

1825



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE UNA CEPA TRANSFORMANTE DE
Escherichia coli SOBREPDUCTORA DE LISINA
Y METIONINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

FELIPE GARCIA HERNANDEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAIME ALVAREZ DE LA CUADRA JACOBS.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. JULIO, 1990

FALLA DE COPIA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Pág.

Resumen.	i
I) GENERALIDADES.	1
I.1) Introducción.	1
I.1.1) Historia de la Biotecnología.	1
I.1.2) Papel de lisina y metionina en la nutrición.	4
I.2) Antecedentes de la producción de aminoácidos.	
Producción microbiana.	6
I.2.1) Mutantes auxotróficas.	6
I.2.2) Mutantes regulatorias.	7
I.3) Vía de síntesis de lisina y metionina. Regulación y mutación.	11
I.4) Eficiencia.	14
I.5) Crecimiento microbiano y su relación con el ambiente.	17
I.5.1) Efecto de la concentración de nutrientes.	17
I.5.1.1) Efecto de la fuente de carbono.	18
I.5.1.2) Efecto de la fuente de nitrógeno.	19
I.5.1.3) Oxígeno.	20
II) OBJETIVOS.	22
III) MATERIALES Y METODOS.	23
III.1) Cepas bacterianas.	23
III.2) Productos químicos y biológicos.	23
III.3) Obtención de mutantes resistentes a etionina.	24
III.4) Evaluación de lisina y metionina excretadas al medio.	24

	Pág.
III.5) Determinación de las concentraciones óptimas de carbono, nitrógeno y oxígeno para obtener un mejor rendimiento de producción.	28
III.6) Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.	30
IV) RESULTADOS.	31
IV.1) Obtención de mutantes resistentes a etionina.	31
IV.2) Cuantificación de lisina por el método de Work, y de metionina por el método de complementación auxotrófica.	31
IV.3) Determinación de concentraciones óptimas de carbono, nitrógeno y oxígeno.	31
IV.4) Proteína total de la cepa QA1122F productora de lisina y metionina, y de la cepa silvestre de <u>E. coli</u> Q358.	43
IV.5) Cinética de crecimiento y producción de la cepa QA1122F con concentraciones óptimas de carbono, nitrógeno y oxígeno.	44
V) DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.	48
VI) REFERENCIAS.	56

INDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla I) Análogos tóxicos de aminoácidos utilizados en la obtención de mutantes regulatorias.	10
Tabla II) Procedimiento empleado para obtener la curva estándar de metionina.	26
Tabla III) Curva estándar de lisina.	27
Tabla IV) Susceptibilidad de la cepa QA1122 a etionina.	32
Tabla V) Producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F con diferentes condiciones de crecimiento.	38
Tabla VI) Producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F con diferentes cantidades de sulfato de amonio.	40
Tabla VII) Producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F en diferentes volúmenes de medio de cultivo.	42

INDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1) Ruta biosintética de los aminoácidos de la familia del aspartato.	12
Figura 2) Mecanismo de regulación de la vía de síntesis de lisina y metionina en <u>E. coli</u> .	15
Figura 2a) Mecanismo de regulación de la vía de síntesis de lisina y metionina en <u>Brevibacterium</u> .	16
Figura 3) Curva estandar de metionina.	33
Figura 4) Curva estandar de lisina.	34
Figura 5a) Cinética de crecimiento. Fuente de carbono. Concentraciones de 1 a 3% de glucosa.	36
Figura 5b) Cinética de crecimiento. Fuente de carbono. Concentraciones de 3 a 8% de glucosa.	37
Figura 6) Cinética de crecimiento. Fuente de nitrógeno.	39
Figura 7) Cinética de crecimiento. Diferentes volúmenes de medio de cultivo.	41
Figura 8) Cinética de crecimiento, cepa QA1122F. Condiciones óptimas.	45
Figura 8a) Cinética de producción de lisina. Condiciones óptimas.	46
Figura 8b) Cinética de producción de metionina. Condiciones óptimas.	47

RESUMEN

En este trabajo se reporta la obtención de una cepa sobreproductora de lisina y metionina, a partir de una cepa transformante de E. coli sobreproductora de lisina (QA1122), por medio de una mutación con un análogo de metionina (etionina).

Esta cepa, denominada QA1122F, tiene una producción de lisina de 359.7 mg/l, con un rendimiento de 1.7985% y 56.9 mg/l de metionina, cuyo rendimiento es de 0.285%, bajo condiciones de crecimiento en medio mínimo de Robinson más 2% de glucosa como fuente de carbono. La cepa QA1122 tiene una producción de lisina de 360 mg/l con un rendimiento de 1.8% y metionina 45 mg/l y su rendimiento es de 0.225% bajo las mismas condiciones de crecimiento mencionadas para la cepa QA1122F.

Además, se obtienen diversas cinéticas de crecimiento de la cepa sobreproductora, variando las condiciones del medio de cultivo, partiendo de que un microorganismo necesita de una fuente de carbono, de nitrógeno y oxígeno para poder desarrollarse y encontrando así un medio de cultivo óptimo para obtener la mejor cinética de crecimiento y producción de lisina y metionina y así también los mejores rendimientos de producción para ambos aminoácidos.

I) GENERALIDADES.

I.1) Introducción.

I.1.1) Historia de la biotecnología.

La biotecnología consiste en la utilización y transformación de microorganismos, células vegetales o animales para la obtención, en forma eficiente, de productos benéficos para el hombre. (19)

Una buena cantidad de compuestos orgánicos utilizados en la farmacología, la agricultura, los energéticos o la industria alimentaria, se derivan de procesos biológicos bajo control industrial en los cuales intervienen microorganismos. Una lista tentativa de tales compuestos puede ser la siguiente:

-Industria química: plásticos, productos para la industria textil y solventes.

-Energéticos: metanol, etanol, biogás y producción de hidrógeno.

-Biometalurgia: extracción de elementos metálicos (Fe, Cu, Zn).

-Industria alimentaria: proteínas, aminoácidos, vitaminas, síntesis de saborizantes, condimentos artificiales, bebidas fermentadas, jarabes y bioinsecticidas.

-Industria farmacéutica: antibióticos, vacunas, hormonas, interferón, anticuerpos monoclonales y otros.

- Area ambiental: tratamiento de aguas residuales, transformación de residuos domésticos y abonos.

La microbiología industrial requiere del crecimiento de microorganismos en fermentadores, dentro de un determinado medio de cultivo que posee los nutrientes necesarios y los precursores

de las sustancias que se desea obtener: alcoholes, antibióticos, vitaminas, vacunas, etc. En la ingeniería genética, por su parte, se obtiene el gene deseado, biológica o sintéticamente; se clona, uniéndolo a vectores moleculares (plásmidos o transposones), para obtener múltiples copias y se introduce en otros grupos celulares para transformarlos.

La producción de biogás parte del confinamiento de residuos orgánicos (vegetales y animales) en un biodigestor donde su descomposición a través de diversos grupos de microorganismos libera entre otros gases, el metano. (19)

Estos son procesos de la biotecnología, pues aunque muy distintos en apariencia, utilizan sistemas biológicos. Las bacterias, levaduras, hongos, algas, células y tejidos de plantas y animales, o enzimas aisladas de estos organismos, proveen los ingredientes activos para la formación de nuevas industrias y para el reemplazo de los procesos químicos o mecánicos existentes con procesos microbiológicos industriales nuevos o improvisados. (15)

La Federación Europea de Biotecnología considera que: "La biotecnología hace posible, a través de la aplicación integral de los conocimientos y técnicas de la bioquímica, microbiología, genética e ingeniería química, el logro de beneficios a nivel tecnológico, a través de las propiedades y capacidades de microorganismos y cultivos celulares". (4)

Para algunos autores la biotecnología se inicia con la modificación genética y por ende metabólica, de células procariotes y eucariotes, para la obtención de nuevos compuestos

o el incremento en la producción de los ya sintetizados. En este caso la historia de la biotecnología se remonta al inicio de la biología molecular. Para otros, la biotecnología aparece con las diversas metodologías de transformación que han usado las civilizaciones desde los inicios de la historia hasta nuestros días, cuando las manipulaciones biomoleculares alcanzan la transformación genética de algunos organismos. De esta manera, especialistas como Pierre Douzou separan la biotecnología en una etapa primitiva, una etapa moderna y, finalmente, la era de la biotecnología de vanguardia o de la nueva generación. (19)

El uso de microorganismos para el beneficio del hombre se utilizó desde épocas muy antiguas, de manera proporcional a los conocimientos que se poseían y, como es evidente, para satisfacer necesidades básicas: en la producción de pan, queso y bebidas fermentadas. Si bien hace 5000 años el hombre no manejaba directamente los microorganismos, pues no los conocía, se beneficiaba sistemáticamente con las transformaciones que producían. Actualmente, podemos no sólo confinar al microorganismo en un medio de cultivo, sino alterar su información genética y "beneficiarnos" aún más de él. No hay que perder de vista que los objetivos siempre han sido los mismos: lograr beneficios a partir de la actividad celular sobre la materia orgánica. (19)

1.1.2) PAPEL DE LISINA Y METIONINA EN LA NUTRICION.

Los animales, de acuerdo con la especie a que pertenecen, difieren en sus necesidades nutritivas. En general requieren triptofano, lisina e histidina, pero la mayoría necesitan más de tres aminoácidos esenciales. La nutrición humana requiere al menos ocho.

Como puede comprenderse, la cantidad de proteína necesaria para la dieta animal depende no tanto de las necesidades totales en nitrógeno amínico, como de sus exigencias de aminoácidos esenciales. Puesto que las proteínas tisulares y otros compuestos nitrogenados están siendo continuamente degradados y reemplazados, esta necesidad persiste durante toda la vida animal.

Los alimentos para animales tales como grano y otras semillas contienen sólo pequeñas cantidades de L-lisina. Dado que aves de corral, cerdos, ganado vacuno y otros animales de cría son incapaces de sintetizar este aminoácido, debe ser adicionado a estos alimentos para proveer una dieta adecuada. De este modo L-lisina es una sustancia de considerable importancia económica.

