue.org/Yeast\\_extract\\_spread\\_nutritional\\_value.html](https://www.nutritionvalue.org/Yeast_extract_spread_nutritional_value.html). [Accessed: 18-Mar-2019].
- [67] A. Ulrich, P. Schumann, D. Naumann, U. Behrendt, and K. Suzuki, "Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after

mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov.," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 52, no. 5, pp. 1441–1454, Sep. 2002.

- [68] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual," *Cold Spring Harb. Lab. Press. New York*, 1989.
- [69] "D-Glucose | C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> - PubChem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5793>. [Accessed: 21-Mar-2019].
- [70] "Glycerol | C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>- PubChem," Mar-. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/753>. [Accessed: 21-Mar-2019].
- [71] "Amino acrylate | C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> - Pubchem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13323808#section=Top>.
- [72] "Chloroform | CHCl<sub>3</sub> - PubChem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chloroform#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification>. [Accessed: 23-Mar-2019].
- [73] "Cyclopropylamine | C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N - PubChem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclopropylamine#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification>. [Accessed: 23-Mar-2019].
- [74] "N,N-Dimethylformamide | HCON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> - PubChem." [Online]. Available: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n\\_n-dimethylformamide#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n_n-dimethylformamide#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification). [Accessed: 23-Mar-2019].
- [75] "Hydrochloric acid | HCl - PubChem." [Online]. Available: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydrochloric\\_acid#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hydrochloric_acid#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification). [Accessed: 23-Mar-2019].
- [76] "Potassium carbonate | K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - PubChem." [Online]. Available: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/potassium\\_carbonate#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/potassium_carbonate#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification). [Accessed: 23-Mar-2019].
- [77] "Toluene | C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> - PubChem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/toluene#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification>. [Accessed: 23-Mar-2019].
- [78] "Triethylaluminum | C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>Al - PubChem." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/triethylaluminum#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification>. [Accessed: 23-Mar-2019].
- [79] "2,4,5-Trifluorobenzoyl chloride | C<sub>7</sub>H<sub>2</sub>ClF<sub>3</sub>O - PubChem." [Online]. Available: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_4\\_5-Trifluorobenzoyl\\_chloride](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4_5-Trifluorobenzoyl_chloride). [Accessed: 23-Mar-2019].
- [80] "Piperazine | C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub> - PubChem." [Online]. Available:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/piperazine#datasheet=LCSS&section=GHS-Classification>. [Accessed: 23-Mar-2019].

- [81] "KEGG PATHWAY: Carbon metabolism - Streptomyces leeuwenhoekii." [Online]. Available: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=sle&mapno=01200&mapscale=&show\\_description=hide&show\\_module\\_list=](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=01200&mapscale=&show_description=hide&show_module_list=). [Accessed: 03-Jun-2019].
- [82] "KEGG PATHWAY: Methane metabolism - Streptomyces leeuwenhoekii." [Online]. Available: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=sle&mapno=00680&mapscale=&show\\_description=hide](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=00680&mapscale=&show_description=hide). [Accessed: 03-Jun-2019].
- [83] "KEGG PATHWAY: Glyoxylate and dicarboxylate metabolism - Streptomyces leeuwenhoekii." [Online]. Available: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=sle&mapno=00630&mapscale=&show\\_description=hide](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=00630&mapscale=&show_description=hide). [Accessed: 03-Jun-2019].
- [84] "KEGG PATHWAY: Pyruvate metabolism - Streptomyces leeuwenhoekii." [Online]. Available: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=sle&mapno=00620&mapscale=&show\\_description=hide](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=00620&mapscale=&show_description=hide). [Accessed: 03-Jun-2019].
- [85] "KEGG PATHWAY: Taurine and hypotaurine metabolism - Streptomyces leeuwenhoekii." [Online]. Available: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=sle&mapno=00430&mapscale=&show\\_description=hide](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=00430&mapscale=&show_description=hide). [Accessed: 03-Jun-2019].
- [86] "KEGG PATHWAY: Glycolysis / Gluconeogenesis - Streptomyces leeuwenhoekii." [Online]. Available: [https://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_pathway?org\\_name=sle&mapno=00010&mapscale=&show\\_description=hide](https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=sle&mapno=00010&mapscale=&show_description=hide). [Accessed: 03-Jun-2019].
- [87] "Flux Variability analysis (FVA) — The COBRA Toolbox." [Online]. Available: <https://opencobra.github.io/cobratoolbox/latest/tutorials/tutorialFVA.html>. [Accessed: 18-Mar-2019].



