

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE LOS ALIMENTOS**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)**

**OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCION DE LISINA EN MATRAZ AGITADO**

T E S I S

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA:

Q. EN A. JOSE ANTONIO ALCANTAR GARDUÑO

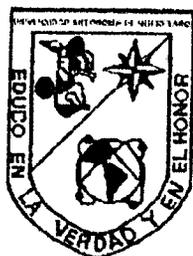
SANTIAGO DE QUERETARO, QRO. SEPTIEMBRE DEL 2000

No Adq. H63892

No. Título IS

Clas. 547.29

A3470



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE LOS ALIMENTOS**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPUBLICA (PROPAC)**

**OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCION DE LISINA EN MATRAZ AGITADO**

T E S I S

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA:

Q. EN A. JOSE ANTONIO ALCANTAR GARDUÑO

SANTIAGO DE QUERETARO, QRO. SEPTIEMBRE DEL 2000

No Adq. H63892
No. Título TS
Clas. 547.29
A3470

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL
INSTITUTO TECNOLOGICO DE CELAYA, EN EL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA Y
BIOINGENIERIA, BAJO LA DIRECCION DEL
DR. ELEAZAR MAXIMO ESCAMILLA SILVA.**

RESUMEN

La deficiencia de aminoácidos (Aa) esenciales en los cereales ha propiciado la implementación de diversos estudios sobre la producción de éstos mediante síntesis química y microbiológica. Algunas cepas bacterianas productoras de lisina han sido modificadas genéticamente con la finalidad de que sobreproduzcan este Aa. La lisina es económicamente uno de los Aa más importantes desde el punto de vista económico. En la actualidad se producen grandes cantidades de lisina utilizando mutantes auxótrofos de *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium lactofermentum*. Diversos procesos de fermentación han sido desarrollados para la producción de más de 20 Aa, pero éstos son limitados dado el elevado costo de los procesos de fermentación y la carencia de estudios que exploren otras alternativas de producción. En el presente trabajo se diseñaron algunos medios de cultivo que permitieran la producción de lisina en matraz agitado, empleando la cepa bacteriana de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21253. En el medio de cultivo a estudiar se utilizó a la glucosa como fuente de carbono y 11 diferentes ingredientes en diferentes cantidades reportados en la literatura, por lo cual se planteó un arreglo ortogonal altamente fraccionado para 13 factores en 3 niveles [$AO_{27} (3^{13})$]. Para estudiar el efecto de las diferentes concentraciones de cada uno de los ingredientes sobre la producción de lisina en los diferentes medios se realizaron 27 tratamientos. Los medios de cultivo diseñados se sembraron con un 5% de inóculo con 10 horas de incubación. El inóculo se desarrolló en un medio de composición diferente a los diseñados. Las fermentaciones se realizaron a 30 °C y 200 r.p.m. de agitación durante 48 horas. La variable respuesta fue la lisina, la cual se cuantificó por HPLC derivatizando la muestra con OPA mediante un procedimiento desarrollado en el laboratorio. Paralelamente se determinaron las concentraciones de glucosa y biomasa mediante técnicas espectrofotométricas. Los resultados obtenidos indicaron que la mayor concentración de lisina fue de 595 mg/L, alcanzándose ésta a las 48 horas. Sin embargo, en otros experimentos la máxima producción de lisina se obtuvo a las 6 horas. Después de este tiempo de fermentación, la producción de lisina fue menor debido al efecto del pH.

(Palabras clave: lisina, *Corynebacterium glutamicum*, aminoácido).

SUMMARY

The essential aminoacids deficiency (Aa) in the cereals has sponsored the implementation of various studies on the production of these through chemical synthesis and microbiological process. Some strains of bacteria, lysine producer have been modified genetically in order to over produce this Aa. The lysine is economically one of the Aa most important from the economic point of view. At present they are produced large quantities of lysine using mutant auxotrophos of *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium lactofermentum*. Some fermentation processes have been developed for the production of more than 20 Aa, but these are limited by the high cost of the fermentation processes and is important to explorer other alternative of production. In the present work were designed some culture media that permitted the production of lysine in shake flask, employing strain of *Corynebacterium glutamicum* ATCC21253. The glucose was used as carbon source and 11 ingredients more reported in the literature. An ortogonal experimental design [AO₂₇ (3¹³)] was used. To study effect of the different concentration of each one on the ingredients on the production of lysine in the different means were accomplished 27 treatments. The culture media designed were cultivated with a 5% of inoculum with 10 h of inoculation. The inoculum was developed in a mean of different composition from the designed. The fermentation were accomplished to 30 °C and 200 rpm of agitation speed during 48 h. Variable response was the lysine, the one which quantified by HPLC, derivating to the sample with OPA through a procedure developed in the our Labotatory. Parallely they were determined the glucose and biomass concentrations through spectrophotometric method. Results indicated that the greatest concentration of lysine was 59.5 mg/L being reached this at 48 h. However, in the other experiments the maximum production of lysine was obtained at 6 h. After this time of fermentation, the production of lysine was less due at effect of pH.

(Key words: lysine, *Corynebacterium glutamicum*, aminoacid).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios la oportunidad de vivir y de ver realizada una meta más en mi formación profesional. A tí Dios te dedico este trabajo.

Papá y Mamá, este trabajo también es de ustedes. En él se encuentra gran parte de sus logros que un día desearon y soñaron ver realizados en mí. Gracias por todo el apoyo incondicional y por el cariño que me brindaron durante toda mi formación como profesionista. Los quiero mucho.