Metionina no sólo es un aminoácido esencial, sino también el donador principal de un metilo en sistemas metiltransferasa a través de el intermediario S-adenosilmetionina. Es también un precursor importante de poliaminas y etileno. Grandes cantidades de DL-metionina son usadas para incrementar el valor nutricional de alimentos para uso animal.

La demanda de metionina como un aditivo alimenticio ha incrementado con el aumento en la utilización de harina de

semilla de soya, porque las proteínas de esta semilla son deficientes en metionina. En el presente, la producción de DL-metionina ocupa el segundo lugar después de ácido glutámico en la producción total de aminoácido. Varios L-aminoácidos, incluyendo ácido glutámico y lisina son ahora producidos con bacterias por utilización de carbono y nitrógeno.(4)

La carencia de estos aminoácidos provoca, en niños, cuadros muy graves de desnutrición. En el caso de los animales monogástricos, dietas deficientes en metionina, provoca cuadros de hígado graso y necrosis, mientras que se presenta hiperplasia de la médula ósea, cuando hay carencia de lisina.(16,23)

En los alimentos de origen vegetal, fuente de calorías y de parte de la proteína requerida, se encuentra que los niveles de lisina y metionina son muy bajos. Tal es el caso del sorgo, que es usado como base para la formulación de las dietas para animales monogástricos. En el caso de la dieta humana, se requeriría un mínimo de 500 a 700 g de maíz para cubrir las necesidades diarias de estos aminoácidos.(2)

El uso de lisina y metionina, al igual que cualquier otro componente para la alimentación pecuaria, está sujeto a dos factores: disponibilidad de mercado y precio. A su vez, estos factores dependen de la eficiencia de operación y capacidad industrial. Actualmente en México se producen alrededor de seis mil toneladas anuales de lisina, por un proceso microbiano mediante tecnología japonesa, mientras que la planta industrial para la fabricación de metionina dejó de producir en 1984 y se importan más de cinco mil toneladas anuales de este aminoácido que es sintetizado químicamente a partir de metilmercaptano. Por

otra parte, es interesante mencionar que la demanda de lisina para uso terapéutico humano, en casos de desnutrición elevada, quemaduras o regeneración tisular va cada vez en aumento y que el 100% de este producto es de origen extranjero. (20)

1.2) ANTECEDENTES DE LA PRODUCCION DE AMINOACIDOS. PRODUCCION MICROBIANA.

En los últimos años han aparecido una gran cantidad de reportes sobre microorganismos sobreproductores de aminoácidos, incluyendo cepas silvestres, mutantes auxotróficas y mutantes resistentes a análogos. Esto fué posible como consecuencia del conocimiento sobre el metabolismo bacteriano (6), y la organización de la información genética (1); un gran número de mutantes hiperproductoras han sido diseñadas utilizando el principio de alterar genéticamente a la bacteria modificando o cancelando sus mecanismos de control.

De este modo, las bacterias carecen de los sistemas que evitan los dispendios de materia prima que representa producir aminoácidos u otros productos más allá de las necesidades del microorganismo.

1.2.1) MUTANTES AUXOTROFICAS.

Una de las estrategias para la obtención de mutantes hiperproductoras es el aislamiento de cepas auxotróficas para algún compuesto biosintéticamente relacionado. Este razonamiento es especialmente útil para la producción de aminoácidos, ya que algunos de ellos forman parte de familias con tronco biosintético común. Tal es el caso de los aminoácidos aromáticos y los de la familia del aspártico. Este mecanismo se basa en que, al bloquear

una de las ramificaciones biosintéticas, se carga el flujo de materia prima hacia uno de los productos finales. Esto es, al obtener auxotrofia a un aminoácido, el flujo de materia prima se canaliza hacia la producción de aquellos otros de la misma familia cuya síntesis no ha sido bloqueada.

Así mismo, la ausencia del producto no sintetizado deja de representar un factor de inhibición para la síntesis de los demás productos. En el caso de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico está reportado que mutantes auxotróficas de lisina sobreproducen homoserina. (6,10)

I.2.2) MUTANTES REGULATORIAS.

Una de las estrategias más importantes de la economía celular, es la acción de los mecanismos de regulación para evitar el gasto excesivo de materia prima, enzimas y energía. Dos son los mecanismos más importantes de regulación biosintéticas: la regulación a nivel enzimático o alostérica, y la regulación de la síntesis de las enzimas involucradas en la producción de los metabolitos.

En el primer caso, es común que la primera enzima de la vía sea una enzima compleja, la cual cuenta con un sitio alostérico para el reconocimiento del producto final de la vía, en presencia del cual se inhibe la actividad enzimática, evitando así la acumulación del producto final. (25)

Este esquema se vuelve mucho más complejo cuando la vía metabólica cuenta con ramificaciones, caso que se presenta en la síntesis de algunos aminoácidos. En estos casos se presenta en ciertos sistemas esquema de inhibición concertada, en que son dos o más los productos finales que actúan inhibiendo, en conjunto y

no por separado, a la primera enzima de la vía común. Tal caso se presenta en la síntesis de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico en ciertas bacterias. (1)

Se presentan casos en los que uno de los productos finales inhibe después de la ramificación, y el otro producto activa ese mismo sitio. (21)

La obtención de mutantes sobreproductoras implica, en este caso, la alteración del sitio alostérico de la enzima regulable, evitando así el reconocimiento del producto final. Para esto son utilizados una serie de análogos, normalmente tóxicos, que inhiben la síntesis del aminoácido, bloqueando la enzima regulable, sin que el producto normal realmente exista. El obtener mutantes resistentes a análogos implica que el sitio modificado no reconocerá al análogo ni al aminoácido regulador, acumulándose este último. Esta estrategia ha mostrado ser útil para la producción de gran variedad de compuestos(1). La tabla I contiene una lista de análogos utilizados para la obtención de mutantes hiperproductoras de aminoácidos.

El mecanismo de regulación genética, por su parte implica la represión de la síntesis de la maquinaria enzimática encargada de producir el aminoácido necesario. De este modo la presencia del producto final de la vía forma un complejo con la proteína represora, el cual es reconocido por el sitio operador, evitándose así la expresión de los genes involucrados en la vía biosintética. Al desaparecer el producto, el complejo no es formado y los genes se expresan libremente, este es el mecanismo más simple ya que existen muchas variantes del mismo.

Si se lleva a cabo una mutación en el gene regulador, de tal modo que la proteína resulte modificada o no se produzca, el complejo no se formará o no será funcional, de tal forma que el sitio operador quede libre, aún en presencia del producto. Del mismo modo si se bloquea selectivamente el sitio operador, el complejo represor no será capaz de evitar la expresión de los genes estructurales.

Este tipo de mutantes pueden ser seleccionadas por una estrategia similar a la señalada anteriormente, usando análogos tóxicos: una mutación como las arriba mencionadas darán como resultado resistencia al efecto tóxico, así como pérdida del reconocimiento por el represor natural, dando como consecuencia su hiperproducción. (25)

TABLA I: Análogos tóxicos de aminoácidos utilizados en la obtención de mutantes regulatorias. (3)

Aminoácido producido	Análogo utilizado
Arginina	Canavanina
Fenilalanina	Beta-tienilalanina
Histidina	Tiazolalanina
Leucina	Trifluoroleucina
Lisina	2-Aminoetilcisteína
Metionina	Etionina, Norleucina
Treonina	Beta-hidroxinorvalina
Triptofano	5-Metilriptofano
Valina	Alfa-aminobutirato

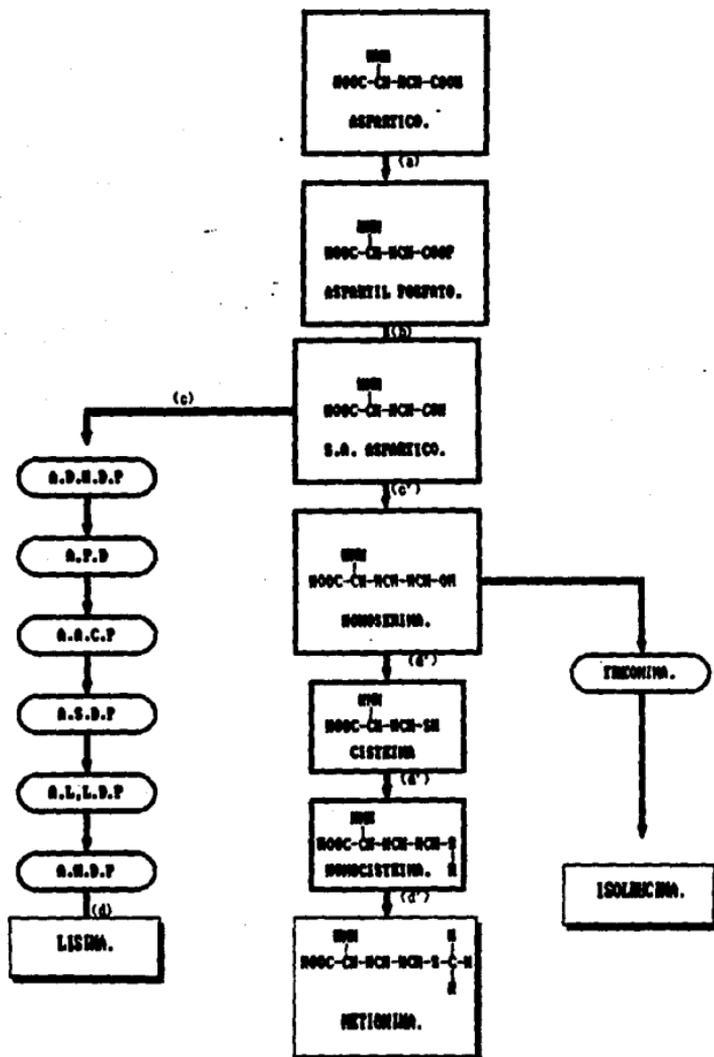
I.3) VIA DE SINTESIS DE LISINA Y METIONINA. REGULACION Y MUTACION.

Las vías metabólicas de lisina y metionina en bacterias cuentan con un tronco común (figura 1). Esto presenta la ventaja de que, al alterar adecuadamente los mecanismos regulatorios en los primeros pasos el beneficio en la producción será para ambos productos.

