Universidad Veracruzana

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

Producción de espinosinas en sistemas lote, lote alimentado y continuo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa*

Que para obtener el título de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

I.I.A. Juana Casados Molar

Director:

Dr. Leandro Chaires Martínez

Codirector

Dr. Rodrigo Cuervo González

Tuxpan, Ver. 2021

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz, a Enero de 2021.

El presente Trabajo de Intervención titulado: "**Producción de espinosinas en sistemas lote, lote alimentado y continuo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa***", realizado por la C. **Juana Casados Molar**, bajo la dirección del Dr. Leandro Chaires Martínez y codirección del Dr. Rodrigo Cuervo González, ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

DR. LEANDRO CHAIRES MARTÍNEZ
DIRECTOR

DR. RODRIGO CUERVO GONZÁLEZ
CODIRECTOR

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención de la alumna: **Juana Casados Molar**

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Raúl Allende Molar	16/12/2020	Aprobado	
Dra. Nadia Angélica Cruz Vázquez	16/12/2020	Aprobado	
Dra. Norma García Navarro	17/12/2020	Aprobado	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención denominado "**Producción de espinosinas en sistemas lote, lote alimentado y continuo de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa***" que presenta la sustentante para obtener el Grado de Maestra, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

Agradecimientos

A **Dios** por su gran amor, por darme la fuerza que necesite para culminar este logro.

Al **Dr**. **Leandro Chaires Martínez**, Director de tesis, por su apoyo incondicional, por la confianza que brindo en mí, y por ser parte importante en este proyecto.

Al **Dr**. **Rodrigo Cuervo González**, Co-director de tesis, por su tiempo para la realización de la tesis.

A **mi comisión lectora**, integrada por la Dra. Nadia Angélica Cruz Vázquez, Dra. Norma García Navarro y el Dr. Raúl Allende Molar, que con ayuda de sus observaciones y comentarios se enriqueció el proyecto.

A la **Universidad Veracruzana** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al **Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache** por otorgarme todas las herramientas que necesite durante el posgrado y por seguir siendo parte de mi formación académica.

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No 933559 para la realización de mis estudios de posgrado que concluye con esta tesis, como resultado de la Maestría en Ciencias del Ambiente.

Dedicatoria:

A mi hermosa familia.

Chelín, mi amado esposo, tu amor, confianza, compresión y apoyo fueron mi fuerza para seguir adelante.

Chavita, llegaste en el momento indicado, eres mi razón de ser y mi motor de cada día.

Padres, su amor y apoyo incondicional me mantuvieron en el camino correcto.

Hermanos, sus consejos han dado frutos, gracias por la confianza.

Sobrinos, los amo, gracias por cuidar a mi bebe cuando me ausentaba para poder trabajar con la tesis.

Tita, Maury, ustedes son mis hermanas de corazón, sus palabas de ánimo me han fortalecido.

Gracias por su amor y su confianza que me brindaron, ustedes son parte importante de esta meta de mi vida profesional.

ÍNDICE

Agradecimientos i
Dedicatoria..... iii
ÍNDICE DE FIGURAS v
ÍNDICE DE TABLAS..... vi
RESUMEN vii
1. ANTECEDENTES 3
2.1 *Anastrepha ludens*..... 3
2.2.1 Espinosinas 4
2.3. Producción de espinosinas por *S. spinosa*..... 5
2.4 Características y aplicación en los sistemas de cultivo en lote, lote alimentado y continuo 6
2.4.1. Sistema de cultivo en lote 6
2.4.2. Sistema de cultivo en lote alimentado 7
2.4.3 Sistema de cultivo continuo 8
2. OBJETIVOS 10
3.1 General..... 10
3.1.1 Específicos 10
4. MATERIAL Y MÉTODOS 11
4.1 Material Biológico 11
4.2 Activación de la cepa..... 11
4.3 Diseño experimental 11
4.4 Fermentación en lote 12
4.5 Fermentación en lote alimentado..... 13
4.6 Fermentación en sistema continuo..... 13
4.7 Métodos analíticos 14

4.7.1 Determinación de Biomasa 14
4.7.3 Determinación de espinosinas 15
4.8 Análisis estadísticos 15
5. RESULTADOS 16
5.2 Producción de biomasa en sistema de lote alimentado 18
5.3 Producción de biomasa en sistema continuo 19
5.4 Cuantificación de espinosinas mediante HPLC 20
6. DISCUSIÓN 23
7. CONCLUSIONES 26
8. APLICACIÓN PRÁCTICA 27
9. BIBLIOGRAFíA 28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental 12

Figura 2 Sistemas de cultivo de fermentación para la producción de espinosinas de la bacteria de *S. spinosa.* a) sistema de cultivo en lote, b) sistema en lote alimentado y c) sistema de cultivo continuo. 16

Figura 3 Variación del consumo de sustrato (azucares) y crecimiento de biomasa de la bacteria de *S. spinosa* para el sistema de cultivo en lote 17

Figura 4 Variación del consumo de sustrato (azucares) y crecimiento de biomasa de la bacteria de *S. spinosa* para el sistema de cultivo en lote alimentado 18

Figura 5 Comportamiento del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato (azucares) de la bacteria de *S. spinosa,* contenida en el fermentador de tanque agitado. 19

Figura 6 Crecimiento de biomasa y consumo de sustrato (azucares) de la bacteria de *S. spinosa* en la salida del fermentador. 20

Figura 7 Monitoreo de producción de espinosinas por *S.spinosa* en la salida del fermentador..... 22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2 Cuantificación de espinosinas producidas por *S. spinosa* en distintos sistemas de biorreactores. 21

RESUMEN

Las espinosinas son lactonas macrocíclicas sintetizadas por la fermentación de la bacteria *S. spinosa*, y se han encontrado reportes del uso de estas espinosinas para atacar las plagas de algunos cultivos de interés comercial, como cítricos. Sin embargo, la producción de este metabolito de interés agroindustrial es limitada, por lo que los productos comerciales son elevados en costo. Es por ello que en esta investigación se evaluó la producción de biomasa y espinosinas por medio de la fermentación de la bacteria *S. spinosa* en sistemas de cultivo por lote, lote alimentado, y continuo. Para ello; se realizaron corridas experimentales donde el mayor rendimiento de biomasa y espinosinas ocurrió en el sistema continuo, obteniendo 1.9 g/L y 723.32 mg/L a las 36 h, debido a que el sistema tiene una entrada de suministro de nutrientes y salida de biomasa, se trabajó a una tasa de dilución de 0.078 h^{-1}. Mientras que en el sistema en lote alimentado a las 30 h sintetizó 492.738 mg/L de espinosinas, y en el sistema en lote a las 36 h produjo 289.297 mg/L de espinosinas.

Palabras clave: sistemas de cultivo, biomasa, sustrato, lactonas macrocíclicas, bioprocesos, bioinsecticida.

INTRODUCCIÓN

México está posicionado en el cuarto lugar en producción de cítricos en el mundo y en el caso de la naranja (*Citrus sinensis)* se encuentra en el quinto lugar (SIAP, 2018). Así mismo, el estado de Veracruz se sitúa en el primer lugar en producción de naranja con un 50%. El municipio de Álamo Temapache es el principal productor de naranja con 2.3 millones de toneladas producidas en una superficie de 165 mil hectáreas (SIAP, 2018). La naranja se cultiva para uso comercial en varias regiones del país, tanto para obtención del jugo como para el consumo de fruta fresca. Desafortunadamente, los cultivos de naranja experimentan ataques por una serie de plagas de insectos y ácaros (Moore y Duncan, 2017). Principalmente, las moscas de la fruta son responsables de las restricciones de cuarentena que limitan el acceso de la producción a mercados internacionales (Aluja y Mangan, 2008). Ante la situación planteada, el control químico para combatir la mosca de la fruta se ha visto afectada por las limitaciones que existe con los plaguicidas organofosforados, con base a esto se han buscado alternativas que sean eficientes y que represente un menor impacto al ambiente.