Conchita. Gracias por tu ayuda incondicional que siempre me brindaste, por todo tu apoyo y por los grandes logros que juntos hemos compartido. Gracias por brindarme tu apoyo en aquellos momentos en los que todo parecía difícil. Saber que cuento con tu cariño y tu amistad es maravilloso para mí. TQM.

A todos mis hermanos les expreso mi más sincero agradecimiento. Cada uno de ustedes tiene una parte muy importante impresa en este trabajo, gracias por depositar su confianza y por creer en "el flaco". De todos ustedes he recibido un gran apoyo, espero que el verme titulado les llene de alegría tanto como a mí.

Tía Elena le estoy muy agradecido por toda la ayuda y el apoyo que he recibido de usted. Gracias por todos sus consejos y por los ánimos que siempre me dio. Es usted una maestra muy especial en enseñar "clases de la vida", solo espero ser su mejor alumno.

Dr. Eleazar M. Escamilla Silva le expreso mi agradecimiento por otorgarme la oportunidad de trabajar con usted y por compartir sus conocimientos para la realización de este trabajo.

M. en C. Jorge Domínguez D. gracias por su valiosa aportación en el diseño y en el análisis estadístico de los experimentos realizados en este trabajo de tesis.

Dr. Ramón A. Martínez Peniche gracias por sus observaciones y correcciones sugeridas para la mejor redacción del presente trabajo.

M. en C. Jorge Alvarez D. le agradezco el apoyo y la confianza que me brindó durante mis estudios de maestría, así como sus observaciones para el mejoramiento de este trabajo.

Dr. Carlos Regalado G. gracias por sus observaciones y sugerencias que contribuyeron para mejorar el contenido de este escrito de tesis.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, especialmente a la Facultad de Química y a su Posgrado, así como a todo el personal que laboró durante mi estancia en esta institución le expreso mis más sinceros agradecimientos por todos los servicios brindados en la realización de la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología le agradezco el haberme otorgado la beca que permitió la realización de mis estudios de maestría.

Le expreso mi agradecimiento a todas las personas que formaron parte del Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya por permitirme el acceso incondicional a sus instalaciones y equipo.

INDICE GENERAL

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Indice General	vi
Indice de Tablas	vii
Indice de Figuras	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. La lisina	3
2.2. Producción de lisina	4
2.3. Biosíntesis de lisina	5
2.4. Producción de lisina mediante métodos microbiológicos	8
2.5. Producción de lisina con cepas mejoradas	10
2.6. Regulación de la síntesis de lisina	12
2.7. Descripción de la cepa bacteriana	14
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. Materiales y métodos	16
4.1. Materiales	16
4.1.1 Material biológico	16
4.1.2. Material y equipo	16
4.1.3. Substancias	17
4.1.4. Soluciones	17
4.2. Métodos	18
4.2.1. Determinación de biomasa	22
4.2.2. Determinación de azúcares reductores	22
4.2.3. Determinación de lisina	23
5. Resultados y discusión	26
6. Conclusiones	70
7. Perspectivas	72
8. Bibliografía	73
9. Apéndice A	77
10. Apéndice B	81
11. Apéndice C	94

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Auxótrofos de <i>Corynebacterium glutamicum</i> productores de lisina	12
Tabla 2. Factores considerados para el diseño experimental y valores de cada uno de los tres niveles estudiados	20
Tabla 3. Diseño experimental desarrollado para el estudio de los 13 factores con sus respectivos niveles, AO₂₇(3¹³)	21
Tabla 4. Tabla de valores de absorbancia y concentración de biomasa para la curva de calibración biomasa-absorbancia	26
Tabla 5. Concentración de biomasa en g/L de los 27 tratamientos a diferentes tiempos de fermentación	28
Tabla 6. Concentración de glucosa en g/L de los 27 tratamientos a diferentes tiempos de fermentación	30
Tabla 7. Concentraciones de lisina en mg/L de los 27 tratamientos realizados a diferentes tiempos de fermentación	33

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura química de la lisina	3
Figura 2. Ruta biosintética de la lisina en bacterias	7
Figura 3. Ruta biosintética de la lisina en hongos	9
Figura 4 Regulación de la biosíntesis de lisina en auxótrofos a homoserina de <i>Corynebacterium glutamicum</i>	13
Figura 5. Formación de 1-alquiltio-2-alquilisoindol	24
Figura 6. Curva de calibración biomasa-absorbancia	26
Figura 7. Cromatograma de estándar de lisina y muestra de caldo de fermentación	31
Figura 8. Producción de biomasa, lisina y consumo de glucosa por <i>C. glutamicum</i>	35
Figura 9. Comportamiento de la producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de glucosa	49
Figura 10. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de fosfato de potasio	51
Figura 11. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de magnesio	52
Figura 12. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de hierro	53
Figura 13. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de manganeso	53

Figura 14. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de sulfato de amonio	54
Figura 15. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de DL-alanina	55
Figura 16. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de biotina	56
Figura 17. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de tiamina	57
Figura 18. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de nicotinamida	58
Figura 19. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de proteína	59
Figura 20. Producción de lisina a través del tiempo en función del valor de pH	60
Figura 21. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de cloruro de sodio -	61
Figura 22. Concentraciones de lisina alcanzadas en los diferentes tiempos de muestreo para los 27 tratamientos	63
Figura 23. Niveles óptimos de las variables a las 6 horas de fermentación	64