El primer paso de la vía es la formación de aspartil-fosfato por medio de una fosforilación por ATP de L-aspartico (a) y esta reacción es catalizada por la aspartocinasa, es el paso limitante de las vías (6,12). Esta enzima que cataliza la primera reacción irreversible, esta sujeta a regulación alostérica. En el caso de E. coli (figura 2) y otras bacterias se presentan tres isoenzimas diferentes, con tres patrones de regulación, dependientes cada una de uno de los tres productos finales que originan: la aspartocinasa I es inhibida por treonina mas isoleucina y reprimida por el primero de ellos, esta enzima contiene además la actividad de homoserina deshidrogenasa; la aspartocinasa II es reprimida por metionina y contiene igualmente actividad de homoserina deshidrogenasa; por último, la aspartocinasa III es inhibida y reprimida por lisina. Las tres enzimas son además inhibidas por semialdehido aspártico, y las isoformas I y III son estimuladas por metionina. (12)

Por otro lado, en diversas especies de Corynebacterium, Brevibacterium, y Pseudomonas (figura 2a) se presenta una sola enzima, la cual se ha demostrado, esta sujeta a inhibición concertada por lisina más treonina, y ambos aminoácidos por separado tiene un ligero efecto inhibitorio. Se habla de

FIG. 1 VÍA BIOSINTÉTICA DE LOS AMINOÁCIDOS DE LA FAMILIA DEL ASPARTATO EN BACTERIAS.



aspartocinasas "perfectas" cuando la inhibición por ambos productos a concentración de 1 mM cada uno es mayor al 80%, y concentraciones de 10 mM de los aminoácidos por separado inhiben de un 10 a un 15%. (10)

El aspartil-fosfato es reducido por NADPH bajo la acción de aspártico semialdehído deshidrogenasa para obtener semialdehído aspártico (b). Para la enzima que cataliza esta reacción no se ha reportado ningún efecto inhibitorio debido a alguno de los productos finales.

El semialdehído aspártico es un punto de ramificación donde la ruta biosintética de lisina diverge de la secuencia principal.

Siguiendo la vía de síntesis de lisina, el semialdehído aspártico es condensado con piruvato con lo que se obtiene ácido dihidrodipicolínico (c). La enzima que cataliza esta reacción (dihidrodipicolínico sintetasa) es inhibida por lisina, tanto en E. coli como en Pseudomonas (5). Así mismo, existe una enzima que cataliza el paso final de la vía de síntesis de lisina, el cual permite la transformación de diaminopimelato en lisina (d).

Existen algunos reportes de que esta enzima es activada por diaminopimelato e inhibida por lisina. En algunas bacterias existen también mecanismos de degradación de lisina: una lisina descarboxilasa muy activa, como en E. coli; o una lisina oxidasa como en Pseudomona putida.

Por otra parte, en la vía de síntesis de metionina, el siguiente paso importante lo constituye la transformación de semialdehído aspártico a homoserina, donde esta reacción es catalizada, en el caso de E. coli, por dos diferentes homoserina deshidrogenasas (c'): homoserina deshidrogenasa I (MDH I) su

actividad es inhibida por treonina y su síntesis es reprimida por treonina más isoleucina; homoserina deshidrogenasa II (HDH II) que es reprimida por metionina.

En el caso de metionina, la última etapa de síntesis (d') lo constituyen los genes que codifican para los pasos biosintéticos posteriores a la segunda ramificación (figura 2 y 2a) se encuentran, en E. coli, formando un operón regulado por el producto del gene metJ. En Pseudomonas existe también regulación transcripcional, aunque no se ha identificado el mecanismo.

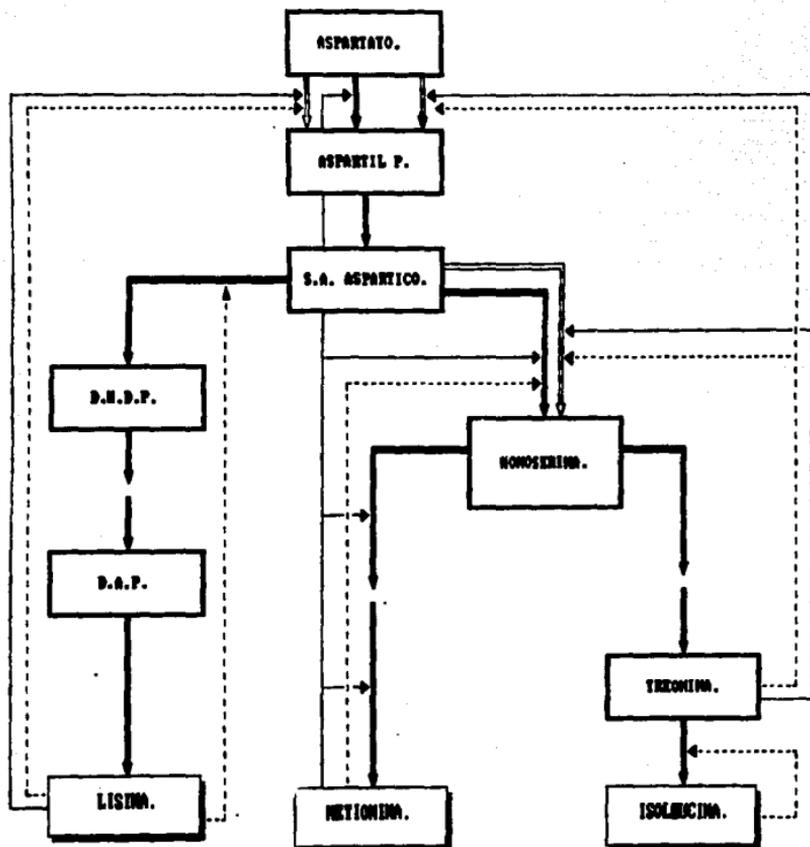
I.4) EFICIENCIA.

Dentro de los parámetros cuantitativos más importantes que existen en la industria de la producción de aminoácidos está el rendimiento del producto en base a sustrato, que se define como la cantidad de producto obtenida por unidad de sustrato empleada (generalmente de azúcar). Actualmente la eficiencia comercial para la producción de lisina por fermentación es cercana a 0.3; mientras que para metionina es menor a 0.05, también por esta vía, solo que en este caso no es comercial. (17)

Los esfuerzos en diferentes grupos de investigación están encaminados a incrementar este valor, tanto con procesos más eficientes como con cepas de más alta producción.

Otro parámetro importante es la productividad relativa del proceso, lo que nos indica la cantidad de producto obtenido por cantidad de biomasa. Ya que el proceso implica necesariamente la producción de células, es necesario estimular su crecimiento durante cierta etapa del proceso, e inhibirlo en otra para evitar que el sustrato se dirija solamente a la producción de biomasa.

FIG.2.MECANISMO DE REGULACION DE LA VIA DE SINTESIS DE LISINA Y METIONINA.

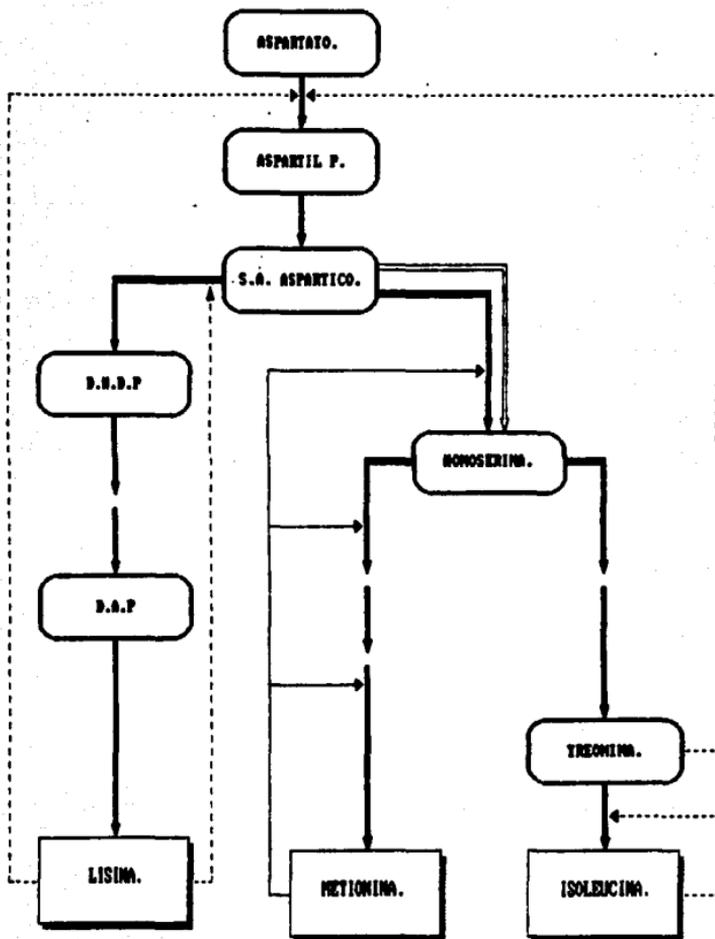


E. coli.

Regulacion por retroalimentacion ----->

Regulacion genetica ----->

FIG.2a MECANISMO DE REGULACION DE LA VIA DE SINTESIS DE LISINA Y METIONINA.



Psuedomonas.
Corynebacterium.
Brevibacterium.

-----> Regulacion por retroalimentacion.
 —————> Regulacion genetica.

Por último, otro parámetro importante es la productividad volumétrica, que se define como la cantidad de producto obtenido por gramo de biomasa en un litro de caldo de cultivo. La optimización de este parámetro permite la utilización eficiente de la capacidad instalada de la planta productiva. (3)

I.5) CRECIMIENTO MICROBIANO Y SU RELACION CON EL AMBIENTE.

El crecimiento, que es caracterizado por un incremento en masa celular y/o número, ocurre sólo cuando se satisfacen ciertas condiciones físicas y químicas. Si bien un microorganismo depende de su medio ambiente en cuanto al suministro de las materias primas para las biosíntesis y de la energía, al mismo tiempo está sujeto a la acción de otros factores del medio ambiente y no todos ellos le son necesariamente beneficiosos. (13)

Las variables ambientales individuales, ejem. temperatura, presión parcial de oxígeno y concentración de nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno, sales, vitaminas) crean un ambiente que influyen en la actividad metabólica de las células.