En algunas regiones del país se está promoviendo el uso de un producto importado para atacar la problemática de las moscas de la fruta, el Spinosad GF-120 (Dow Agrociencies), un bioplaguicida cuya formulación es a base de las espinosinas obtenidas de la bacteria *Saccharopolyspora spinosa.* El Spinosad® mata insectos mediante el ataque al sistema nervioso, probablemente a través de la interacción y

unión a los receptores de nicotinacetilcolina y ácido amino butírico (Millar y Denholm, 2007). Su acción sobre insectos plaga se ha demostrado y poco o ningún efecto sobre insectos benéficos y mamíferos (Kirst, *et al*., 1992).El producto tiene un costo en el mercado de 700 pesos por galón y puede ser aplicada a una hectárea de cultivo de cítricos. Los citricultores de la región de Álamo Temapache han llevado a cabo pruebas en campos experimentales utilizando este producto y los resultados han sido positivos. Sin embargo, en la región se cuentan con alrededor de 165,000 ha, lo que llevaría a que se aplicarán 165,000 galones del Spinosad® con un gasto aproximado de 115 millones de pesos por aplicación.

En cuanto a los reportes de procesos para producir espinosinas a partir de la fermentación en medio líquido de *S. spinosa*, básicamente existe publicaciones sobre la optimización del medio como paso inicial en el mejoramiento de los rendimientos de producto (Strobel y Nakatsukasa, 1993). Sin embargo, no se tienen reportes en literatura sobre la producción de la bacteria en diferentes sistemas de cultivo, como el lote alimentado y el sistema continuo, que conlleven a generar procesos con rendimientos de producción más altos y por ende los costos de venta sean más accesibles al citricultor.

1. ANTECEDENTES

En la región norte del estado de Veracruz, existen dos plagas que se han distribuido alarmantemente y están afectando considerablemente los cultivos de los frutos. Una de ellas es la presencia de la mosca de la fruta (*A. ludens*) y la otra es infecciones por la bacteria *Candidatus liberibacter* la cual se disemina a través del vector *Diaphorina citri* y ocasiona la enfermedad llamada *Huanglongbing*, en la actualidad para controlar la enfermedad y al psílido, se destaca la eliminación de plantas con síntomas de HLB, en huertos comerciales, viveros y traspatio, así también, la aspersión de insecticidas para controlar el vector en focos de infección.

2.1 *Anastrepha ludens*

En México, *A. ludens* es una plaga cuarentenaria importante en plantas frutales, especialmente en cítricos y mangos. Por lo tanto, y de acuerdo a lo anterior, los brotes de la mosca de la fruta ocurren frecuentemente en áreas de cítricos como la naranja valencia, *Citrus sinensis (L) Osbeck* (Vanoye-Eligio *et al.,*2019).

El daño que causa la mosca mexicana de la fruta en cítricos es la caída de la fruta a consecuencia del crecimiento interno de las larvas (Buentello-Wong *et al.,* 2016). Esta plaga tiene un mayor impacto en la economía de México, por lo cual el gobierno Federal ha implementado programas para controlar a *A. ludens* por medio de SAGARPA-SENASICA (Zepeda-Cisneros *et al.,* 2014).

2.2 *Saccharopolyspora spinosa*

Este microorganismo fue identificado como una nueva especie de actinomiceto, llamado *S. spinosa* (Mertz y Yao, 1990). Además, es un organismo aeróbico, Gram-

positivo y compuesto por hifas que contiene cadenas largas de esporas amarillentas y en forma de espinas. La palabra “Saccharopolyspora” en latín significa “azúcar con muchas esporas, y la palabra “spinosa” se refiere a la apariencia espinosa de las esporas (Thompson *et al.*, 2000). *S. spinosa* es capaz de producir mediante fermentación natural, más de 20 espinosinas con propiedades insecticidas, pero las más abundantes son la A y la D (Thompson *et al.*, 2000).

2.2.1 Espinosinas

Las espinosinas son productos de fermentación, están constituidas por una estructura de base tetracíclica poliencadenada (aglicón) con un anillo macrólido de 12 miembros y un triciclo 5,6,5-cis-anti-trans, así como por una parte sacárica D-forosamina y por una parte sacárica 2,3,4-tri-O-metil-L-ramnosa (Kirst *et al.,*1992). Las espinosinas son adecuadas para la lucha contra arácnidos, nematodos e insectos, especialmente contra lepidópteros y contra dípteros. Puede esperarse que las pestes de las plantas, que son combatidas actualmente con espinosinas, puedan generar una resistencia contra estos productos activos que se encuentran en el mercado. Por lo tanto, es importante preparar nuevos derivados de las espinosinas, biológicamente activos, que puedan reemplazar a las espinosinas actualmente utilizadas para la lucha contra las pestes.

El Spinosad®, es una mezcla de las espinosinas A y D, las cuales se usan como pesticidas únicos con una alta actividad selectiva contra plagas dirigidas y baja toxicidad en organismos no objetivo (incluidos muchos artrópodos benéficos). Estas características hacen del Spinosad® una excelente herramienta para el manejo integrado de plagas. A pesar de los grandes resultados que se han obtenido en el

combate de plagas, inclusive en pruebas aplicadas a cítricos, el Spinosad® resulta un producto costoso y de ahí que es necesario llevar a cabo proyectos de investigación con la finalidad de proveer de este producto de manera más accesible a los citricultores de México.

2.3. Producción de espinosinas por *S. spinosa*

En los últimos años se han buscado mejoras en la producción de espinosinas a partir de la fermentación líquida de *S. spinosa* mediante métodos moleculares y de ingeniería metabólica (Liang *et al.,* 2009; Jha *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2015; Galm y Sparks, 2015). Aún los métodos de mutagénesis dirigida no han logrado que se obtengan cepas con una producción de espinosinas superior a 500 µg/mL, por lo que también las investigaciones se han centrado en el estudio de la composición del medio de producción (Zhihua *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2009; Li *et al.,* 2010), teniendo en común el uso de glucosa como principal fuente de carbono.

Mertz y Yao (1990) publicaron el aislamiento de *S. spinosa* de una industria cañera y utilizaron como componentes del medio de cultivo 30 g de caldo de soya trípticaseina, 3 g de extracto de levadura, 2 g de $MgSO_4$, 5 g de glucosa y 4 g de maltosa por litro de medio de cultivo. La cepa se cultivó por 72 h a 30 ºC. Strobel y Nakatsukasa (1993) utilizaron glucosa 40 g, harina de semilla de algodón 40 g, nutriente a base de leche peptonizada 15 g, licor de maíz 5 g, oleato de metilo 40 g y $CaCO_3$ 5 g, pH 7 en un litro de agua por 7 a 30 días a 250 rpm en incubadora orbital.

Zhihua *et al.* (2006), estudiaron los efectos de la glucosa y el fosfato inorgánico sobre el crecimiento del micelio y la producción de espinosinas con *S. spinosa*. Los

resultados mostraron que el aumento de la concentración de glucosa de 18.6 g/L a A< 58.8 g/L, podría promover el crecimiento del micelio y la producción del espinosinas. Y cuando la concentración de glucosa aumentó de 58.8 g/L a 79.6 g/L, la producción de espinosinas decayó y cuando la concentración de la glucosa aumentó de 79.6 g/L a 115.3 g/L, se produjo una disminución sustancial en el crecimiento del micelio y en la producción de espinosinas. Por otro lado, el incremento en la concentración de fosfato de 3.68 a 29.41 mm incrementa micelio y espinosinas. Guojun *et al.* (2016) utilizaron métodos de modelación regresiva para investigar el efecto de la fuente de carbono y optimizar el medio de producción. Lograron aumentar la producción de espinosinas en un 77%, de 310 a 549 µg/mL en un medio con 98 g de manitol, 43 g de harina de semilla de algodón, 12.9 g de licor de maíz, 0.5 g KH_2PO_4 y 3 g de $CaCO_3$ en cada litro de agua a pH 7.