## 6. Anexos

### 1. Ejemplos de cálculo

#### 1.1. Tratamiento de datos

##### 1.1.1. De composiciones a uptakes

Los datos para la composición de los ingredientes complejos<sup>8</sup> del medio mISP2 se encuentran en forma de [g/L] pero los modelos de escala genómica no están contruidos para recibir este tipo de datos, por lo que se debe traducir a la cantidad del nutriente que absorbe la biomasa por hora, es decir,  $\left[\frac{mmol}{gDW \cdot hr}\right]$ . A continuación, se muestran ejemplos de cálculo que ilustran dicha traducción, junto con los supuestos empleados en ella.

Se divide la concentración del compuesto en cuestión por su peso molecular para obtener los mol/L correspondientes, y luego se multiplica por 1000 para obtener mmol/l.

$$\text{Concentración} \left[\frac{g}{l}\right] \cdot \frac{1}{PM \left[\frac{g}{mol}\right]} \cdot \left[\frac{10^3 mmol}{mol}\right] \quad (2)$$

Luego, se divide por la densidad celular para obtener los mmol/gDW-1

$$\left[\frac{mmol}{l}\right] \cdot \frac{1}{d_{cel} \left[\frac{gDW}{l}\right]} = \frac{mmol}{gDW^{-1}} \quad (3)$$

Y finalmente, se divide por el tiempo de cultivo.

$$\frac{mmol}{gDW^{-1}} \cdot \frac{1}{tc [hr]} = uptake \left[\frac{mmol}{gDW \cdot hr}\right] \quad (4)$$

Los cálculos anteriores pueden resumirse en la siguiente expresión:

$$uptake \left[\frac{mmol}{gDW \cdot hr}\right] = \text{Concentración} \left[\frac{g}{l}\right] \cdot \frac{1}{PM \left[\frac{g}{mol}\right]} \cdot \left[\frac{10^3 mmol}{mol}\right] \cdot \frac{1}{d_{cel} \left[\frac{gDW}{l}\right] \cdot tc [hr]} \quad (5)$$

Para realizar los cálculos se utilizó el peso molecular ( $PM$ ) de cada componente, la densidad celular ( $d_{cel}$ ) de un cultivo de *Streptomyces coelicolor* a los 3 días (se utilizó este dato a modo de “densidad celular promedio”, es el dato más cercano

---

<sup>8</sup> Ingredientes complejos: Corresponden a ingredientes que están compuestos por partes identificables más pequeñas.

encontrado. Si bien el medio de cultivo no es el mismo, como se trata de un microorganismo de la misma familia se considera un supuesto válido [51]), y el tiempo de cultivo ( $t_c$ ) utilizado en los experimentos de este proyecto.

## 1.2. Contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de metabolitos.

Los cálculos mostrados a continuación solo tienen sentido para la alimentación u10i5, ya que posee más de un componente. Los datos necesarios para realizar estos cálculos pueden ser encontrados en las tablas del anexo 4.

### 1.2.1. Cálculo de los gramos de carbono [g C] de cada nutriente por cultivo.

Teniendo en cuenta que la alimentación u10i5 posee 10 [g] de glucosa y 5 [g] de glicerol, se realiza solamente el cálculo para glucosa debido a que el caso con glicerol es análogo. Se comienza con los gramos del nutriente [g N] presentes en el cultivo alimentado con la alimentación u10i5:

$$10[g N/L] \cdot 0,05[L] = 0,5 [g N] \quad (6)$$

Luego, se multiplica por el % peso/peso de carbono respecto al peso total de la molécula para obtener los gramos de carbono [g C].

$$0,5 [g N] \cdot 40 \% \left[ g \frac{C}{g N} \right] = 0,2 [g C] \quad (7)$$

Finalmente, para obtener los gramos de carbono totales en cada cultivo alimentado con u10i5, se suman los provenientes de ambas fuentes de carbono.

### 1.2.1. Cálculo de la contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de biomasa y de metabolitos especializados.

Teniendo en cuenta el valor de la razón entre el halo de inhibición de crecimiento y la biomasa por litro de cultivo,  $p_u$  [cm g DW-1 L-1], se calcula la razón entre dicho valor y los gramos de carbono totales de la alimentación,  $p_u/\text{Carbono total}$  [cm g DW-1 L-1 g C-1]:

$$0,66 \frac{[cm]}{[g DW L]} \cdot \frac{1}{0,3 [g C]} = 2,23 \frac{[cm]}{[g DW L g C]} \quad (8)$$

Luego, se debe multiplicar el resultado por el porcentaje de carbonos proveniente de la glucosa con respecto a los gramos de carbono totales, % pCGluc/pCTot:

$$2,23 \frac{[cm]}{[g DW L g C]} \cdot 67\% \frac{p C Gluc}{p C Tot} = 1,49 \frac{[cm]}{[g DW L g C Gluc]} \quad (9)$$

Se puede realizar el cálculo análogo para el glicerol, o simplemente restar el total con el proveniente de la glucosa para obtener el correspondiente al glicerol.