El éxito en el desarrollo de procesos de fermentación es dependiente primero, de la obtención de cepas por selección y mutación; y segundo, la elucidación de el efecto de parámetros ambientales en el crecimiento celular y formación de productos. (22)

I.5.1) Efecto de la concentración de nutrientes.

En muchos casos, cuando la concentración de nutrientes se incrementa ocurre una inhibición por sustrato del crecimiento.

Durante la mayor parte de una fermentación el crecimiento es constante e independiente del cambio en la concentración de nutrientes. Sin embargo, la velocidad de crecimiento, semejante a

una velocidad de una reacción química, es una función de la concentración de químicos. Tales químicos, son en este caso, los nutrientes esenciales o sustratos para el crecimiento. La forma de la relación entre la velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato fué observada por Monod (9) que es igual a la cinética de saturación exhibida por adsorción monomolecular. Así, un modelo similar a la isoterma de adsorción monomolecular de Langmuir fué aplicada al crecimiento. Este modelo, el modelo de Monod, tiene la forma: $\mu = \mu_{\text{máx.}} (S / (K_s + S))$, donde μ es la velocidad de crecimiento, $\mu_{\text{máx.}}$ es la velocidad de crecimiento máxima, S es la concentración de sustrato y K_s es una constante igual a la concentración de sustrato cuando $\mu = 0.5 \mu_{\text{máx.}}$ (22)

El modelo de Monod es basado en observaciones empíricas pero es frecuentemente justificado por analogía con cinética enzimática de Michaelis-Menten. (23)

I.3.1.1) Efecto de la fuente de carbono.

Un adecuado suplemento de la fuente de carbono es crítico para el crecimiento óptimo y formación de producto. Todos los nutrientes tienen un límite de concentración, arriba de este se causa un decremento en la velocidad de crecimiento.

El incremento en la concentración causa una deshidratación parcial de la célula y el efecto es una reducción en la velocidad de crecimiento. Las bacterias son más sensibles a efectos osmóticos que las levaduras y los hongos.

En el caso de carbohidratos la inhibición por sustrato ocurre arriba de 50 g/l. Otras fuentes de carbono tienen efectos

más específicos en las células. Sustratos tales como fenol, tolueno o butanol extraen componentes celulares, igualmente dañan las membranas arriba de unos pocos g/l.

La concentración de la fuente de carbono también afecta la formación del producto. Cuando se tienen concentraciones bajas y se observa un incremento en la concentración de sustrato, este es favorable para la síntesis del producto. Sin embargo, muchos productos de fermentación de interés están sujetos a represión catabólica de fuente de carbono. De este modo, dicha fuente de carbono debe permanecer por debajo de valores críticos. (13)

1.5.1.2) Efecto de la fuente de nitrógeno.

Para que el microorganismo pueda sintetizar aminoácidos (y proteínas), nucleótidos y determinadas vitaminas, debe haber en el medio ambiente una fuente de nitrógeno utilizable. El átomo de nitrógeno existe en los compuestos naturales en varios grados de oxidación, desde +5 (como en el nitrato) hasta -3 (como en el ion amonio). Se ha comprobado la utilización por diversos microorganismos de compuestos inorgánicos que contienen el átomo de nitrógeno en cada uno de estos grados de oxidación, excepto en el estado +5. No es sorprendente que la forma preferida sea generalmente el ion amonio, ya que el átomo de nitrógeno se incorpora a los compuestos orgánicos en esta forma. (14)

Los microorganismos tienen la habilidad de desarrollarse a su velocidad de crecimiento máxima a muy pequeñas concentraciones de nitrógeno. En general, la concentración de compuestos de nitrógeno en el ambiente es bajo y como consecuencia de esto las células que pueden desarrollarse rápidamente en concentraciones bajas tienen una desventajas competitiva importante.

Mas, a menudo, los problemas de inhibición por sustrato se tiene de proveer también mucho nitrógeno. Amonio, arriba de 3 a 5 g/l causa a menudo inhibición.

Si un cultivo se inicia sin una fuente de carbono (un azúcar), en presencia de aminoácidos, el esqueleto de carbono de los aminoácidos es consumido y se acumula el amonio.

Si el nitrato es usado como fuente de nitrógeno, puede ser parcialmente reducido a nitrito el cual puede ser tóxico para la bacteria. De este modo, el efecto de una fuente de nitrógeno puede ser derivado tanto de sus productos metabólicos como de sus formas originales. (13)

1.5.1.3) Oxígeno.

Aunque casi todas las plantas y animales superiores dependen del suministro de oxígeno molecular no se puede decir lo mismo de los microorganismos.

A diferencia con lo que ocurre con los demás nutrientes, el oxígeno molecular es relativamente insoluble en agua, de manera que tiene que ser suministrado de forma continua a los microorganismos aerobios para que estos crezcan. Los microorganismos que crecen de modo aerobio en cultivos ordinarios en medio líquido, dependen de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, suplementado por la pequeña cantidad absorbida de la atmósfera durante la incubación. Esta cantidad de oxígeno es, de ordinario, insuficiente para satisfacer plenamente la demanda del microorganismo, el cual, por consiguiente, va estando en condiciones progresivamente anaerobias. La incidencia desfavorable de esta escasez de oxígeno sobre el crecimiento del

microorganismo aerobio en los cultivos ordinarios en medio líquido depende en cierta medida de la temperatura de incubación.

Como quiera que la solubilidad del oxígeno en el agua crece a medida que la temperatura disminuye, los organismos que se cultivan a temperaturas bajas no tendrán tan limitadas sus disponibilidades de oxígeno como los que se incuban a altas temperaturas. (14)

II) OBJETIVOS.

- 1) Obtención de una cepa mutante sobreproductora de metionina y lisina, a partir de una cepa transformante de E. coli productora de lisina.
- 2) Montaje de las técnicas de cuantificación de lisina y metionina.
- 3) Obtención de condiciones óptimas (fuente de carbono, nitrógeno y oxígeno) para el crecimiento y producción de lisina y metionina de la cepa obtenida.
- 4) Determinación de proteína total en las cepas productora y en la nativa.

III) MATERIALES Y METODOS.

III.1) Cepas bacterianas.

Escherichia coli QA1122 "Cepa transformante productora de lisina Et(r), Amp(r), Thr(-)"

Escherichia coli Q358 Met(-).

Escherichia coli Q358, (Cepa silvestre).

Las cepas son del cepario del laboratorio de biotecnología de la FES-C.

III.2) Productos químicos y biológicos.

a) Todos los aminoácidos (de la serie L, a menos que se especifique lo contrario), análogos y azúcares (de la serie D), adquiridos de Sigma Chemical Co St. Louis Mo. EUA.

b) Sales orgánicas, ácidos, bases y solventes son de J. T. Baker, México.

c) N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) fué adquirida de Aldrich Chemical, Millwauke WI, EUA.

d) Los componentes de los medios para crecimiento masivo son fabricados por Bioxon de México.

e) Medios de cultivo.

Para el crecimiento masivo de la cepa se utilizó el medio de Luria-Bertrani (18); para el crecimiento en medio mínimo se utilizó el medio de Robinson (concentración 10X, que contiene: 40g de fosfato de potasio monobásico, 25 g de sulfato de amonio, estos dos componentes se neutralizan con NaOH hasta obtener un pH de 7.2. Por otro lado, 1 g de sulfato de magnesio, 100 mg de sulfato férrico, 10 mg de sulfato cúprico, 10 mg de sulfato de manganeso son disueltos se agregan a la solución con pH amortiguado y posteriormente se afora a un litro con agua

destilada). La fuente de carbono se agrega posteriormente a concentración de 1%.

III.3) Obtención de mutantes resistentes a etionina.

En primera instancia es necesario conocer la susceptibilidad de la cepa QA1122 a etionina, que es un análogo tóxico de metionina, mediante una prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC). Esta prueba tiene como finalidad conocer la concentración a la cual el análogo es tóxico y se pueden obtener mutantes que sean resistentes a este reactivo.

Para realizar la mutación de la cepa se utilizó la técnica en medio sólido (11) que contiene medio mínimo de Robinson 1X más glucosa y análogo. Posteriormente se espatularon en dicho medio 0.1 ml de una suspensión bacteriana de un cultivo fresco de 18 a 24 hrs de la cepa QA1122 y en el centro de la caja se depositaron unos cristales de nitrosoguanidina. Después de esto, las cajas se incubaron a 37 C por un tiempo de 72 a 96 hrs, después de lo cual aparecieron en la periferia colonias mutantes, las cuales fueron aisladas en medio mínimo Robinson más glucosa, pero en este caso sin el análogo, y posteriormente se les evalúa la capacidad de producción de aminoácidos.

III.4) Evaluación de lisina y metionina excretadas al medio.

La evaluación de la capacidad de producción de lisina y metionina en las cepas mutantes, se llevó a cabo de la siguiente manera: las cepas fueron crecidas en medio mínimo con glucosa al 1% y rojo de fenol (de concentración 0.1%) como indicador en una proporción de 1:100, se incubó a la temperatura indicada y se neutraliza con NaOH hasta que el sustrato se haya agotado. Una

vez terminado el proceso, el cultivo así obtenido se centrifuga, la pastilla se elimina y el sobrenadante es esterilizado.

Para realizar la evaluación de metionina excretada al medio se utiliza la técnica de complementación auxotrófica (7), para lo cual se necesita una cepa que requiere metionina para crecer, y esta cepa es la Q358 met(-) que es una mutante de *E. coli*.

Cantidades variables del sobrenadante se añaden a un tubo de cultivo con medio mínimo más glucosa, inoculado con una cepa met(-) y se incuban a 37 C por 24 hrs y se determina el crecimiento del cultivo por medio de lecturas de turbiedad en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. La concentración de metionina se determina interpolando los valores de turbiedad en una curva patrón.

Para la evaluación de lisina, en el sobrenadante se determina su concentración por el método de Work (24), que utiliza ninhidrina en ácido acético, produciéndose un complejo colorido que absorbe cuantitativamente a 444 nm. La concentración de lisina se determina, al igual que en el caso de metionina, interpolando contra una curva patrón.