2.4 Características y aplicación en los sistemas de cultivo en lote, lote alimentado y continuo

Dentro del área de bioprocesos se ha trabajado con sistemas de cultivo celular, donde se han utilizado diferentes microorganismos de interés. A continuación, se muestran las características y aplicaciones de los sistemas de cultivo que se utilizaron en este trabajo para la fermentación de la bacteria de *S. spinosa.*

2.4.1. Sistema de cultivo en lote

El sistema de cultivo en lote es predominantemente utilizado, a pesar de que requiere largos periodos de tiempo para iniciar cada operación y es ineficiente cuando se cambian las concentraciones de sustrato y no permite el control de la

tasa de crecimiento o de la tasa de formación de producto (Montalvo *et al.,* 2010; Mears *et al.,* 2017).

Los factores como el alto costo de mantenimiento del cultivo debido a la baja concentración celular, bajas productividades y una calidad variable de los productos hacen que el sistema en lote no sea viable (Ganuza e Izquierdo, 2007; Fernandes *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayor parte de fermentación industrial, se lleva a cabo por un proceso en lotes. De acuerdo a las investigaciones realizadas en los últimos años, los perfiles de fermentación por lotes y la interacción entre la formación de productos, así también como el consumo de sustrato y la tasa de crecimiento de la biomasa, se han estudiado ampliamente mediante la construcción de modelos cinéticos (Sainz *et al., 2003)*.

2.4.2. Sistema de cultivo en lote alimentado

En el área de las fermentaciones y de bioprocesos, la utilización de las operaciones de lote alimentado son consideradas comunes y han ganado atención en los últimos años debido a su gran impacto beneficioso en la economía y productividad de los bioprocesos; se emplea como una alternativa para evitar altas concentraciones de sustrato al inicio de la fermentación y los problemas inhibitorios o de producción que estos acarrean, además uno de sus objetivos es extender la fase de crecimiento del microorganismo, utilizando diferentes perfiles de adición y concentraciones de sustrato en la alimentación (Mohd Zain *et al.*, 2018) Los perfiles de alimentación pueden ser retroalimentados, relacionando el flujo de alimentación con variables que pueden ser monitoreadas durante el proceso, como el pH (Suzuki *et al.,* 1990),

el oxígeno disuelto (Akesson *et al.*, 1999), el coeficiente de respiración del microorganismo, o la concentración de glucosa en el medio.

Con referencia a lo anterior se han realizado trabajos utilizando esta técnica de sistema de cultivo en lote alimentado como por ejemplo para la producción de pediocina en suero de leche (Guerra *et al.*, 2007), en donde la concentración máxima de pediocina fue de 1.2 veces mayor que en la fermentación en lote.

2.4.3 Sistema de cultivo continuo

En comparación con los procesos de fermentación por lote y lote alimentado, los procesos de fermentación continua pueden ser más difíciles de llevar a cabo por sus largos periodos de tiempo durante el proceso (Li *et al.,* 2014). Cabe agregar que el proceso continuo prolonga la fase de crecimiento exponencial microbiano durante el cultivo en comparación con el sistema en lotes y, por lo tanto, reduce el tiempo de procesamiento, garantizando altos niveles de producción final y, además, de que los procesos continuos eliminan la inhibición de sustratos y/o subproductos, ya que la producción final se va recolectando continuamente. Se ha reportado y descrito previamente que el sistema en lote continuo la productividad es 2.3 a 5 veces más alta que el sistema en lotes, además de que esta operación permite el logro de altas densidades celulares y obtiene mayores productividades (Fernandes *et al.,* 2015). Otra de las características importantes de los procesos de fermentación continua es que reducen el costo de los sustratos, ya que algunos sustratos en caldo se pueden reciclar y usar repetidamente durante la etapa de crecimiento celular, lo que lleva un costo de sustrato reducido. Después de lo anterior expuesto, el sistema continuo

puede ser una buena estrategia para el cultivo comercial o escala de laboratorio (Marchetti *et al.,* 2012; Kwon *et al.,* 2012).

Se han reportado procesos de fermentación en sistemas continuos con diferentes productos. Uno de los procesos más prometedores se relaciona con la formación del etanol (Verduyn *et al.,* 1992), incluidas las bebidas fermentadas tales como el vino (Bakoyianis *et al.,* 1992), sidra (Nedovic *et al.,* 2000); y etanol combustible. Así también se ha expuesto otro bioproductos tales como el PHA, hidrógeno, acetona-butanol-etanol (Li *et al.,* 2014).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, en el presente proyecto se estudió el comportamiento de *S. spinosa* en sistemas en lote, lote alimentado y continuo con la finalidad de comparar la productividad de las espinosinas.

2. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar la producción de biomasa y espinosinas a partir del cultivo en lote, lote alimentado y continuo de *S. spinosa* con la finalidad de obtener el más alto rendimiento del producto.

3.1.1 Específicos

- Implementar cultivos de *S. spinosa* en lote, lote alimentado y continuo en fermentador con jarra de 10 L.
- Evaluar la producción de biomasa por peso seco en los sistemas de cultivo
- Evaluar la concentración de espinosinas en cada sistema de cultivo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico

La cepa fue comprada en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV-IPN), cuyo registro está en la colección nacional de cepas microbianas y cultivos celulares afiliada a la WFCC (World Federation for Culture Collection) bajo el acrónimo CDBB. La cepa corresponde a *Saccharopolyspora spinosa* CDBB B-1920 y fue adquirida en cultivo sólido en Slants (tubos de vidrio).

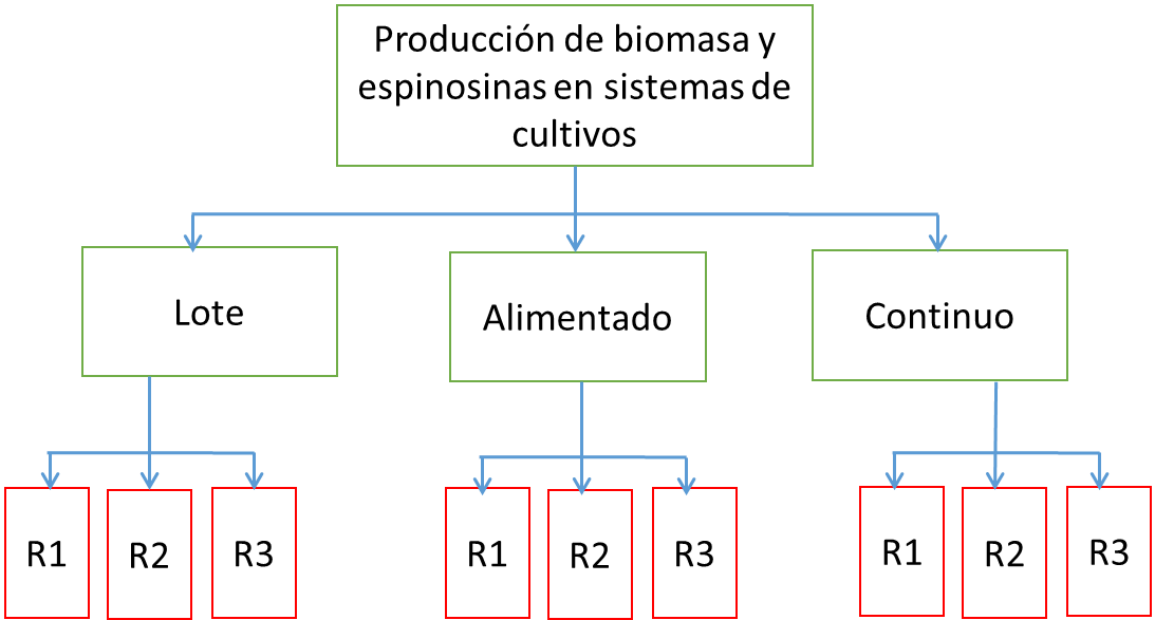
4.2 Activación de la cepa

La cepa fue reactivada de acuerdo a la metodología de (Liang *et al.,* 2009 y (Martinez-Chavez *et al.,* 2018), donde el medio de cultivo contenía, 0.3 g/L de extracto de levadura, 0.2 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 1 g/L de dextrosa, 1.8 g/L de agar y se ajustó el pH a 7. Posteriormente la bacteria *S. spinosa* fue resembrada en cajas Petri de 5 cm de diámetro, y fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su uso. Previamente, el medio se esterilizó en una autoclave (1925x), con tapón de algodón estéril y papel aluminio, a una presión de 1.0 kg/cm^2 y una temperatura de 121 °C durante 15 min. El medio inoculado se incubó a 30 °C por 48 h.