1. INTRODUCCION

El aprovechamiento de la biotecnología en la industria de los alimentos ha permitido obtener productos alimenticios mejorados en sus características sensoriales y nutricionales, especialmente en aquéllos en los cuales en alguna operación de su procesamiento, se involucra a la biotecnología para su mejoramiento o enriquecimiento biológico, dando como resultado alimentos más fácilmente digeribles, parcialmente hidrolizados, fermentados o fortificados. En la actualidad se producen grandes cantidades de aminoácidos (Aa) mediante métodos microbiológicos, siendo los principales el glutamato, la lisina, la fenilalanina, la glutamina, la arginina, el triptófano, la treonina, la isoleucina y la histidina. Estos Aa son usados como agentes saborizantes, aditivos alimenticios, materia primas en síntesis química y como constituyentes de infusiones y de productos dietéticos especiales. Anualmente se producen 700,000 toneladas de glutamato y 300,000 toneladas de lisina. Existen estudios enfocados a determinar el grado de daño ocasionado a los alimentos específicamente en su contenido de lisina por tratamientos térmicos, en los que las pérdidas en el contenido lisina fué de un 53% como es el caso de preparabds infantiles a partir de harinas de arroz, maíz y soya sometidos a secado en tambor (Fernández et al. 1999). Los Aa pueden obtenerse por aislamiento de fuentes naturales, por procedimientos enzimáticos o microbiológicos y por síntesis química. Con los dos primeros procedimientos se obtienen Aa ópticamente activos (usualmente L-Aa), mientras que los métodos químicos producen en general mezclas racémicas.

Inicialmente los Aa se obtenían a partir de hidrolizados de proteínas vegetales, pero éstos eran deficientes en lisina y otros Aa esenciales. Por ello y dada la creciente demanda de Aa esenciales por la industria de los alimentos se ha optado por obtener estas moléculas mediante métodos más eficientes como lo son los procesos de fermentación. Dichas fermentaciones microbiológicas involucran el estudio de la acumulación de Aa en los caldos de cultivo bacteriano fermentados, la formación de producto mediante el control del medioambiente celular, así como de

las condiciones más apropiadas para la obtención de los mas altos rendimientos y productividad.

Diversos microorganismos acumulan Aa en el medio en el que se cultivan. De esto, las bacterias tienen una mayor capacidad de producir y garantizar la síntesis de Aa a escalas industriales, aunque la regulación por retroinhibición y represión provocan que las bacterias sintetizen solo cantidades pequeñas de Aa. La producción de Aa por microorganismos puede llevarse a cabo estimulando el consumo de sustrato en el medio de cultivo, la síntesis y la actividad de las enzimas clave, inhibiendo o reduciendo la actividad de enzimas que controlan la síntesis o degradación del producto o mediante el estímulo de la excreción del producto deseado del espacio intercelular hacia el espacio extracelular (Prenosil et al., 1992).

2. ANTECEDENTES

2.1. LA LISINA

La lisina (ácido 2,6-diaminohexanoico) es un Aa cargado positivamente según la polaridad de su grupo radical (R); soluble en agua, poco soluble en alcohol y prácticamente insoluble en éter. A partir de soluciones acuosas cristaliza en forma de aguja y platos hexagonales a partir de soluciones diluidas de alcohol. Se oscurece a 210°C y se descompone a 224.5°C. Tiene una actividad óptica de $[\alpha]^{20}+14.6^\circ$; $[\alpha]^{23}+25.9^\circ$. A 38°C tiene 2 valores de pK: pK₁ 2.20, pK₂ 8.90. Posee un segundo grupo amino en la posición ε del grupo radical, tiene en su estructura 6 átomos de carbono, su peso molecular es de 146.19 umas y se le puede identificar con los símbolos de K y Lys. En la figura 1 se muestra la estructura química de la lisina (Lehninger, 1979; Anónimo, 1968).

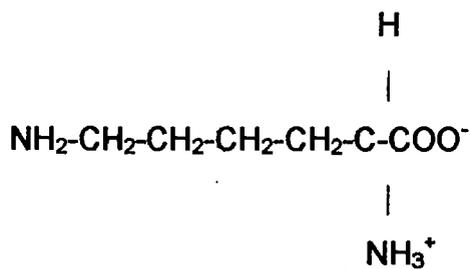


Figura 1. Estructura química de la lisina.

La lisina es uno de los Aa esenciales en la alimentación humana y animal, es ampliamente utilizado como aditivo en la industria alimentaria, como suplemento alimenticio de harinas de cereales para mejorar la calidad de sus proteínas dando como resultado mejoras en el crecimiento y en la síntesis de tejidos. Es usado también para suplementar alimentos para animales a base de cereales ya que éstos

son deficientes en lisina (Bu'lock, 1987; Kiss et al., 1991; Pelczar et al., 1997; Scriban, 1984). Económicamente es uno de los Aa más importantes, se producen grandes cantidades de éste utilizando cepas modificadas genéticamente y auxótrofos de *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium lactofermentum* (Nakayama et al., 1978; Sassi et al., 1990).