El montaje de las técnicas de cuantificación para cada uno de los aminoácidos se establecen, de acuerdo con lo descrito, en las tablas II y III mediante la construcción de curvas estándar para cada aminoácido.

TABLA II: Procedimiento empleado para obtener la curva estandar de metionina.

Tubos.	0	1	2	3	4	5	6
Suspensión de la cepa Met(-) (ul)	20	20	20	20	20	20	20
Glucosa 20%(ul)	50	50	50	50	50	50	50
Rob. 10X(ul)	100	100	100	100	100	100	100
Met. Std. 1aM(ul)	--	10	20	30	40	50	60
Agua dest. (ul)	830	820	810	800	790	780	770

ul: microlitros.

Los sobrenadantes a los cuales se les quiere determinar la concentración de metionina se preparan de la misma forma que para los de la curva estandar, solo que en lugar de metionina estandar se agrega un volumen determinado de sobrenadante.

Una vez preparados los tubos para la curva patrón y los sobrenadantes problemas, se incuban a 37 C durante 24hrs. y posteriormente se determina la turbiedad a 590nm y el problema se interpola en la curva patrón.(7)

TABLA III: Curva estandar de lisina.

Tubos.	0	1	2	3	4	5
Lisina std. conc.2mg/ml (ml)	--	0.031	0.062	0.125	0.25	0.5
Ninhidrina (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Acido acético(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

Los tubos se colocan en un baño de agua a 80 C durante 1 hr.

Al cabo de este tiempo se agrega a cada tubo ácido acético hasta completar un volumen de 5 ml en cada uno y se hacen las lecturas de estas mezclas en un espectrofotómetro a 444 nm.

Para determinar la cantidad de lisina en los sobrenadantes problema se sigue el mismo procedimiento, sólo se sustituye a la lisina estandar por el sobrenadante en un volumen determinado.

III.5) Determinación de las concentraciones óptimas de carbono nitrógeno y oxígeno para obtener un mejor rendimiento de producción.

Para determinar las concentraciones óptimas de carbono nitrógeno y oxígeno se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento del microorganismo.

En primera instancia, una cinética se realizó variando la cantidad de fuente de carbono (glucosa) en matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio de cultivo y con diferentes concentraciones de azúcar que iban desde el 1% hasta el 8% como a continuación se indica:

- 1) Robinson + Glucosa 1%
- 2) Robinson + Glucosa 2%
- 3) Robinson + Glucosa 1% + Glucosa 1%
- 4) Robinson + Glucosa 1% + Glucosa 2%
- 5) Robinson + Glucosa 2% + Glucosa 1%
- 6) Robinson + Glucosa 2% + Glucosa 2%
- 7) Robinson + Glucosa 2% + Glucosa 2% + Glucosa 2%
- 8) Robinson + Glucosa 2% + Glucosa 2% + Glucosa 2% + Glucosa 2%.

A cada uno de los matraces se le adicionó colorante rojo de fenol (en una proporción 1:100) como indicador para controlar el pH, neutralizando con NaOH.

Para iniciar la cinética, se agregó a los matraces la primera concentración de glucosa, se inocularon con un cultivo fresco de la cepa, se siguió el crecimiento determinando la D.O. a 590 nm tomando muestras de cada matraz a un determinado intervalo de tiempo y posteriormente se agregó las demás

cantidades de glucosa cuando ya no había una variación en la D.O., y así sucesivamente hasta que se adicionó toda el azúcar en cada caso. Además se evaluó la cantidad de lisina y metionina excretadas al medio al término de la cinética de crecimiento.

En este caso la cantidad de fuente de nitrógeno se mantuvo constante así como el volumen de medio de cultivo para que la cantidad de oxígeno administrada al medio se mantuviera constante.

Para obtener la concentración óptima de fuente de nitrógeno la cepa se creció en medio mínimo de Robinson, con diferentes cantidades de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, contenida en el medio mínimo, que fueron de 1.25 g/l, 2.5 g/l, 5.0 g/l y de 7.5 g/l y glucosa a concentración constante, al 2%, manteniendo invariable el volumen de medio de cultivo, es decir, con cantidad de oxígeno constante. Al igual que en el caso anterior, se tomaron lecturas a 590 nm a diferentes intervalos de tiempo y se determinó la cantidad de lisina y metionina excretadas al medio, y determinando así la concentración óptima de sulfato de amonio para obtener un medio de cultivo tal que permita el óptimo crecimiento del microorganismo y la producción de ambos aminoácidos.

Con lo que respecta al caso de variación en la cantidad de oxígeno suministrada al medio, sólo se varía el volumen de medio de cultivo para así obtener diferentes relaciones volumen de matraz/volumen de medio de cultivo (V_m/V_l).

Se trabajó con 4 relaciones con valores de 2.5 (es decir que el volumen del matraz es 2.5 veces mayor que el volumen de medio de cultivo); 5.0; 10.0 y 15.0, y en este caso la cantidad de

fuelle de carbono y de nitrógeno se mantuvieron constantes.

III.6) Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.

Para llevar a cabo la digestión se colocan 1 ml o 100 mg de muestra a un tubo que contiene 1.5 g de sulfato de sodio, 0.2 g de sulfato cúprico y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado; esto se coloca en el digestor hasta la aparición de un color verde-azulado, para posteriormente llevar a destilar para liberar el nitrógeno y valorar con HCl 0.1 N.

Un ml de HCl 0.1 N equivale a 1.4 mg de nitrógeno, y el % se obtiene de dividir entre el peso seco de la muestra y multiplicado por 100. El % de proteína es igual al porcentaje de nitrógeno por el factor de conversión que es de 6.25.

IV) RESULTADOS.

IV.1) Obtención de mutantes resistentes a etionina.

Para obtener mutantes de la cepa QA1122 resistentes a etionina, se llevó a cabo un ensayo de MIC, con lo cual se determinó que la concentración adecuada para obtener este tipo de mutantes fué de 36 mM de etionina. A la cepa así obtenida se le denominó QA1122F.

Los resultados de la sensibilidad a etionina se encuentran en la tabla IV.

IV.2) Cuantificación de lisina, por el método de Work; y de metionina por el método de complementación auxotrófica.

Con la metodología descrita en materiales y métodos, se elaboró una curva estandar para cada aminoácido y sobre ella se interpolaron los resultados de D.O. de los sobrenadantes problemas.

Las curvas estándar para cada aminoácido se encuentran en las figuras 3 y 4, para metionina y lisina respectivamente.

IV.3) Determinación de concentraciones óptimas de carbono, nitrógeno, y oxígeno.

Las curvas de cinéticas de crecimiento, variando la cantidad de fuente de carbono, fuente de nitrógeno y variación en el volúmen de medio de cultivo con respecto al volúmen de matraz, se resumen en las figuras 5a, 5b, 6 y 7 respectivamente.

En el caso de fuente de carbono las alimentaciones al medio de cultivo se dieron, cuando la D.O. del cultivo ya no aumentaba, tantas veces hasta completar la concentración de azúcar en cada caso.

Con lo que respecta al crecimiento, en las figuras 5a y 5b,

Tabla IV: Susceptibilidad de la cepa QA1122 a etionina.

Concentración de etionina (mM)	0	18	30	36	45
Crecimiento.	+++	++	+	-	-

+++ Crecimiento abundante.
++ Crecimiento moderado.
+ Poco crecimiento
- No hay crecimiento

CURVA ESTANDAR METIONINA

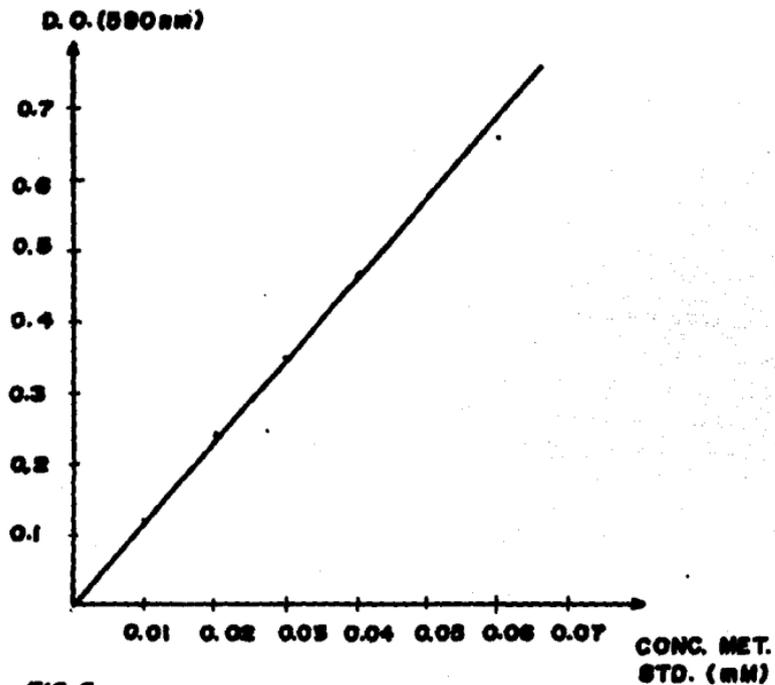


FIG. 3

CURVA ESTANDAR LISINA

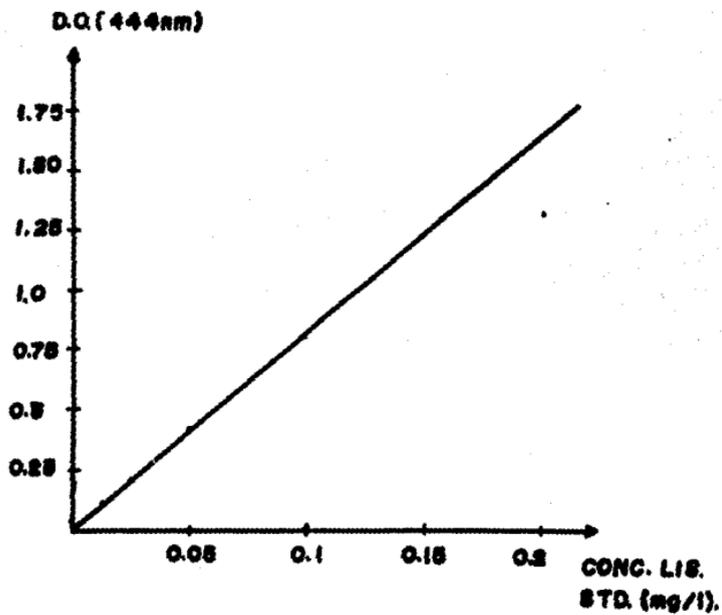


FIG. 4

se observa que la tendencia de este, es similar en todos los casos y que la variación en cuanto a la D.O. máxima obtenida es muy similar por lo que sería mas recomendable trabajar con concentraciones pequeñas de azúcar.