4.3 Diseño experimental

Se llevó a cabo un diseño experimental por lotes (Figura 1), los tratamientos a comparar fueron: sistema en lote, alimentado y continuo, donde la respuesta fue el crecimiento celular con respecto al tiempo y la producción de espinosinas. Cada tratamiento contó con 3 repeticiones.

Figura 1. Diseño experimental



4.4 Fermentación en lote

El sistema en lote se llevó a cabo en un fermentador de tanque agitado Xplora (Adaptive Biosystems Ltd, UK), el cual tiene una jarra de 10 L con un volumen de trabajo de hasta 7 L.

El fermentador con medio de cultivo conteniendo 3 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado, 10 g/L de dextrosa, pH 7 fue esterilizado a una presión de 1.0 kg/cm^2 y a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 15 min. La aireación se fijó en 2.5 vvm, pH inicial de 7.0 sin control de pH durante la fermentación, velocidad de agitación de 140 rpm y temperatura de 26 °C. El tanque agitado se inoculó con 50 mL de pre-inóculo por litro de medio, a una densidad óptica de 0.24 (Martinez-Chavez *et al.,* 2018).

4.5 Fermentación en lote alimentado

El inóculo que se utilizó para la reactivación de la cepa es como en el caso del sistema en lote. Los cultivos por lote alimentado se desarrollaron en un fermentador Xplora de 10 litros (Adaptive Biosystems Ltd, UK). Se comenzó con una operación por carga con 2000 mL del medio de cultivo con aireación de 2.5 vvm, pH inicial de 7.0 sin control de pH durante la fermentación, velocidad de agitación de 140 rpm y temperatura de 26 °C. Este proceso por carga duró hasta garantizar la fase de crecimiento exponencial, y después se inició con el proceso por lote alimentado, agregando medio de cultivo fresco (500 mL/día) hasta que se lograron condiciones casi estacionarias (Lu *et al.,* 2017). La alimentación se adicionó al reactor bajo condiciones asépticas utilizando una bomba peristáltica (Watson-Marlow, Modelo 323) hasta alcanzar un volumen total de 3000 mL.

4.6 Fermentación en sistema continuo

Al inicio, el cultivo se llevó a cabo en modo lote hasta agotar el sustrato y luego fue operado en modo continuo. El medio fresco fue suministrado continuamente al fermentador por una bomba peristáltica, al mismo tiempo que el producto fue removido a través del módulo de filtración por una bomba de succión. La velocidad de alimentación y la de salida del medio se ajustó a un flujo de 78 mL/h. El nivel del fermentador se ajustó a un litro para obtener una tasa de dilución de 0.078 h^{-1}. El fermentador y el módulo de filtración fueron simultáneamente esterilizados por 40 min a 121 ºC. La fermentación se llevó a cabo con aireación de 2.5 vvm, pH inicial de 7.0 sin control de pH durante la fermentación, velocidad de agitación de 140 rpm y temperatura de 26 °C (Martinez-Chavez *et al.,* 2018).

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Determinación de Biomasa

La concentración de biomasa se determinó turbidométricamente midiendo la absorbancia de la muestra a 620 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. La densidad óptica fue relacionada con el peso seco de biomasa por unidad de volumen a través de la construcción previa de una curva de calibración. Se tomaron alícuotas de 10 mL cada 2 h durante cada corrida experimental y se determinó la biomasa en peso seco después de centrifugar 15 min a 10000 rpm, se recolectaron las células sedimentadas y se llevaron a estufa a 105 °C por 1 h (Martínez-Chávez., 2018). Con el fin de comparar el crecimiento bacteriano en cada corrida experimental en cada sistema de cultivo se calcularon la producción de biomasa ($X_{mg/L}$), la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td).

4.7.2 Determinación de glucosa

El consumo de sustrato se determinó por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller, 1959), para la determinación espectrofotométrica a 540 nm de los azúcares reductores. Esta técnica sirve para cuantificar los azucares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática. A 500 μL de muestra se le adiciono 500 μL del reactivo DNS, se colocó en baño en ebullición durante 5 min y después de enfriar se adicionó de 10 mL de agua. Las mediciones de absorbancia se compararon con las de una curva patrón de glucosa, midiendo a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

4.7.3 Determinación de espinosinas

El método de extracción de espinosinas se llevó a cabo por la metodología de Jha *et al.,* (*2014*), se tomaron 10 ml de medio de cultivo procedente de cada corrida experimental y 20 mL de acetonitrilo (1:2), se puso a reposar durante 30 min con agitación y se centrifugo a 10,000 rpm para separar las células. Se decantó y al sobrenadante se le adiciono 15 ml de diclorometano. Después se evaporó el solvente en estufa a 60 °C, y se recuperaron las espinosinas con acetonitrilo para su cuantificación por HPLC (Cecil Adept, modelo CE 4200).

Las muestras se pasaron por un filtro de 0.2 µm con ayuda de una jeringa comercial de 2 mL y almacenadas en tubos ependorf de 1000 µL. Posteriormente se inyectaron 40 µL al HPLC-UV-Vis mediante una fase móvil de acetonitrilo/agua (90:10, v/v) a un flujo de 1 mL x min a 245 nm de longitud. Se utilizó una columna (pursuit 5) C-18 (150 x 4.6 mm). Se llevó acabo el mismo procedimiento para construir una curva de calibración de 0, 4, 6, 8, 10 mg/mL, usando como estándar espinosad (Sigma).

4.8 Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico, las medias de la producción de biomasa y espinosinas de los tratamientos de lote, lote alimentado y continuo se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) a una vía, para ver diferencias significativas ($P<0.05$) y a una prueba pos hoc de comparación de medias (Tukey), mediante el uso del programa estadístico SIGMA PLOT V12.0.

5. RESULTADOS

En el laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache ITSAT-CIAA, en la línea de investigación de bioprocesos se llevaron a cabo tres sistemas de cultivo: lote, lote alimentado y sistema continuo.

A continuación, se ilustra el proceso que se realizó para el crecimiento de la bacteria *S. spinosa* en la producción de espinosinas.

En la figura 2 se muestran los sistemas de fermentación utilizados en este proyecto, tomando en cuenta los parámetros como aireación 2.5 vvm, a 140 rpm a 26°C, sin control de pH.

Figura 2 Sistemas de cultivo de fermentación para la producción de espinosinas de la bacteria de *S. spinosa*. a) sistema de cultivo en lote, b) sistema en lote alimentado y c) sistema de cultivo continuo.

5.1 Producción de biomasa en sistema en lote

En la figura 3 se muestra la cinética de crecimiento de biomasa, que va desde 0 a 48 h. El comportamiento de la curva no muestra fase de latencia, sin embargo, la fase exponencial se ve reflejada desde las primeras horas hasta las 36 h con una producción de 0.775 g/L de biomasa, con una $\mu = 0.057\ h^{-1}$ y un TD = 9.90 h, e inmediatamente inicia la fase de muerte. Este comportamiento tiene correlación con el consumo de sustrato, donde a partir de la hora 36, el sustrato consumido fue de 75%.