2.2. PRODUCCION DE LISINA

Existen dos métodos principales para la producción de lisina; los químicos y los microbiológicos. Sin embargo, mediante la combinación de métodos químicos y enzimáticos puede obtenerse también la lisina. A partir de una mezcla de isómeros D y L del ácido meso-diaminopimélico, por descarboxilaciones enzimáticas de los isómeros con restos o extractos celulares de *Bacillus sphaericus* 7054, se obtienen rendimientos de un 52% de L-lisina (Prenosil et al., 1992).

Otro proceso químico-enzimático para la producción de lisina es el de la compañía japonesa Toray, mediante el cual, en un proceso de 3 reacciones químicas, convierte el ciclohexano a D y L α -amino- ϵ -caprolactama. La lisina se obtiene por la hidrólisis enantiomero-selectiva de los isómeros L por las enzimas celulares de *Candida humicola* obteniendo de 98-100% de lisina ópticamente pura. El D- α -amino- ϵ -caprolactama es racemizado nuevamente por enzimas de *Alcaligenes faecalis* que contiene una α -amino- ϵ -caprolactama racemasa, o una combinación de *Acromobacter obae* y *Criptomococcus laurentii* que también son utilizados en la industria para producir lisina con elevados rendimientos (Prenosil et al., 1992).

Para la producción de lisina mediante métodos microbiológicos, se utilizan cepas de *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Brevibacterium flavum* así como otras cepas auxótrofas de *E. Coli*, pero principalmente se ha trabajado con *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium*, enfocándose a maximizar la producción de lisina mediante el estudio de la distribución del flujo de carbono durante la producción de lisina (Vallino et al., 1994), la actividad enzimática (Patek et al., 1994), limitaciones nutricionales y potenciales de oxido-reducción en el medio de cultivo (Coello et al., 1992; Sassi et al., 1990).

2.3. BIOSINTESIS DE LISINA

Las rutas de síntesis de los Aa esenciales en la nutrición del hombre se han deducido, principalmente, de estudios bioquímicos y genéticos efectuados en bacterias. En general, las sendas de este grupo de Aa son similares, e inclusive idénticas, en la mayoría de las bacterias y de las plantas superiores. Sin embargo, en ocasiones existen diferencias de especies en determinados eslabones individuales. Las rutas biosintéticas que conducen a los Aa esenciales son más complejas y más largas (de 5 a 15 reacciones) que las de los Aa no esenciales, la mayoría de las cuales comprenden menos de 5 pasos (Lehninger, 1979).

Biosintéticamente, la L-lisina es un miembro de la familia del aspartato (excepto en los hongos) y la regulación de síntesis tiene una relación estrecha con los otros aminoácidos de la familia del aspartato. El grupo de aminoácidos de la familia del aspartato consiste de aspartato, asparagina, metionina, treonina, lisina e isoleucina. El esqueleto carbonado de la lisina e isoleucina es derivado en parte del piruvato, pero se considera parte fija de la familia del aspartato. El diaminopimelato, un precursor de la lisina, es necesario para la síntesis de la pared celular en bacterias pero no para la síntesis de proteínas. Por ello, el diaminopimelato puede así considerarse como otro miembro de la familia del aspartato.

Como los Aa de la familia del aspartato son formados por la vía de una alta dependencia de la ruta metabólica, existen numerosos puntos de control que son sitios potenciales de regulación de flujo de carbono, aunque se encuentran diversos patrones de control a través de la ruta de control en varios organismos. (Nakayama et al., 1978).

La biosíntesis del aspartato ocurre por la vía de la glutamato aspartato-transaminasa la cual cataliza la formación de aspartato a partir de oxalacetato. La tirosina-glutamato transaminasa parece tener una menor función en la formación del aspartato, sin embargo, la transaminasa A (producto del gen aspC) desempeña la principal función. La vía común para la familia de Aa del aspartato consiste de tres reacciones que convierten el aspartato a dos intermediarios dependientes, semialdehído aspártico y homoserina (Nakayama et al., 1978).

Existen dos rutas principales de síntesis de lisina, una de las cuales avanza a través del ácido diaminopimérico y es la más importante en las bacterias y plantas superiores, mientras que la otra transcurre vía ácido α -aminoadípico y tiene efecto en la mayoría de los hongos (Lehninger, 1979).

En la figura 2 se muestra la ruta sintética de la lisina en bacterias, la cual avanza a través del ácido diaminopimérico.

La ruta del ácido diaminopimérico comienza con el semialdehído aspártico y piruvato, que experimentan una condensación aldólica y pierden agua formando un producto cíclico intermediario, el ácido 2-3-dihidropicolínico. En una etapa posterior se forma el ácido L,L- α,ϵ -diaminopimérico, que se convierte en su forma meso descarboxilándose después para rendir L-lisina. La biosíntesis de la lisina por esta vía está sujeta a la retroinhibición de uno de las isoenzimas de la aspartato-quinasa. Debe recordarse que el fosfato de aspartato es también un precursor de la treonina, y que la treonina inhibe su isoenzima de la aspartato-quinasa. La síntesis del conjunto de enzimas que conducen al semialdehído aspártico a la lisina resulta coordinadamente reprimida por este Aa (Lehninger, 1979).

La ruta del ácido aminoadípico en hongos comienza con la acetil-CoA y el ácido α -oxoadípico, en una serie de reacciones análogas a las del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que van desde el ácido cítrico al ácido α -oxoglutámico. El ácido α -oxoglutámico es aminado y se transforma en ácido α -aminoadípico, el cual, finalmente, se convierte en L-lisina, como se muestra en la figura 3 (Lehninger, 1979).