En cuanto a la cinética de crecimiento con cantidad de nitrógeno variable, en el medio mínimo de Robinson se tiene una concentración normal de 2.5 g/l de sulfato de amonio y, observando la figura 6, se nota que con cantidad disminuida de fuente de nitrógeno el crecimiento es menor que con nitrógeno normal en el medio de cultivo pero no para el caso de tener aumentada esta fuente ya que se observa que los crecimientos son similares y tienen la misma tendencia. Para este caso se tomaron en cuenta relaciones carbono/nitrógeno (C/N), a partir de considerar las diferentes cantidades de sulfato de amonio manteniendo constante la cantidad de glucosa (2%), con los siguientes valores:

Para 1.25 g/l de sulfato de amonio se tiene una relación C/N de 16; en el caso de 2.5 g/l la relación C/N es de 8; con 5 g/l dicha relación toma un valor de 4; mientras que para 7.5 g/l de sulfato de amonio en el medio la relación C/N es de 2.67.

En la figura 7 se observa que el variar la relación entre el volumen de medio de cultivo y el volumen del matraz si influye en el crecimiento ya que al aumentar el volumen de medio hay una disminución en el crecimiento del microorganismo.

Los resultados de producción y rendimiento de lisina y metionina obtenidos en cada caso de fuente de carbono, nitrógeno, y con diferentes volúmenes de medio de cultivo se encuentran enlistados en las tablas V, VI y VII respectivamente.

CINETICA DE CRECIMIENTO FUENTE DE CARBONO

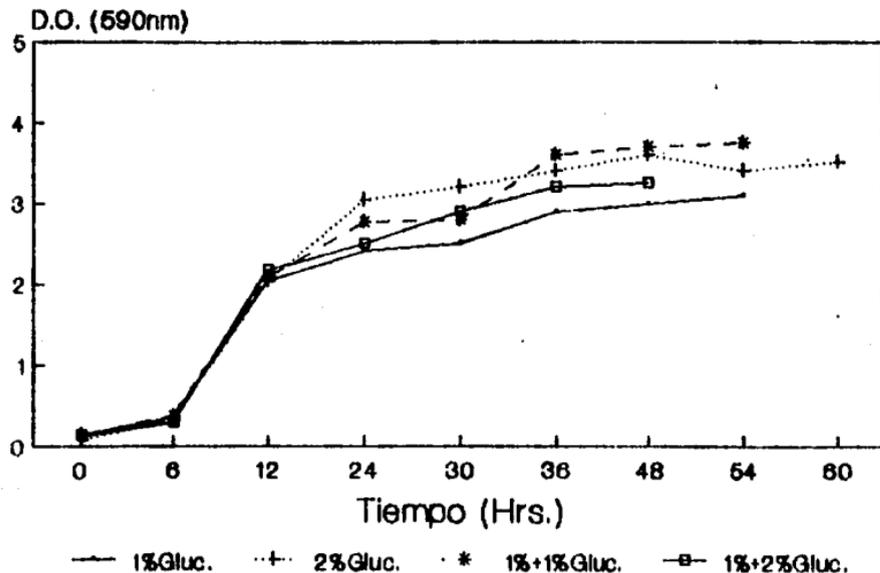


FIG. 5a

CINETICA DE CRECIMIENTO FUENTE DE CARBONO

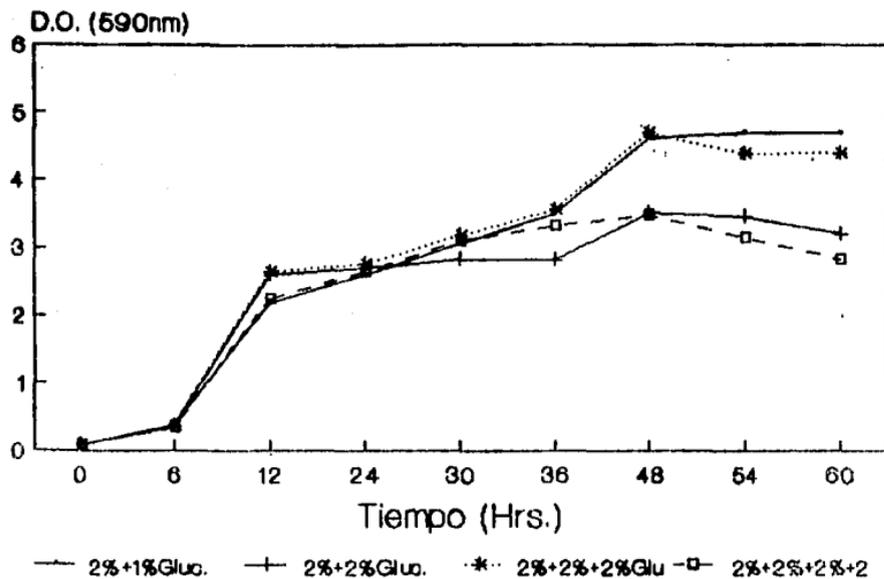


FIG. 5b

Tabla V: Producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F con diferentes condiciones de crecimiento.

Cantidades variables de fuente de carbono	Lisina (mg/l)	R* (%)	Metionina (mg/l)	R* (%)
Gluc.1%	359	3.59	56.84	0.567
Gluc.2%	341	1.7	104.52	0.523
Gluc.1%+1%	1087	5.43	128.47	0.64
Gluc.1%+2%	1105	3.68	165.8	0.55
Gluc.2%+1%	359.7	1.2	106.67	0.355
Gluc.2%+2%	453	1.13	110.16	0.27
Gluc.2%+2%+2%	397	0.66	125.40	0.21
Gluc.2%+2%+2%+2%	403	0.503	105.33	0.132

*El rendimiento se define como gramos de producto obtenido por gramo de sustrato utilizado (considerando que el sustrato se consume completamente), expresado en %.

CINETICA DE CRECIMIENTO FUENTE DE NITROGENO

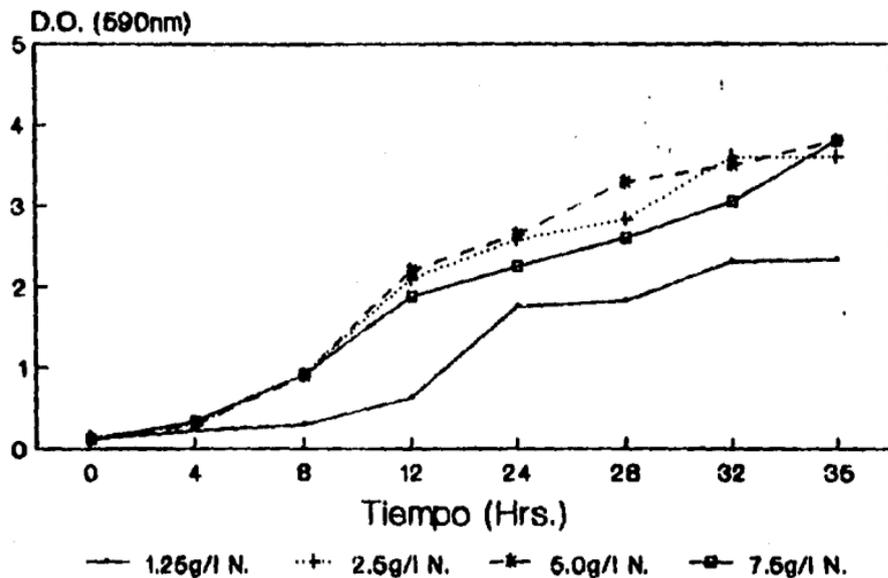


FIG. 6

Tabla VI: Producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F con diferentes cantidades de sulfato de amonio.

Concentración de sulfato de amonio (g/l)	Relación (C/N)	Lisina (mg/l)	R* (%)	Metionina (mg/l)	R* (%)
1.25	16	648.8	3.24	35.10	0.175
2.5	8	717.18	3.59	50.13	0.25
5.0	4	788.67	3.94	68.90	0.34
7.5	2.67	810.40	4.05	49.86	0.249

* El rendimiento está definido en la tabla V.

CINETICA DE CRECIMIENTO VOLUMEN DE MEDIO VARIABLE

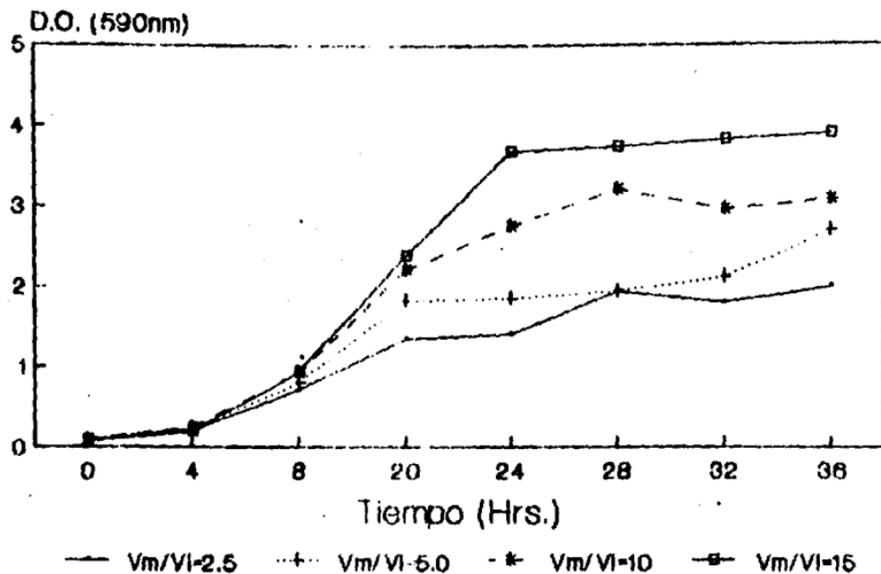


FIG. 7

Tabla VII: Producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F en diferentes volúmenes de medio de cultivo.