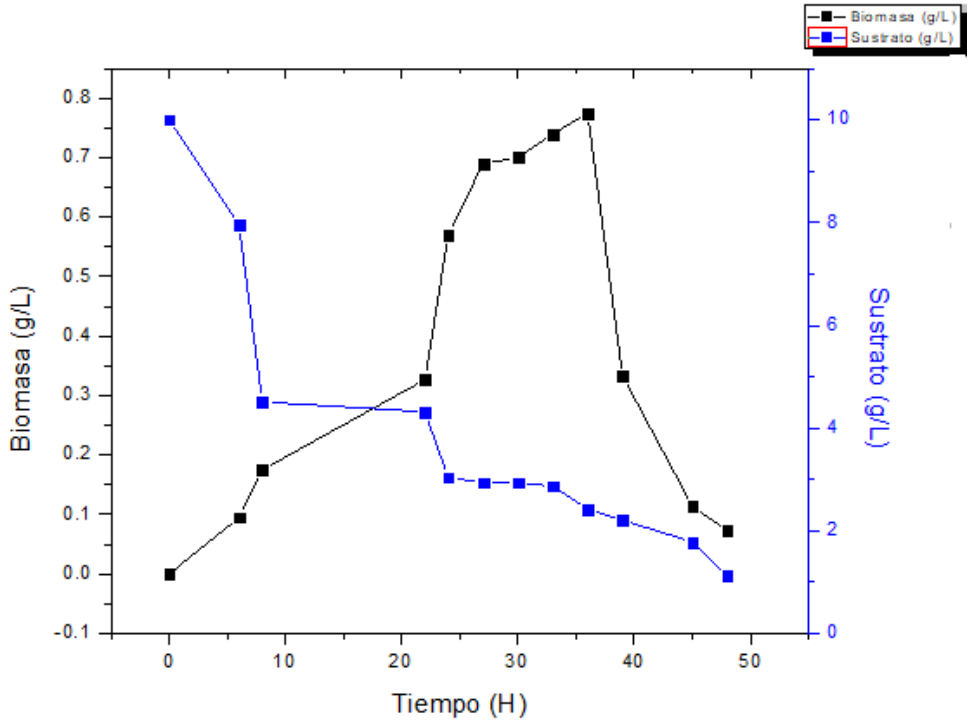


Figura 3 Variación del consumo de sustrato (azúcares) y crecimiento de biomasa de la bacteria de *S. spinosa* para el sistema de cultivo en lote

5.2 Producción de biomasa en sistema de lote alimentado

Como se aprecia en la figura 4, la producción de biomasa inicia inmediatamente después de la inoculación, esto quiere decir, que no se presenta la fase de latencia, sin embargo, la producción de máxima de biomasa es a las 30 h con 1.32g/L, con una μ^{h-1}= 0.92 h^{-1} y un TD = 7.70 h. Por otro lado, el consumo de sustrato fue a las 24 h con el 80%, por lo que se le adiciono nuevo sustrato, y el comportamiento de producción de biomasa fue aumentando hasta 30 h, no así, en la segunda adición de sustrato (hora 48), viéndose afectada la producción de biomasa.

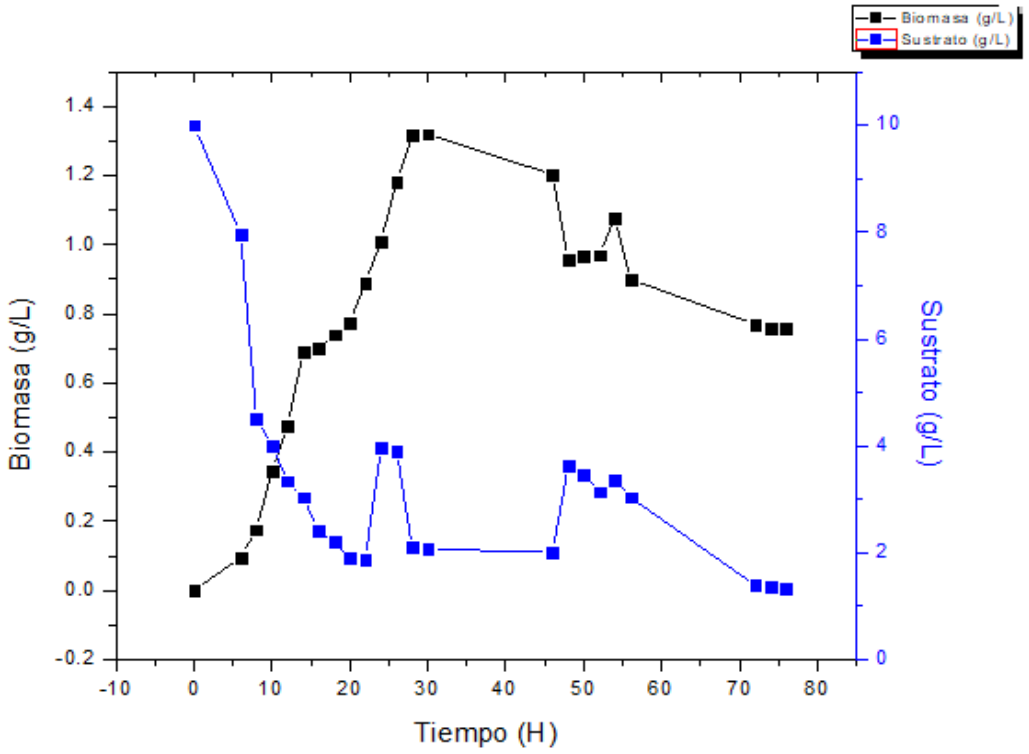


Figura 4 Variación del consumo de sustrato (azúcares) y crecimiento de biomasa de la bacteria de *S. spinosa* para el sistema de cultivo en lote alimentado

.

5.3 Producción de biomasa en sistema continuo

En el sistema continuo, se observa una producción máxima de biomasa de 1.90 g/L a las 28 h con una μ^{h-1}=0.07 h^{-1} y un TD de 13.86 h. Así mismo se ajustó a una tasa de dilución (D) de 0.078 h^{-1} donde a las 28 h inicia el sistema continuo obteniendo 0.102 g/L, de la misma manera a las 38 h alcanza un crecimiento de biomasa de 2.12 g/L cuando contiene 858 mL de medio de cultivo como se muestra en la figura 5.

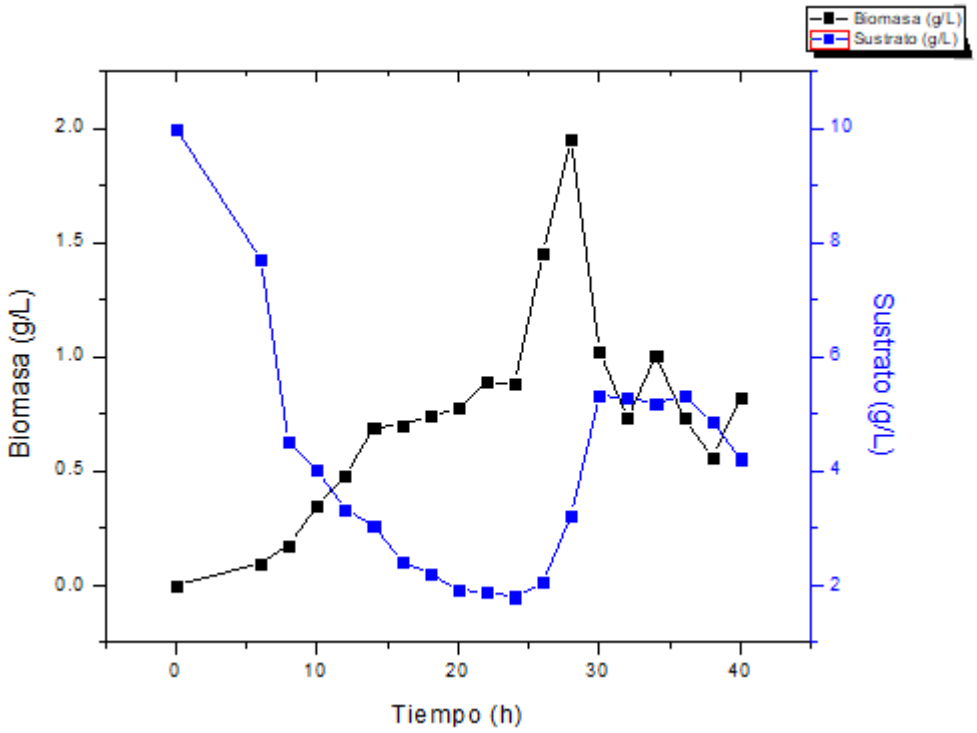


Figura 5 Comportamiento del crecimiento de biomasa y consumo de sustrato (azúcares) de la bacteria de *S. spinosa*, contenida en el fermentador de tanque agitado.