Para el caso de la contribución relativa de cada fuente de carbono a la producción de biomasa el cálculo es análogo, pero en vez de utilizar pu se debe utilizar la biomasa obtenida por litro de cultivo.

## 2. Composición detallada del medio de cultivo

A continuación, se muestra el detalle de los componentes del extracto de malta y extracto de levadura. La información fue obtenida de los proveedores de los ingredientes utilizados en el laboratorio, y complementada con fuentes externas en los casos necesarios.

Tabla 5: Composición del extracto de levadura utilizada para las simulaciones [64], [65], [66].

Composición total extracto de levadura (YE)			
Componente	Concentración [g/L]	Componente	Concentración [g/L]
Riboflavin	0,000336	Asparagine	0,04
Nicotinic acid	0,0031	Glutamine	0,008
Pantothenic acid	0,00024	NaCl	0,0274
Folic acid	0,00003	Phosphates	
Inositol	0,0054	Pz05	0,152
Biotin	0,000003	Carbohydrates	0,328
Aminobenzoic acid	0,000024	Na	0,224
Alanine	0,136	K	0,12
Arginine	0,08	Ca	0,0004
Aspartic acid	0,18	Fe	0,0002
Cystine	0,018	Mg	0,008
Glutamic acid	0,268	Cu	0,0002
Glycine	0,092	Zn	0,0002
Histidine	0,048	Mg	0,00002
Isoleucine	0,092	Co	0,00002
Leucine	0,12	Proline	0,068
Lysine	0,14	Serine	0,092
Methionine	0,028	Threonine	0,092
Phenylalanine	0,068	Tryptophan	0,02
Valine	0,1	Tyrosine	0,064
		Maltose	0,064

Tabla 6: Composición del extracto de malta utilizada para las simulaciones [64], [65] y [66].

Composición total extracto de malta (ME)			
Componente	Concentración [g/L]	Componente2	Concentración [g/L]
Maltose	5,22	Phenylalanine	0,01
Fructose	0,955	Proline	0,01
Glucose	0,955	Serine	0,01
Sucrose	0,18	Valine	0,01
Dextrin	1,5	Isoleucine	0,01
Sulfate SO4	0,007	Lysine	0,01
Phosphate PO4	0,008	Ca	0,00111
Alanine	0,01	Fe	0,000058
Arginine	0,01	Mg	0,0013
Aspartic acid	0,01	K	0,00603
Glutamic acid	0,02	Na	0,00713
Glycine	0,01	Cl	0,007
Leucine	0,01	NaCl	0,02

### 3. Medios

A continuación, se muestran las composiciones de los medios utilizados en los distintos experimentos:

#### 3.1. Medios líquidos

##### 3.1.1. mISP2

Este medio es una versión modificada del medio ISP2. Se deben disolver los ingredientes en agua destilada en las concentraciones indicadas a continuación:

Tabla 7: Concentraciones de reactivos para el medio mISP2 en agua destilada[67]

Extracto levadura	de	4 [g/L]
Extracto de malta		10 [g/L]
Glicerol		10 [g/L]

##### 3.1.2. LB

Tabla 8: Concentración de los componentes del medio líquido LB en agua destilada [68].

Extracto levadura	de	5 [g/L]
NaCl		10 [g/L]

Tryptona	10 [g/L]
----------	-------------

### 3.2. Medios sólidos

#### 3.2.1. LB agar

Tabla 9: Concentraciones de los componentes del medio LB agar con agua destilada como base[68].

Extracto levadura	de	5 [g/L]
NaCl		10 [g/L]
Tryptona		10 [g/L]
Agar		15 [g/L]

### 4. Análisis de contribución relativa de glucosa y glicerol

Para confeccionar los gráficos de contribución relativa, se normalizó la “producción unitaria” (o la biomasa [gDW/L]) por los gramos de carbono [g C] incorporados a cada alimentación. Luego, se multiplicó por el porcentaje del carbono que provino de cada fuente (glicerol o glucosa) con respecto al total. Esto permite tener una medida de que proporción de la producción de metabolitos proviene de cada fuente de carbono en cada alimentación. Se puede encontrar un ejemplo de cálculo en el anexo 1.2.