Relaciones volumen de matraz/volumen de medio.	Lisina (mg/l)	R* (%)	Metionina (mg/l)	R* (%)
2.5	294.16	1.47	69.96	0.349
5.0	415.75	2.07	70.00	0.35
10.0	528.47	2.6	74.35	0.37
15.0	537.34	2.68	67.00	0.335

* El rendimiento esta definido en la tabla V.

IV.4) Proteína total de la cepa QA1122F productora de lisina y metionina, y de la cepa silvestre de E. coli Q358.

La cuantificación de proteína total de ambas cepas se siguió por el método de Kjeldahl mencionado en materiales y métodos , y los resultados se dan a continuación:

CEPA	PROTEINA (%)
QA1122F	53.055
Q358	36.46

IV.5) Cinética de crecimiento y producción de la cepa QA1122F con concentraciones óptimas de nitrógeno, carbono y oxígeno.

Para determinar cuales son las producciones de lisina y metionina y el crecimiento bacteriano en las condiciones óptimas de nitrógeno, carbono y oxígeno se parte de observar, en cada caso, en que matraz se obtiene el mejor crecimiento además de la mayor producción de cada aminoácido.

De acuerdo a los resultados óptimos previamente obtenidos de las diversas cinéticas se realizó la que se especifica en la figura 8 que presenta la cinética de crecimiento de la cepa QA1122F y la cinética de producción de lisina y metionina en la figura 8a y 8b respectivamente.

Esta cinética se llevó a cabo con fuente de carbono (glucosa) a una concentración del 2%, repartida en dos porciones; sulfato de amonio (fuente de nitrógeno) a 5.0 g/l para obtener una relación C/N de 4.0 adecuada para el óptimo crecimiento y producción de lisina y metionina, además se trabajó con una relación volumen matraz/volumen de medio de cultivo de 5.0 que es con la cual se obtuvieron los mejores rendimientos de producción en cada caso.

CINETICA DE CRECIMIENTO CONDICIONES OPTIMAS

D.O. (590 nm)

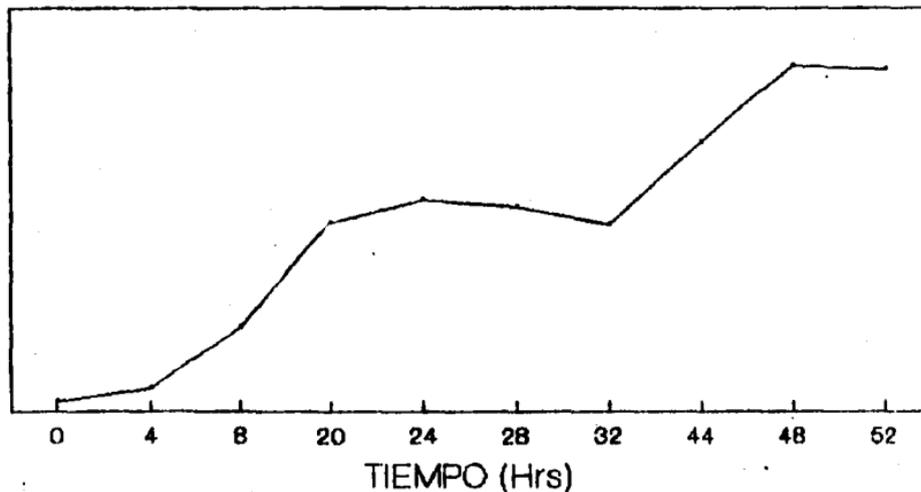


FIG. 8

CINETICA DE PRODUCCION DE LISINA COND. OPTIMAS

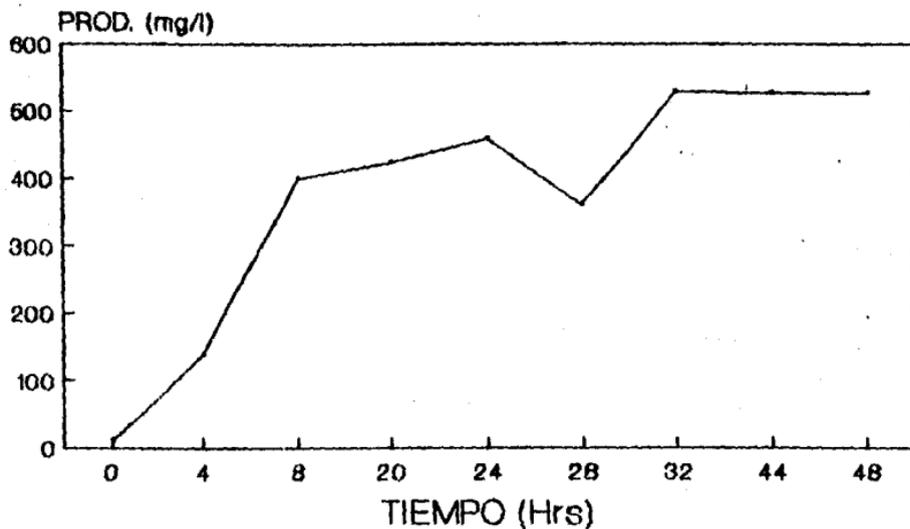


FIG. 8a

CINETICA DE PRODUCCION DE METIONINA COND. OPTIMAS

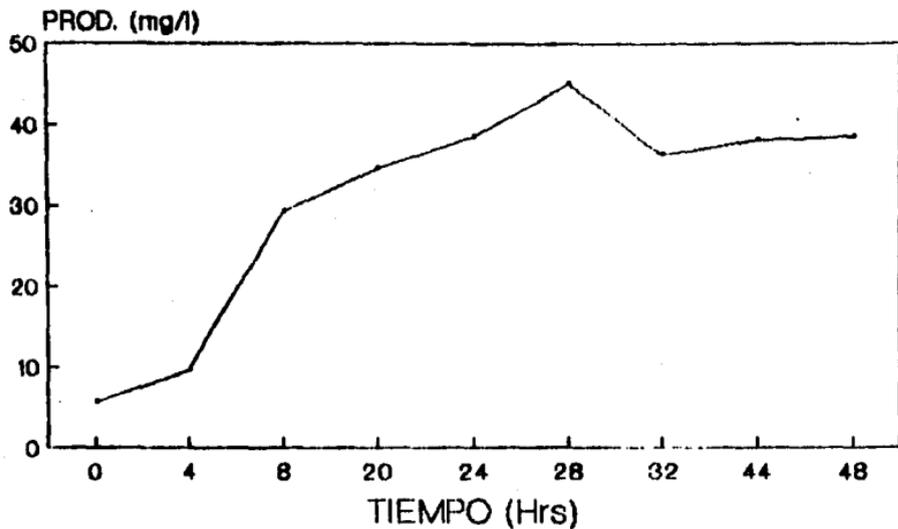


FIG. 8b

V) DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

Mediante la técnica de mutación se obtuvieron cepas etionina resistentes, de las cuales se seleccionaron 10 que se encontraban cerca del halo de inhibición que provoca la nitrosoguanidina. En estas cepas se ensayó la capacidad de producción de lisina y metionina, ya que no todas producían la misma cantidad de ambos aminoácidos. Así, se seleccionó sólo una que producía la mayor cantidad de los dos aminoácidos. La producción de la cepa seleccionada para este trabajo fué de 56.9 mg/l de metionina con un rendimiento de 0.285% y 339.7 mg/l de lisina con un rendimiento de 1.7985% bajo condiciones de crecimiento en medio mínimo de Robinson más 2% de glucosa.

La técnica de cuantificación de metionina por complementación auxotrófica es específica, aunque con el inconveniente de que sólo se mantiene una relación lineal hasta una concentración de 0.06 mM, ya que arriba de esta concentración el crecimiento de la cepa Q358 Met (-), ya no es proporcional a la cantidad de metionina presente. Además, esta técnica resulta ser una buena alternativa para evaluar otro tipo de aminoácidos, siempre y cuando se cuente con la cepa auxótrofa al producto de interés.

De la técnica de evaluación de lisina, la intensidad de color producida es proporcional a la concentración de aminoácido presente. pero, sólo dentro de cierto rango, es decir, ya no se encuentra una relación lineal por lo que sería conveniente llevar a cabo diluciones de los problemas tanto para esta técnica como para el caso de la evaluación de metionina. Esta técnica constituye la base de un método general para identificar otros

alfa-aminocidos, así como proteínas y péptidos que contengan dos grupos amino libres.

Analizando las cinéticas de crecimiento, con respecto a la de fuente de carbono (figura 5a y 5b) se puede observar que la adición de glucosa al medio, a determinados intervalos de tiempo, no favorece el crecimiento, ya que no hay una variación significativa en la D.O. máxima obtenida utilizando concentraciones pequeñas, así como concentraciones elevadas de azúcar en el medio. Esto podría estar dado porque la bacteria no asimile toda la fuente de carbono y, al agregar más al medio, podríamos estar saturando a la bacteria, por lo que se ve inhibido el crecimiento. En cuanto a la producción de metionina, esta tampoco se ve muy favorecida por la adición de glucosa, ya que no se observa una diferencia clara en la producción, al utilizar cantidades elevadas de glucosa. Caso contrario sucede cuando la alimentación al medio se lleva a cabo con concentraciones pequeñas de fuente de carbono ya que, utilizando 1% de esta fuente, se obtiene una producción de 56.84 mg/l y, que con un 2% la producción se ve incrementada casi al doble esto es porque tiene el doble de cantidad de carbono, además esta producción se ve todavía aumentada cuando el 2% de azúcar es dividido en dos porciones con lo cual el rendimiento de producción se mejora.

El mismo caso se presenta para la producción de lisina, que con azúcar en pequeñas concentraciones y que además es repartida en varias porciones, se obtiene la mayor producción y el mejor rendimiento. Quizá esto sea debido a que la bacteria utilice

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

adecuadamente la fuente de carbono al tener poca cantidad y que pueda aprovechar al máximo para obtener así la mejor producción de los aminoácidos lisina y metionina, además de la mejor cinética de crecimiento. Esto nos da pauta para concluir que las alimentaciones con fuente de carbono al medio de cultivo son una buena alternativa para mejorar la producción del metabolito de interés y que estas alimentaciones sean utilizando concentraciones pequeñas de azúcar y así obtener también mejores rendimientos de producción, y el mejor crecimiento del microorganismo.