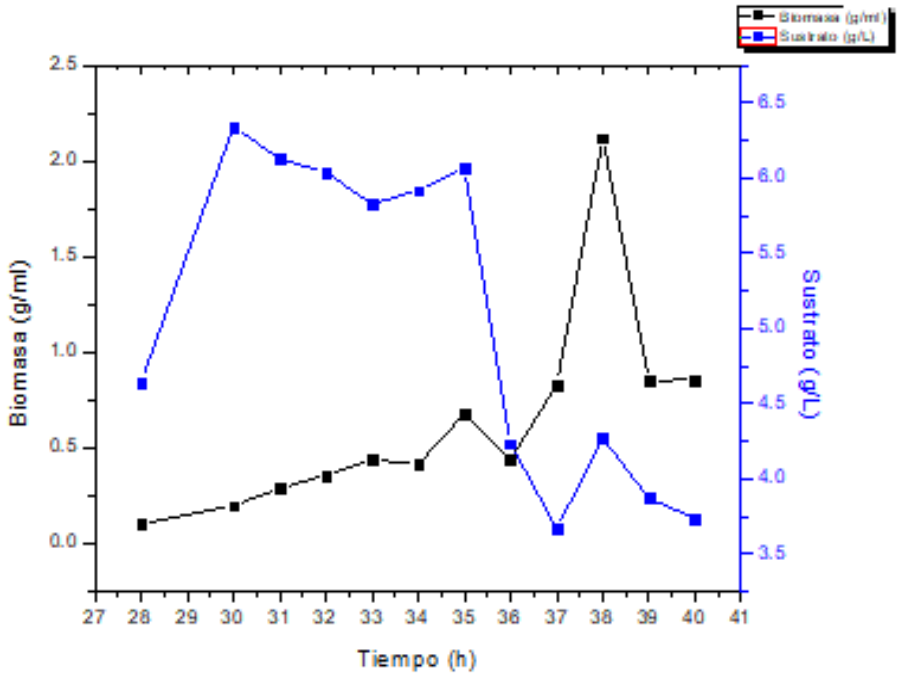


Figura 6 Crecimiento de biomasa y consumo de sustrato (azúcares) de la bacteria de *S. spinosa* en la salida del fermentador.

5.4 Cuantificación de espinosinas mediante HPLC

Se realizó la cuantificación de espinosinas A y D mediante HPLC (Tabla 2). En el sistema en lote, a las 24 h tuvo una producción de espinosinas de 240.770 mg/L; sin embargo, a las 36 h se observa 1.20 veces mayor (289.297 mg/L). Por otra parte, el sistema alimentado muestra una producción de 426.628 mg/L a las 24 h y 492.738 mg/L en 30 h, mientras que el sistema continuo sintetizó 292.726 mg/L de espinosinas en 24 h y 638.320 mg/L en 28 h.

Al realizar el ANOVA de producción de biomasa se encontraron diferencias significativas entre los sistemas de biorreactores, con una F=24594.973 y P=0.001. Siendo la mayor producción en sistema continuo con 1.9 mg/L. Además, el ANOVA de espinosinas arrojó diferencias significativas (F=254.42 y P=0.001). Por lo que se procedió a realizar la prueba de comparación de medias de Tukey, con una $p<0.05$

entre los sistemas de producción de espinosinas y biomasa (Tabla 2). Y se aprecia que existen diferencias estadísticas entre los sistemas analizados, tanto en biomasa y espinosinas.

Tabla 1 Cuantificación de espinosinas producidas por *S. spinosa* en distintos sistemas de biorreactores.

Sistema	Horas (h)	X (mg/L)	Espinosinas (mg/L)
Lote	24	0.57±0.0214[d]	240.77±0.574[e]
	36	0.775±0.0404[c]	289.297±2.210[d]
L. Alimentado	24	1.01±0.1041[b]	426.628±0.6204[c]
	30	1.320±2.210[b]	492.738±0.880[b]
L. Continuo	24	0.77±0.0125[c]	292.726±0.420[d]
	28	1.900±0.111[a]	638.320±2.435[a]

Letras distintas significan que existe diferencia estadística significativa, mediante la prueba de Tukey P>0.05; X= Biomasa; h= horas

A continuación, se muestra el monitoreo de la cuantificación de espinosinas en la salida del biorreactor en el sistema continuo, monitoreada cada 78 mL/h. La producción de espinosinas se comporta igual a la producción de biomasa. Iniciando con 34.32 mg/L y aumentado significativamente hasta 723.32 mg/L de espinosinas.

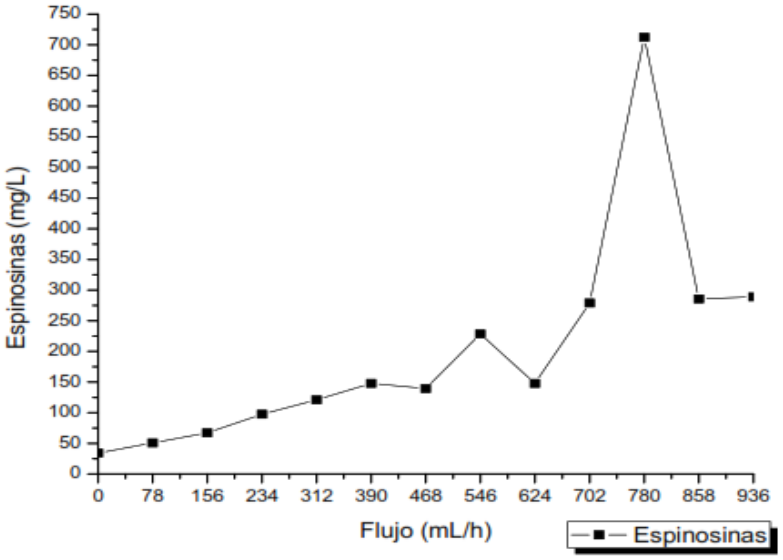


Figura 7 Monitoreo de producción de espinosinas por *S.spinosa* en la salida del fermentador

6. DISCUSIÓN

Los estudios científicos sobre incremento en la producción de espinosinas se basan principalmente en mejoras de *S. spinosa* (Bai *et al*.,2015., Wang *et al*., 2015; Lu *et al*., 2017) y en la optimización del medio de cultivo (Strobel y Nakatsukasa, 1993), Aún asi, los autores han publicado baja productividad de espinosinas. En procesos industriales para otras especies, existen diferentes sistemas de producción de compuestos de interés, además de cultivos en lote se usan los sistemas continuo y alimentado, y se reportan incrementos en la producción de metabolitos de interés (Guerra *et al.*, 2007). Es por ello, que el presente trabajo da respuesta a la producción de espinosinas y de biomasa en diferentes sistemas.