A continuación, se muestra la información relevante [69], [70] para la construcción de la Figura 19 y la Figura 22l .

Tabla 10: Características de la glucosa y del glicerol.

Parámetro	Glucosa	Glicerol
Formula	$C_6H_{12}O_6$	$C_3H_8O_3$
Carbonos por molécula	6	3
PM [g/mol]	180	92
PM carbonos [g/mol]	72	36
% p/p carbonos	40%	39%

En la Tabla 10, se explicitan para cada compuesto su fórmula química, el número de carbonos por molécula, el peso molecular del compuesto, el peso molecular debido a los carbonos, y el % peso/peso de carbonos sobre el total de la molécula.

Tabla 11: Características de las alimentaciones u10i5 e i10.

Alimentación	u10i5	i10
[g] de Glucosa en cultivo	0,5	0
[g] de Glicerol en cultivo	0,25	0,5
[g C] de Glucosa en cultivo	0,20	0
[g C] de Glicerol en cultivo	0,10	0,13
[g C] totales en cultivo	0,30	0,20
%p CGluc/pCTot	67%	0%
%p CGlic/pCTot	33%	100%

En la Tabla 11 se detalla la composición de cada alimentación en gramos de carbono provenientes de cada nutriente y el porcentaje peso/peso para los [g C] de cada fuente respecto a los [g C] totales por cada alimentación.

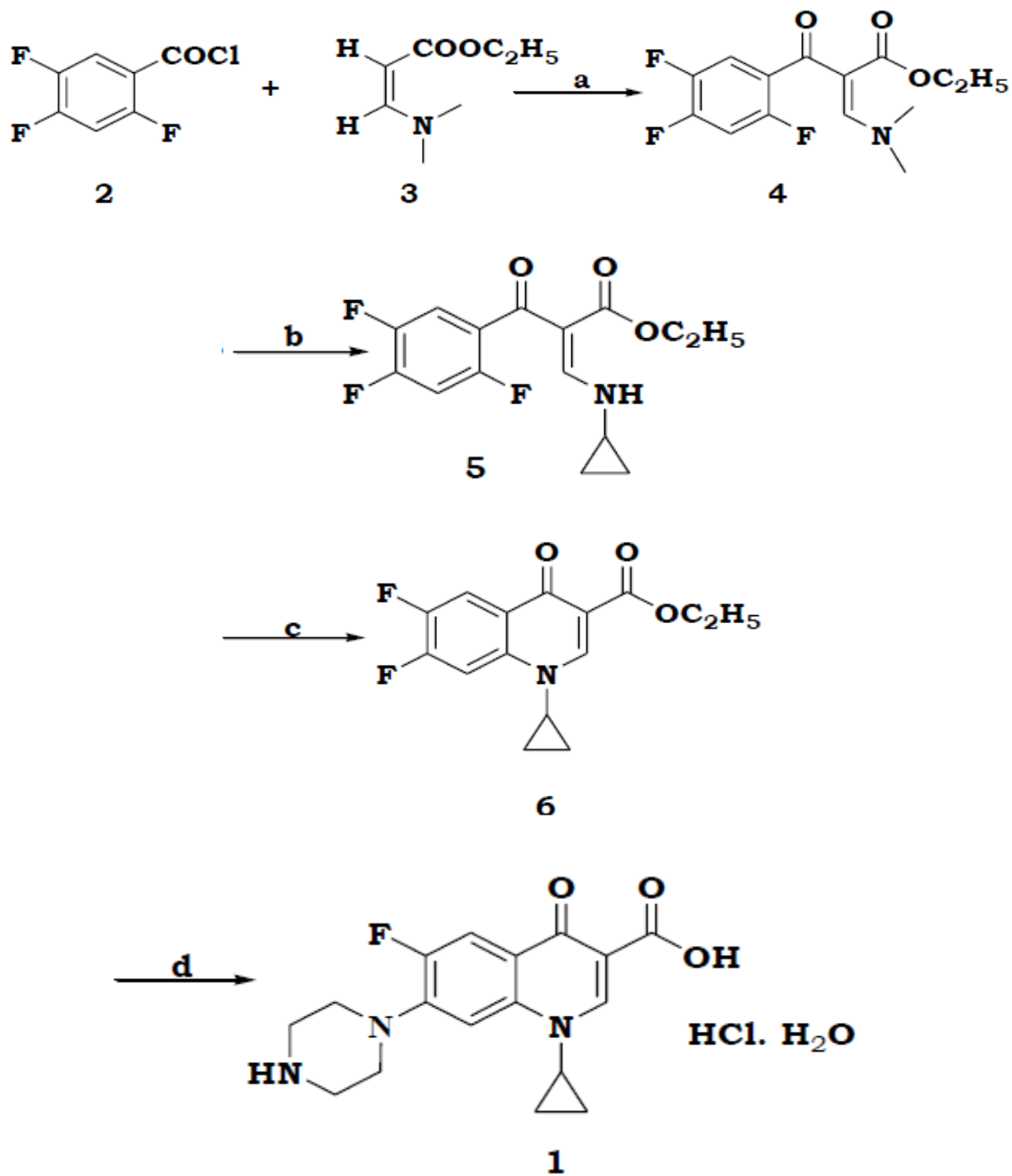
Tabla 12: Contribución de cada fuente de carbono a la "producción unitaria" de metabolitos especializados para cada alimentación.