Con lo que respecta a la cinética de crecimiento y producción donde se varía la la cantidad de nitrógeno, en el medio mínimo de Robinson se tiene sulfato de amonio en concentración de 2.5 g/l y en la gráfica se observa que al tener disminuida esta concentración, el crecimiento es menor con respecto a aquel con cantidad de fuente de nitrógeno normal contenido en el medio y que, con cantidad de sulfato de amonio aumentada el crecimiento es similar al que se tiene en el caso de fuente de nitrógeno normal en el medio de cultivo. Además, se sabe que al aumentar la cantidad de nitrógeno se ve favorecida la producción de los aminoácidos y disminuido el crecimiento.

La producción de lisina aumenta con cada incremento de la cantidad de nitrógeno y sucede lo mismo para el caso de producción de metionina, sólo que utilizando 7.5 g/l de sulfato de amonio la producción para el segundo aminoácido disminuye.

Esto podría explicarse porque lisina tiene en su estructura dos grupos amino y metionina sólo 1, por lo que la mayor cantidad de nitrógeno sea canalizada hacia la producción de lisina ya que

metionina requiere de menos nitrógeno, por eso la disminución en la producción de metionina en el último caso y lisina sigue aumentando su producción aunque el crecimiento no sea favorecido con el incremento de sulfato de amonio al medio. Otra explicación es que el nitrógeno para la producción de metionina esté en exceso por lo cual la producción en último caso de fuente de nitrógeno se vea disminuida.

Al aumentar la cantidad de la fuente de nitrógeno y mantener constante la fuente de carbono, la relación C/N va disminuyendo y al disminuir esta, la producción de los aminoácidos se ve favorecida pero en el caso de metionina la producción máxima se obtiene en un valor de C/N de 4, y para lisina esta producción máxima se obtiene con una relación C/N de 2.67.

Con lo que respecta a la cinética de crecimiento y producción donde se varía el oxígeno, variar el volumen de medio de cultivo en matraces de 500 ml, es una buena opción para aumentar la cantidad de oxígeno administrado al medio, ya que el crecimiento se ve favorecido y la producción también, pero el inconveniente es que, mientras mayor sea la relación volumen de matraz/volumen de medio, el volumen del medio de cultivo será cada vez menor por lo que no sería apropiado el tener poco medio de cultivo en un matraz cuya capacidad es mayor a la que se está trabajando. Una alternativa para tratar de tener el máximo volumen de medio de cultivo posible es llevar a cabo cinéticas de crecimiento en un fermentador, ya que aquí el suministro de oxígeno es continuo y el volumen de medio de cultivo se mantiene constante.

Revisando los resultados de producción y crecimiento de las diferentes cinéticas podemos decir que:

a) Es más recomendable trabajar con cantidades pequeñas de glucosa (por ejemplo 2% y que este porcentaje se divida en dos partes, es decir, iniciar la cinética con fuente de carbono al 1% y agregar el 1% restante, cuando la D.O. del cultivo no varíe), dado que elevadas cantidades de la misma no aseguran una gran producción de los metabolitos de interés y con menores cantidades podemos obtener los mismos niveles de producción que, incluso, podrían ser un poco más altos y así mejorar el rendimiento de producción.

b) La relación Carbono/Nitrógeno más apropiada para optimizar el proceso es de 4, procurando tener una cantidad de 5.0 g/l de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno y glucosa en una concentración tal que no varíe esta relación. Esto porque hay que tratar de mantener una relación C/N que sea adecuada para el microorganismo ya que, de acuerdo a los porcentajes de carbono y nitrógeno celulares se tiene aproximadamente una relación de 5, pero además hay que considerar también la relación C/N tanto de lisina como de metionina los cuales tienen un valor de 3 y de 5 respectivamente es por esto que se toma un valor intermedio de C/N para tratar de proveer la cantidad suficiente de cada fuente al microorganismo para que tenga un crecimiento el cual permita que la producción de los aminoácidos sea la mayor posible y así tener los mejores rendimientos de producción.

c) El valor de la relación V_m/V_{mc} más recomendable para la mejor producción y crecimiento es de 10.0, ya que con estas condiciones se tiene un incremento en la producción de metionina

así como para lisina, pero se encuentra el inconveniente de trabajar con matraces de elevado volumen con respecto al volumen de medio de cultivo por lo que se considera que el trabajar con una relación V_m/v_{mc} de 5.0 ya que la producción y el crecimiento obtenidos no disminuye considerablemente.

d) Se puede establecer una cinética de crecimiento y de producción, conjuntando estos resultados y determinar si realmente estas son las condiciones ideales para una buena producción de los dos aminoácidos, como consecuencia de un crecimiento adecuado al utilizar un medio de cultivo óptimo.

Con los anteriores resultados, si en un medio mínimo como lo es el Robinson se hace crecer un microorganismo, la proporción del crecimiento está limitado por la concentración de los nutrientes en el medio de cultivo. Esto es, que un nutriente componente del medio de cultivo en exceso no necesariamente favorecerá el crecimiento sino que al contrario puede inhibirlo pero los rendimientos de producción no son proporcionales a el aumento en la concentración de este componente en particular, o de varios, es decir, que hay que tomar en cuenta la cantidad de cada componente en un medio ya que puede ser que el microorganismo no asimile todos los nutrientes o que no los consuma todos en la misma proporción.

Analizando la cinética de crecimiento y producción de lisina y metionina de la cepa QA1122F con condiciones óptimas de carbono, nitrógeno y oxígeno, se observa que al aumentar el crecimiento la producción también se ve incrementada, pero la cantidad de lisina y metionina máxima excretada al medio de

cultivo en este caso, es un poco menor al igual que el crecimiento. Esto podría estar dado por que las condiciones que se están trabajando no sean las adecuadas en conjunto para el óptimo crecimiento y producción de lisina y metionina, porque cada condición es óptima para un aminoácido o para otro o simplemente para el crecimiento, ya que la mayor producción y rendimiento de lisina con fuente de nitrógeno variable se obtiene con 7.5g/l de sulfato de amonio, mientras que para metionina es con 5.0g/l, y el crecimiento es similar con cualquiera de estas dos concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo. Por otra parte, con diferentes volúmenes de medio de cultivo el crecimiento es mayor con una relación V_m/V_{mc} de 15, y lisina tiene su producción máxima también en esta relación pero con un valor de esta relación de 10 la producción es casi la misma que con 15, mientras que para metionina la mayor producción se obtiene con una valor de V_m/V_{mc} de 10 con el inconveniente que el volumen de medio es muy pequeño, por lo que se utiliza una relación de 5.0.

Con respecto de la concentración de proteínas celulares, podemos observar que el porcentaje de estas es mayor en la cepa transformante de E. coli sobreproductora de lisina y metionina que en la cepa silvestre (E. coli. Q358). Esto podría estar dado, por que en la cepa que produce los dos aminoácidos, probablemente el microorganismo no esté excretando al medio la totalidad de los metabolitos que está produciendo, sino que en el interior del mismo haya una buena cantidad de estos, incrementándose así la cantidad de nitrógeno celular. El que el microorganismo no excrete la totalidad de los aminoácidos al medio de cultivo puede

estar dado por la permeabilidad que presenta la membrana del mismo por lo cual se obtiene un mayor porcentaje de nitrógeno en la célula. Otra opción puede ser que al tener una cierta concentración de aminoácidos dentro de la célula se empiece a dar un gradiente de concentración y que los metabolitos sean excretados al medio de cultivo hasta que se equilibre la cantidad de lisina y metionina tanto dentro como fuera de la célula.

Esto sugiere el utilizar la biomasa como una fuente alternativa de complemento alimenticio, por lo rica que es en nitrógeno, y por los metabolitos que el microorganismo no excreta al medio de cultivo.

Será necesario llevar a cabo cinéticas de crecimiento a nivel fermentador para tratar de incrementar la producción de lisina y metionina y ver si podría ser utilizada esta cepa a nivel industrial.

VI) REFERENCIAS.

- 1) ABE, S. and TAKAYAMA, K. (1972). Mutants and their utilization, in: The microbial production of aminoacids (Yamada, et al, Eds.) Kodansha LTD, Tokyo.
- 2) ALBANESE, A. M. and ORTO, L. A. (1963). "Proteins and Aminoacids". in: Newer Methods of Nutritional Biochemistry. (A. M. Albanese, Ed.) Academic Press, New York.
- 3) ALVAREZ de la Cuadra J. J. (1987) Obtención de cepas transformantes sobreproductoras de lisina y metionina. Tesis Doctoral.
- 4) CARDENAS, R. (1987). Curso de Biotecnología, Folleto para la Facultad de Ciencias, UNAM. S/P.
- 5) COHEN, G.N.; STANIER, R.Y. and LEE Bras, G. (1969). J. of Bact. 99, 791-801.
- 6) DATTA, P.; DUGAN, S.M. and FEDELBERG, R.S. (1973). Regulation of Aminoacids Biosynthesis of the Aspartate Pathway in Different Microorganisms, in: Genetics of Industrial Microorganisms. Vol. 1 (Vanek, Hos Talek and Cudlin, Eds.) Elsevier, Amsterdam.
- 7) GODINEZ, D. (1989). Obtención de cepas mutantes de B. subtilis sobreproductoras de metionina. Tesis de licenciatura. FES-CUAUTITLAN.
- 8) LEHNINGER, Albert L. (1970) Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function. WORTH PUBLISHERS, INC..
- 9) MONGU, J. (1950). Ann. Inst. Pasteur. 17, 390.
- 10) NAKAYAMA, K. (1972). Lysine and Diaminopimelic Acid. Op cit. Yamada et al.

- 23) WILLIS, G.M. and BAKER, D.H. (1981). J. Nutr. 111, 1157-1163.
- 24) WORK, E. (1957). Biochem. J. 67, 416-428.
- 25) YATES, R. A. and PARDEE, A. B. (1957). J. Biol. Chem. 227, 577-687.