Los resultados obtenidos en el sistema en lote la mayor produccion de biomasa fue a las 36 h con 0.775 g/L, y produjo 289.297 mg/L de espinosinas, en cuanto al sistema en lote alimentado la produccion de biomasa fue a las 30 h, sintitazando 492.738 mg/L de espinosinas, mientras en el sistema continuo obtuvo una produccion maxima de 1.90 g/L, y una productividad de 723.32 mg/L de espinosinas, este ultimo es debido a que el sistema cuenta con una entrada de suministro de nutrientes y salida de biomasa.

En los sistemas de biorreactores se utilizó sacarosa como fuente de carbono a una concentración de 10 g/L, obteniendo un rendimiento celular con respecto al consumo de sustrato adicionado de 0.19 g/L., no así en la investigación de Guagun *et al.* (2016), donde utilizaron diferentes fuentes de carbono, el rendimiento celular más alto se logró con manitol a una concentración de 10 g/L, consiguiendo 0.0325

g/L, a nivel matraz. En el 2017, Lu *et al*., realizaron pruebas de adición de oxígeno en concentraciones variadas y obtuvieron un rendimiento celular de 0.97 g/L, usando 60 g/L de glucosa como sustrato a un pH de 7.2, en matraces. En cuanto a nivel biorreactor, Bai *et al*., (2015) trabajo sistema en lote, y el rendimiento celular fue de 0.367 g/L en 120 h, utilizando 60 g/L de glucosa, a 150 rpm, adicionando en diferentes tiempos oxigeno (OD) de 20, 40 y 50%. El resultado obtenido en esta investigación sobre el rendimiento celular en el sistema continuo es menor, ya que posiblemente depende por la adición de OD en tiempos variados.

En cuanto a la producción de espinosinas A y D, o también llamada espinosad (mezcla de las dos lactonas), fueron detectadas mediante HPLC con detector de UV-Vis. El sistema continuo sintetizó la mayor concentración (638.32 mg/L) de espinosinas, 1.29 veces más que el sistema alimentado (492.73 mg/L) y 2.2 mayor que el sistema en lote (289.297 mg/L), y esta producción pudiera deberse a que se le adicionaba sustrato durante el análisis (78 mL/h). Por otra parte, Jim *et al*., (2008) evaluó la producción de espinosinas de bacterias recombinantes (*S. spinosa*) en un biorreactor con 5 L de medio de cultivo, las dos cepas con mayor resultado fueron UN-3 con 547 mg/L y UN-L3 con 493 mg/L a las 168 h. Dos años más tarde, mediante una cepa transformada genéticamente, con 30 g/L de glucosa se obtuvo 0.800 mg/L de espinosinas a nivel matraz (Pan *et al*., 2010). Y en el 2012 reportaron 466.6 mg/L en una cepa transformada (S078-1101) y 251 mg/L con la cepa (SP06081) a los 216 h, con glucosa como sustrato a una concentración de 60 g/L (Yushuan *et al*., 2012). En un sistema en biorreactor en lote, Lu et al., (2017) reporta una producción de 357 mg/L de espinosinas en 120 h, adicionando en cantidades

variables (20, 40 y 50%) de oxígeno disuelto. Bai *et al*., (2015), reporta a 240 h una producción de 138 mg/L de espinosinas en matraces. Los reporten anteriores indican que las espinosinas no obtienen su máxima producción en la etapa de exponencial, por lo que existe correlación entre la producción de biomasa y la síntesis de espinosinas, ya que estas se producen en la etapa estacionaria y la adición de oxigeno influye en producción de este compuesto (Yushuan *et al*., 2011). Cabe recalcar, en esta investigación se trabajó con 10 g/L de sustrato y se obtuvo 638.32 mg/L de espinosinas a las 48 h en el sistema en continuo, mientras, los demás autores trabajaron de 30 hasta 60 g/L de sustrato y la producción se dio por arriba de las 48 h. Los resultados presentados en sistema continuo, alimentado y lote son mayores a los reportados por otros investigadores. Estos resultados pudieran deberse al inoculo, y la aeración utilizada (2.5vvm) y la cantidad mínima de sustrato utilizado.

La producción de espinosinas en la salida del biorreactor en sistema continuo dio detección de este compuesto, lo que indica que se comienzan a sintetizar en la etapa exponencial y mayoritariamente en la fase estacionaria. Este comportamiento fue reportado por Yang *et al.,* (2014) donde, reveló que la producción de espinosinas se da a partir de la etapa exponencial y que no es exclusiva de la fase estacionaria.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevó a cabo el crecimiento de la bacteria de *S. spinosa* en sistemas de cultivo de lote, lote alimentado y continuo, donde existe correlación del consumo de sustrato contra la producción de biomasa y la producción de espinosinas.

El sistema continuo favoreció la mejor producción de biomasa y espinosinas en un periodo de 28 h en comparación con los sistemas de lote y lote alimentado, adicionando el pre-inoculo a una ABS de 0.25 por cada litro de cultivo, lo que favoreció la adaptación de *S. spinosa* al no mostrar la fase de latencia. Es por ello que el sistema continuo es apto para la producción de metabolitos de interés de la bacteria de *S. espinosa* ya que mostró el mayor rendimiento de espinosinas.

Los resultados favorecieron el sistema continuo en la producción de espinosinas, por consiguiente, se considera apto para arrancar una producción a mayor escala, para utilizar el principio activo en productos de interés agroindustrial, y esto a su vez permitirá reducir los costos de producción.

8. APLICACIÓN PRÁCTICA

La presente investigación da conocimiento a la producción de espinosinas de la bacteria *S. spinosa* en sistemas de biorreactores continuos, para la generación de bioplaguicidas, principalmente en cítricos.

Las fermentaciones de la bacteria *S. espinosa* en el fermentador del sistema continuo permitirán la obtención de productos de interés a gran escala (Industrial), que permiten reducir costos de producción y poder obtener productos amigables para la aplicación en la agricultura, principalmente contra la *Anastrepha ludens*, en los cítricos. Sin dejar a un lado los cultivos de interés comercial, como el mango, guayaba, etc. ya que este ingrediente activo es efectivo.

Con base a lo anterior, los citricultores de la región de Álamo Temapache y alrededores, podrán obtener el producto a un costo más accesible, lo que les permitirá adquirir el producto con mayor facilidad tanto a pequeños como a grandes citricultores.

9. BIBLIOGRAFíA

Akesson, M., Hagander, P., y Axelsson, J.P. (1999). A probing feeding strategy for *Escherichia coli* cultures. *Biotechnology Techniques,* **13(8):** 523-528.

Aluja, M., y Mangan, R.L. (2008). Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Host Status Determination: Critical Conceptual, Methodological, and Regulatory Consideration, Xalapa, Veracruz, México: Annual Review of Entomology.

Bai, Y., Zhou, P., Fan, P., Zhu, Y., Tong, Y., Wang, H., y Yu, L. (2015). Four-stage dissolved oxygen strategy based on multi-scale analysis for improving spinosad yield by *Saccharopolyspora spinosa* ATCC49460. *Microbial biotechnology,* **8(3):**561-568.

Bakoyianis, V., Kanellaki, M., Kaliafas, A., y Koutinas, A.A. (1992). Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. *Agricultural and Food Chemistry*, ***40*(7):**1293–1296.

Buentello-Wong, S., Galan-Wong,L., Arealo-Niño,K., Almaguer-Cantu, V: y Rojas-Verde, G. (2016). Toxicity of some essential oil formulations against the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Industrial Crops and Products*, **85**: 58-62.

Fernandes, B. D., Mota, A., Teixeira, J. A., y Vicente, A. A. (2015). Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends. *Biotechnology Advances*, ***33*(6):** 1228–1245.

Galm, U., y Sparks, T. C. (2015). Natural product derived insecticides : discovery and development of spinetoram. *Journal of Industrial Microbiology and*

Biotechnology, **43:** 185-193.