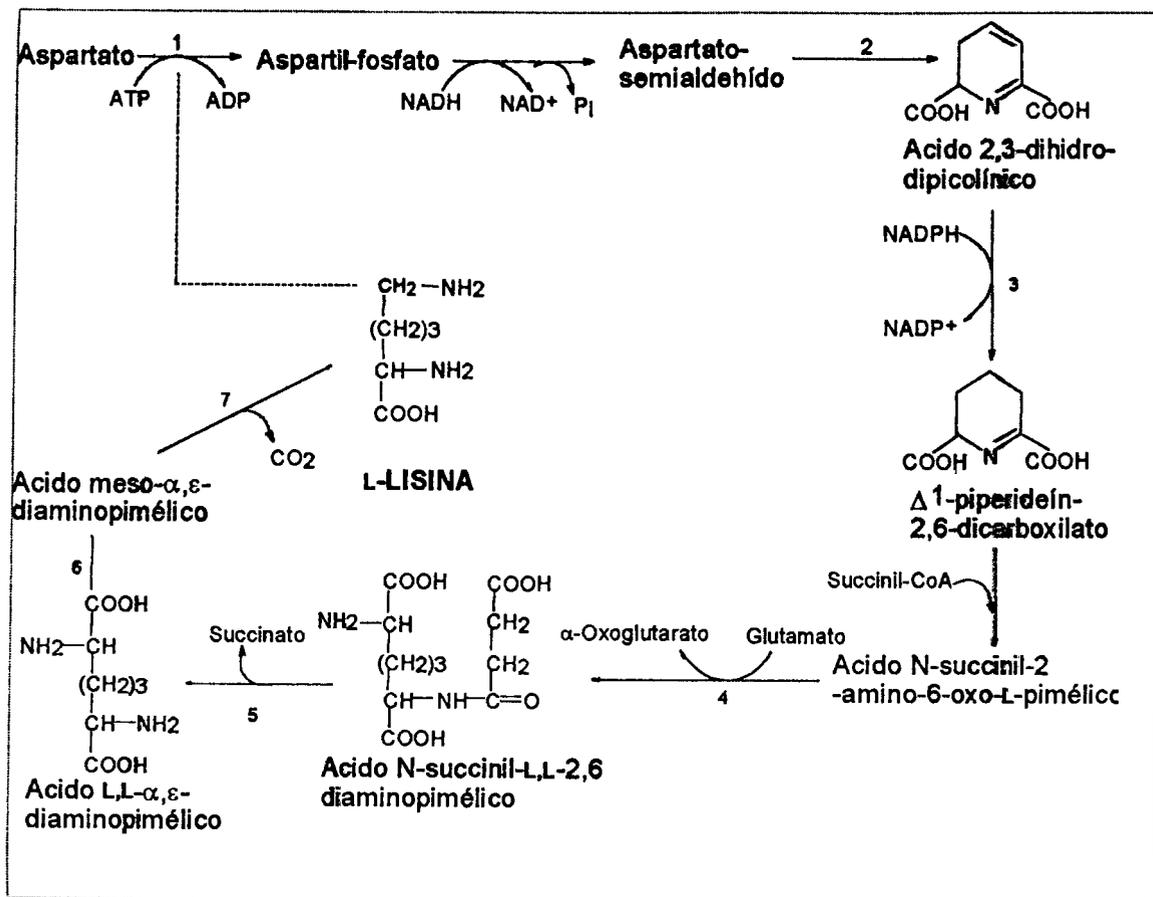


Figura 2. Ruta biosintética de la lisina en bacterias. 1 = Aspartato-quinasa. 2 = Dihidro-dipicolinato-sintasa. 3 = Δ^1 -piperideín-2,6-dicarboxilato-deshidrogenasa. 4 = Succinil-diaminopimelato-transferasa. 5 = Succinil-diaminopimelato-desuccinilasa. 6 = Diaminopimelato-epimerasa. 7 = Diaminopimelato-descarboxilasa. — Inhibición por retroalimentación.

2.4. PRODUCCION DE L-LISINA MEDIANTE METODOS MICROBIOLOGICOS

Se han desarrollado diversos procesos microbiológicos para la producción de más de 20 Aa, sin embargo, pocos Aa se producen en cantidades comerciales por esta vía, debido a la falta de procesos de fermentación baratos. La lisina es económicamente uno de los Aa más importantes. Comercialmente, La lisina se produce en grandes cantidades utilizando mutantes auxótrofas de *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium lactofermentum* (Sassi et al., 1996).

El primer proceso bacteriano para la producción de lisina se desarrolló mediante la combinación de microorganismos productores de diaminopimelato con un auxotrofo que requería lisina o un doble auxótrofo que requería lisina e histidina de *E. coli* seguido de una descarboxilación del compuesto por *Aerobacter aerogenes* o *E. coli* tipo silvestre. El rendimiento alcanzado de ácido diaminopimélico fue de 24 g/L. La producción directa de L-lisina a partir de carbohidratos se desarrolló primeramente con un auxótrofo a homoserina o treonina más metionina de *Corynebacterium glutamicum*. El mismo proceso fue reportado con un auxótrofo de *Brevibacterium flavum* que requería homoserina (Nacayama et al., 1978).