Alimentación	u10i5	i10
pu [cm g DW -1 L-1]	0,66	0,50
pu/[g C] totales	2,23	2,55
pu/[g C] debido a Glucosa	1,49	0,00
pu/[g C] debido a Glicerol	0,73	2,55

En la Tabla 12 se detalla la contribución de cada fuente de carbono a la producción unitaria (pu) de metabolitos especializados para cada alimentación [cm g DW -1 L-1 g C -1].

## 5. Producción de ciprofloxacina

A continuación, se muestran las reacciones de formación para la ciprofloxacina:



### Scheme 1: Bayer's (Innovator's) process of ciprofloxacin

(a)  $\text{CHCl}_3$ , TEA; (b) Cyclopropylamine; (c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF; (d) Piperazine, HCl

Figura 37: Reacciones de formación de ciprofloxacina [62].

En la Figura 37, se aprecia la cadena de reacciones necesarias para formar ciprofloxacina a partir de 2,4,5-trifluorobenzoyl cloruro y amino acrilato.

Se incluye la siguiente tabla con las consideraciones de seguridad de los reactivos utilizados en las reacciones de síntesis de ciprofloxacina.

*Tabla 13: Toxicidad de los reactivos utilizados en la producción de ciprofloxacina.*

<b>Compuesto</b>	<b>Seguridad</b>
<b>Amino acrilato</b>	-[71]
<b>Cloroformo</b>	Toxicidad aguda, irritante para la piel, carcinogénico, daño ocular severo [72].
<b>Ciclopropilamina</b>	Altamente inflamable, tóxico al ingerir o inhalar, causa quemaduras graves en la piel y daño ocular severo, dañino con efectos a largo plazo para la fauna marina [73].
<b>DMF</b>	Causa irritación a la piel y daño ocular severo. Puede dañar a nonatos durante embarazo [74].
<b>HCl</b>	Tóxico al inhalar. Causa quemaduras graves a la piel y daño ocular severo [75].
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Causa irritación de piel, ojos y vías respiratorias. Daño a órganos [76].
<b>Tolueno</b>	Altamente inflamable, irritación de piel y mareos, puede ocasionar la muerte al ingerir o inhalar en altas cantidades. La exposición repetida puede provocar daño a órganos [77].
<b>Trietilalumina</b>	Altamente inflamable, causa quemaduras graves en la piel y daño ocular severo [78].
<b>2,4,5-Trifluorobenzoyl chloride</b>	Causa quemaduras graves a la piel y daño ocular severo. Puede causar reacción alérgica [79].
<b>Piperacina</b>	Causa quemaduras graves a la piel y daño ocular severo, puede causar infertilidad, reacciones alérgicas y asma [80].



## 6. Rutas metabólicas relacionadas con el acetato

En este anexo se puede encontrar la siguiente tabla, que contiene información sobre los genes asociados a la producción y consumo de acetato en *S. leeuwenhoekii* C34.

Tabla 14: Rutas metabólicas, genes asociados a la producción y consumo de acetato, y la relación que tienen con glucosa o glicerol dentro de *S. leeuwenhoekii* C34.

Ruta metabólica	Genes y Función			Asociación directa
	Producción	Consumo	Producción y consumo	
Metabolismo del carbono [81]		sle14820 sle32800 sle45910	sle22340	Glucosa
Metabolismo del metano [82]			sle22340 sle14820 sle32800 sle45910	N/A
Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato [83]		sle14820 sle32800 sle45910		N/A
Metabolismo del piruvato [84]	sle20710	sle22340 sle12610 sle15200 sle05290	sle14820 sle32800 sle45910 sle27650 sle32380 sle54100 sle64720	N/A
Metabolismo de la taurina e hipotaurina [85]			sle22340	N/A
Glicolisis y glucogénesis [86]		sle14820 sle32800 sle45910	sle27650 sle32380 sle54100 sle64720	Glucosa