Ganuza, E., y Izquierdo, M. S. (2007). Lipid accumulation in *Schizochytrium* G13 / 2S produced in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76(5):**985-990.

Guerra, N. P., Bern, P. F., y Castro, L. P. (2007). Fed-batch pediocina la producción de suero de leche en el uso de diferentes medios de alimentación. *Enzima y Microbial Technology,* **41**: 397-406.

Guerra, N. P., Bern-Ardez. P.F., y Pastrana-Castro, L.(2007). Fed-batch pediocina la producción de suero de leche en el uso de diferentes medios de alimentación*. La enzima y Tecnologia Microbiana,* **41**: 397-406.

Guojun, Y., Yuping, H., Yan, J., Kaichun, L., y Haiyang, X. (2016). A new medium for improving spinosad production by *Saccharopolyspora spinosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, ***9*(6):**1-5

Jha, A. K., Pokhrel, A. R., Chaudhary, A. K., Park, S., Cho, W. J., y Sohng, J. K. (2014). Metabolic engineering of rational screened *Saccharopolyspora spinosa* for the enhancement of spinosyns A and D production. *Molecules and Cells,* ***37*(10):**727–733.

Kirst, H.A., Michel, K.H., Mynderase, J.S., Chio, EH., Yao, R.C., Nakasukasa, W.M., Boeck, L.D., Occiowitz, J.L., Paschal, J.W., Deeter, J.B y Thompson, G.D., (1992). Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides. *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III,* ***504****:* 214-225.

Kwon, J.H., Rögner, M., y Rexroth, S. (2012). Direct approach for bioprocess

optimization in a continuous flat-bed photobioreactor system. *Journal of Biotechnology,* **162(1):**156-162.

Li, N.W ., Zhang,X.L.,Guo, W.Q.,Xiong, Q ., Song, W . y Song Y. (2010). Study on the fermentation media for spinosad production. *Journal of Northwest A y F University - Natural Science,* ***38(1):***216–224.

Li, T., Chen, X.B., Chen, J.C., Wu,Q., y Chen, G.Q. (2014). Open and continuous fermentation : Products, conditions and bioprocess economy. *Biotechnology Journal,* **9**:1503–1511.

Liang, Y., Lu, W.,y Wen. J. (2009). Improvement of *Saccharopolyspora spinosa* and the kinetic analysis for spinosad production. *Appl Biochem Biotechnol*, ***152(3)*:**440–448.

Lu, C., Yin, J., Zhang, C., y Lu, W. (2017). Fed-batch fermentation for spinosad production in an improved reactor. *Transactions of Tianjin University,* ***23:*** 530-537.

Lu, C., Yin, J., Zhao, F. (2017). Análisis de la metabolómica del efecto del oxígeno disuelto en la producción de espinosad por *Saccharopolyspora spinosa* . Antonie van Leeuwenhoek **110:**677–685..

Marchettia, J., Bougarana, B., Deana, L.L., Mégrier, C., Lukomska, E., Kaas, R., Olivo,A., Baronc, R., Robert, R., y Cadoret, J.P. (2012). Optimizing conditions for the continuous culture of *Isochrysis affinis* galbana relevant to commercial hatcheries. *Aquaculture*, ***326*(*329)*:** 106–115.

Martinez-Chavez, D.R., Mabarak-Hernandez, H., Cruz-Hernandez, A., Perez-Vargas, M.A., y Chaires-Martinez, L. (2018). Produccion de altas

densidades celulares de *Saccharopolyspora spinosa* en tanque agitado. *Journal Cim,* ***6(1):*** 1413-1419.

Mears, L., Stocks, S.M., Sin, G., y Gernaey, K.V. (2017). A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. *Journal of biotechnology,* ***245:*** 34-46.

Mertz, F. P., y Yao, C. (1990). *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. *International Journal of Systematic Bacteriology*, ***40*****(1):**34–39.

Millar, N.S. y Denholm, I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticide. *Invert Neurosci,* ***7***: 53-66.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem,* ***31:*** 426-428.

Mohd Zain, M. Z. B., Kanesan, J., Kendall, G., y Chuah, J. H. (2018). Optimization of fed-batch fermentation processes using the Backtracking Search Algorithm. *Expert Systems with Applications*, ***91***:286–297.

Montalvo, S., Guerrero, L.,Rivera, E.,Borja, R.,Chica, A. y Martin, A. (2010). Kinetic evaluation and performance of pilot-scale fed-batch aerated lagoons treating winery wastewaters. *Bioresource Technology,* **101(10):**3452-3456.

Moore,S.D. y Duncan, L.W.(2017). Microbial Control of Insect and Mite Pests of Citrus, Florida, Estados Unidos: Citrus Research International.

Nedovic, V.A., Durieuxb, A., Nedervelde, L.V., Rosseels, P., Vandegans, J., Plaisant, A.M., Simon, J.P. (2000). Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial*

Technology, **26(9-10):**834-839.

Pan, H,X., Li, J.A., He, N.J., Chen, J.Y., Zhou, Y.M., Shao, L., y Chen, D.J. (2011). Improvement of spinosad production by overexpression of gtt and gdh controlled by promoter PermE* in Saccharopolyspora spinosa SIPI-A2090. *Biotechnol lett,* ***33***: 733-739.

Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J.R., y Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnology and bioengineering,* ***81(7):*** 818-828.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Atlas Agroalimentario2012-2018. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas Agroalimentario-2018

Strobel, R.J., Nakatsukasa, W.M., (1993). Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer. *Journal of Industrial Microbiology,* ***11***: 121-127.

Suzuki, T., Yamane, T., y Shimizu, S.(1990). Phenomenological background and some preliminary trials of automated subtrate supply in pH-stat modal fed-batch culture using a setpoint of high limit. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, ***69*(5):** 292–297.

Thompson, G.G., Dutton, R.y Sparks,T.C. (2000). Spinosad – a case study : an example from a natural products discovery programme. *Society of Chemical Industry,* ***56***: 696-702.

Vanoye-Eligio, V., Rosas-Mejia, M., Rocandio-Rodriguez, M., Vanoye-Eligio, M., y

Coronado-Blanco, J.M. (2019). A spatio- temporal approach for the occurrence of traps capturing sexually matue *Anastrepha ludens* females over an extensive citrus area in Mexico. *Crop Protection*, **124**: 104858.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., y Van-Dijken, J.A. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast,* **8(7):** 501-517.

Wang, H., Xue, W., He, Y.M., Peng, R.H., y Yao, Q.H. (2014). Improvement of the ability to produce spinosad in *Saccharopolyspora spisona* through the acquisition of drug resistance and genome shuffling. *Ann microbiol,* ***65:*** 771-777.

Yang, Q., Ding, X , Liu,X., Liu, S., Sun,Y., Yu, Z., Hu,S., Rang, J., He,H., He, H y Cite, L. (2014). Differential proteomic profiling reveals regulatory proteins and novel links between primary metabolism and spinosad production in *Saccharopolyspora spinosa*. *Microbial Cell Factories.* 13:27.

Zepeda-Cisneros, C.S., Meza-Hernandez, J.S., Garcia-Martinez,V., Ibañez-Palacio, J., Zachaopoulou, A.,y Franz, G. (2014). Development, genetic and cytogenetic analyses of genetic seing strains of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). *BMC Genet*, **15 (1).**

Zhang, X., Xue, C., Zhao, F., Li, D., Yin, J., Zhang, C., … Lu, W. (2014). Suitable extracellular oxidoreduction potential inhibit rex regulation and effect central carbon and energy metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *Microbial Cell Factories,* **13(98):** 1-11.

Zhihua, J., Xiu, C., y Peilin, C. (2006). Effects of glucose and phosphate on spinosad fermentation by *Saccharopolyspora spinosa*. *Department of Biochemical and Chemical Engineering,* ***14*****(4):** 542–546.