Durante varias décadas, el *Corynebacterium glutamicum* o algunas especies relacionadas, se han utilizado en la industria para producir varios Aa bajo condiciones controladas, en las cuáles la permeabilidad de la membrana celular es modificada por limitaciones de biotina en el medio de cultivo o por la adición de agentes surfactantes (Domínguez et al., 1993).

La producción de lisina mediante procesos microbiológicos ha sido, en los últimos días, un punto de estudio de la biotecnología industrial. Sin embargo, la optimización de los procesos microbiológicos para la formación de producto mediante el control del medio ambiente celular, ha sido de primordial importancia para definir las condiciones más apropiadas para el mejoramiento tanto en el rendimiento como en la productividad, pero la producción de lisina es restringida principalmente, debido al gran consumo de la fuente de carbono durante el desarrollo. (Veliezarov et al., 1992; Sassi et al., 1996).

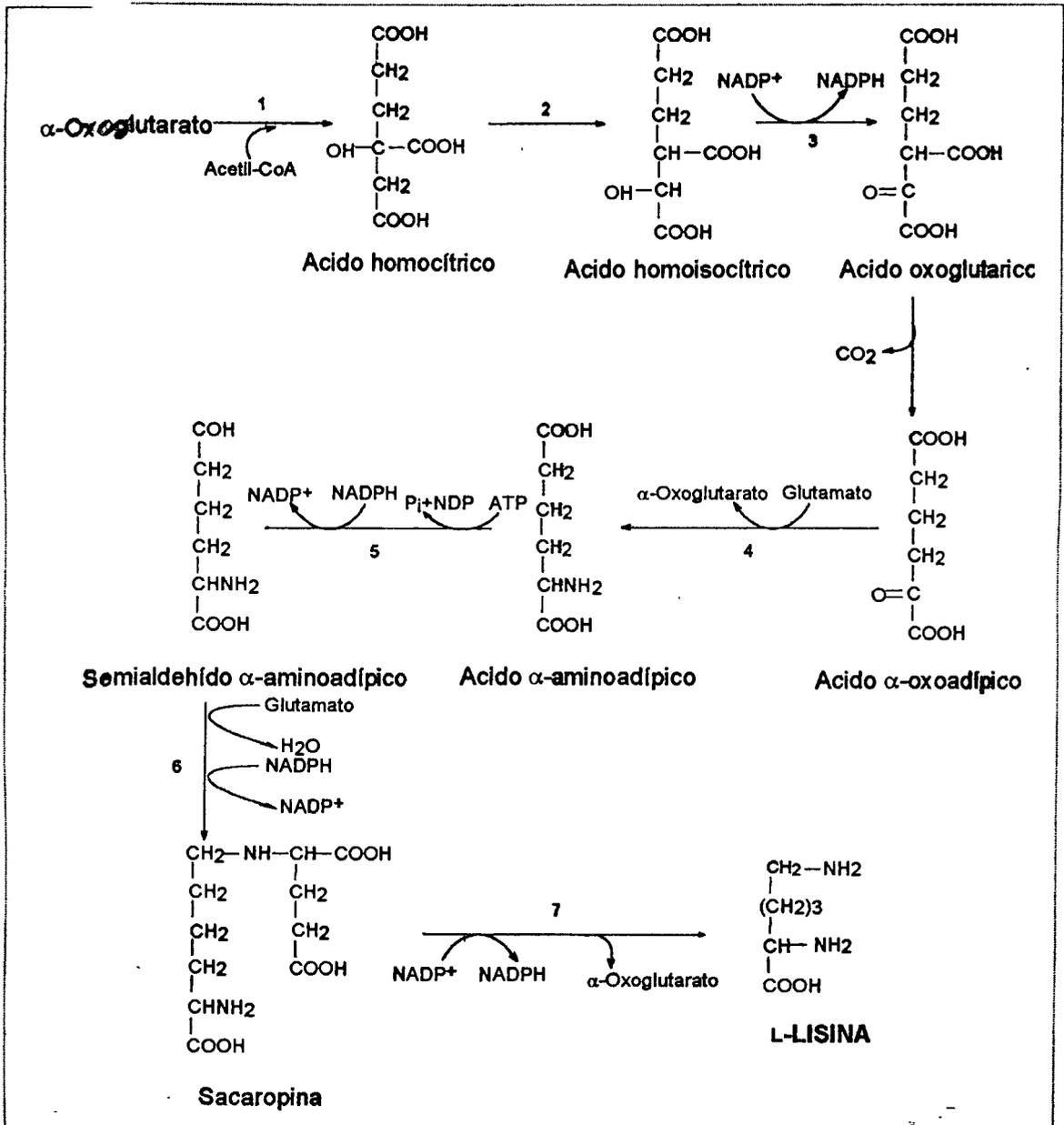


Figura 3. Ruta biosintética de la lisina en hongos. 1 = homocitrato-sintasa, 2 = homoaconitato-hidratasa, 3 = isocitrato-deshidrogenasa, 4 = aminoadipato-transaminasa, 5 = aminoadipato-semialdehido-deshidrogenasa, 6 = sacaropina-deshidrogenasa (formadora de glutamato), 7 = sacaropina-deshidrogenasa (formadora de lisina).

Es bien conocido que las cepas de bacterias que producen ácido glutámico (típicamente *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Brevibacterium flavum*) pueden sintetizar grandes cantidades de lisina (aproximadamente 30% en rendimiento molar respecto a la glucosa como fuente de carbono) mediante la selección de cepas que exhiben resistencia a S-(2-aminoetil)-L-cisteína, un antimetabolito de lisina (AEC). El AEC mejora dramáticamente la selección de cepas resistentes a la inhibición por retroalimentación de la enzima aspartatokinasa (Vallino et al., 1993).

Las cepas de *Corynebacterium glutamicum* que requieren de treonina y leucina producen grandes cantidades de lisina, pero es inferior el rendimiento a las cepas que requieren de homoserina para su crecimiento. Otros auxótrofos de *C. glutamicum* y otras bacterias son inferiores en rendimiento al auxótrofo de *C. glutamicum* a homoserina. Dobles auxótrofos, los cuales requieren, en adición a la homoserina, uno de los siguientes aminoácidos, treonina, isoleucina o metionina para desarrollar, muestran poca tendencia a revertir a homoserina independientes. Esto es posible no sólo para prevenir la reversión del microorganismo al tipo silvestre, sino que también se produce lisina en grandes cantidades con buenos rendimientos utilizando diversos microorganismos que son mutantes dobles en la ruta metabólica de la homoserina. (Nakayama et al., 1978).

Las dos enzimas involucradas en el paso limitante de la biosíntesis de la lisina son la aspartatokinasa y la dihidrodipicolinato sintetasa. La aspartatokinasa de *Corynebacterium glutamicum* que cataliza la reacción de fosforilación de aspartato a aspartil fosfato es inhibida por retroalimentación por lisina y treonina. (Oh et al., 1991).

2.5. PRODUCCION DE L-LISINA CON CEPAS MEJORADAS

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium glutamicum es una bacteria aeróbica que requiere de biotina para su desarrollo, crece en una gran variedad de medios de cultivo que tienen

azúcar y ácidos orgánicos y es ampliamente usada para la producción industrial de Aa como el glutamato y la lisina. Durante el crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en medios suplementados con glucosa, la función anaplerótica de esta bacteria se ha atribuido a la enzima fosfoenol piruvatocarboxilasa. Esta enzima muestra actividades específicas elevadas en todas las cepas probadas de *Corynebacterium glutamicum* (Peters-Wendisch et al., 1997).

Desde hace tiempo se ha utilizado *Corynebacterium glutamicum* para la producción de diversos Aa bajo condiciones de cultivo controladas. Mediante el empleo de esta bacteria sujeta a determinadas condiciones de cultivo se obtienen altas concentraciones de ácido glutámico en el medio de fermentación (Domínguez et al., 1993).

Se ha obtenido un incremento de más del 10%, en el rendimiento de lisina, mediante el uso de una mutante de *Corynebacterium glutamicum* la cual requiere de leucina y homoserina para su desarrollo y además es resistente a s-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC). Esta cepa produjo 39.5 g/L de lisina en un medio que contenía 105 g/L de azúcares reductores (melasa de caña), mientras que el auxótrofo a homoserina y leucina produjo 34.5 g/L de lisina. En la tabla 1 se muestra la producción de lisina por los diferentes auxótrofos de *Corynebacterium glutamicum*. (Nakayama et al., 1978).

Cepas de *Corynebacterium glutamicum* cultivadas en presencia de lactato y/o acetato la actividad de la enzima piruvato carboxilasa es muy elevada, y es mucho menor cuando son cultivadas en presencia de glucosa o acetato. Esto sugiere que la actividad de la piruvato carboxilasa está regulada por la fuente de carbono que se utiliza en el medio de cultivo (Peters-Wedisch et al., 1997).

Tabla 1. Auxótrofos de *Corynebacterium glutamicum* productores de L-lisina.

Cepa	Marcador Genético	Lisina (g/L) ^b
ATCC21526	Homoserina-leucina ⁻ .AEC ^r	39.4
ATCC21523	Homoserina-leucina ⁻ .AHV ^r	38.2
ATCC21544	Homoserina-leucina ⁻ .AMTB ^r	38.1
ATCC21253	Homoserina-leucina ⁻ .	34.5
ATCC13032	Homoserina ⁻	28-30

AEC = S-(β-aminoetil)cisteína, AHB = ácido α-amino-β-dihidroxicarboxílico, AMTB = ácido 2-amino-3-metilbutírico. b = en un medio de cultivo con 100 g/L de azúcares reductores.

2.6. REGULACION DE LA SINTESIS DE L-LISINA

El mecanismo de regulación de la biosíntesis de lisina en *C. glutamicum* se muestra en la figura 4. Un patrón de regulación similar fue observado en *B. flavum*. Generalmente la reacción que rinde el producto inicial en la ruta metabólica está sujeta a la inhibición por producto final. La inhibición de la síntesis de la lisina y de la condensación del semialdehído aspártico con piruvato, en el punto dependiente para la biosíntesis de lisina, ha sido demostrado en *E. coli*, pero en *Corynebacterium glutamicum* la lisina ni algún otro aminoácido tienen un efecto inhibitorio a concentraciones de 10⁻² M.

Si bien la homoserina deshidrogenasa fue inhibida por treonina y reprimida por metionina en *Corynebacterium glutamicum* y *B. flavum*, la aspartato-β-semialdehído deshidrogenasa no fue inhibida o reprimida por ninguno de los aminoácidos probados. De esta manera, la sobreproducción de lisina por auxótrofos a homoserina o treonina pueden ser poca para evitar la inhibición de la aspartokinasa por retroalimentación debido a la incapacidad para producir treonina y por la ausencia de otro mecanismo de regulación mejor en la ruta biosintética de la lisina, figura 4. El

bloqueo de la síntesis de homoserina a homoserina deshidrogenasa resulta de la liberación inhibitoria por retroalimentación de las aspartokinasas de treonina y lisina, y el semialdehido aspártico produjo lisina a través de la ruta sintética en la cual no muestra inhibición por retroalimentación (Nakayama et al., 1978).

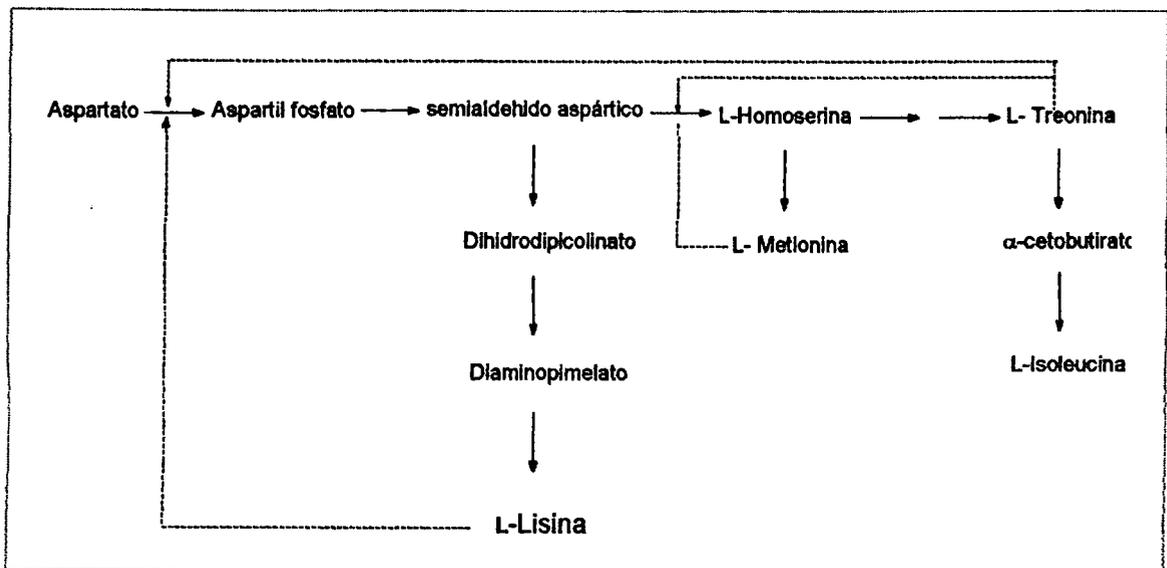


Figura 4. Regulación de la biosíntesis de lisina en auxótrofos a homoserina de *Corynebacterium glutamicum*.

En la figura 4, las líneas punteadas con flechas indican una inhibición por retroalimentación de las enzimas que intervienen en la conversión de aspartato a aspartil fosfato (aspartatoquinasa) y de semialdehido aspártico a L-treonina (homoserina deshidrogenasa), mientras que la línea punteada indica represión de la enzima que convierte la homoserina a L-metionina.

Los resultados de estudios realizados mostraron que el rendimiento de la lisina, en fermentaciones utilizando *Corynebacterium glutamicum*, fue limitado por la repartición del flujo de carbono en los puntos de control de la glucosa-6-fosfato, fosfoenolpiruvato y piruvato (o una combinación de ambos), lo cuál resulta en una producción desproporcionada de precursores necesarios para la biosíntesis de lisina (Vallino et al., 1993).

Se ha estudiado también el punto de control a nivel de la glucosa-6-fosfato, el cual podría limitar el rendimiento de la lisina por una inadecuada producción de NADPH, por perturbaciones inducidas a atenuar la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (primer punto de control de la glucólisis) y por la fermentación en medios con gluconato, el cual logra pasar el sitio de control de la glucosa-6-fosfato isomerasa en el punto de control durante las diferentes fases de desarrollo en la fermentación de los medios de cultivo, indicando que la glucosa-6-fosfato isomerasa no es un punto de control flexible o rígido sino que las limitaciones en cuanto al rendimiento de lisina podrían ser debidas a la rigidez de los puntos de control del fosfoenolpiruvato o del piruvato (Vallino et al., 1993).

2.7. DESCRIPCION DE LA CEPA BACTERIANA

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium glutamicum es una bacteria gram (+), aerobia y anaerobia facultativa. Es un coco o bacilo recto o ligeramente curvado de 0.7-1.0 x 0.5-3.0 μm con extremos cónicos o redondeados. Generalmente se encuentra aislada o en pares; a menudo en formación de V o en palizadas. Contiene gránulos metacrómicos intracelulares de polimetafosfato; inmóvil, catalasa negativa, no esporula y no acidifica el medio de cultivo. Las colonias son generalmente opacas y convexas en medios de cultivo que contienen suero o sangre; en agar nutritivo se observan colonias lisas, circulares, de color opaco a ligeramente brillante. La temperatura óptima de crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* es de 25-37 °C. Todas las cepas de esta bacteria requieren biotina, y algunas adicionalmente requieren de tiamina y/o ácido para-aminobenzoico. En condiciones de anaerobiosis produce ácido L-glutámico. Su pared celular está compuesta por ácido diaminopimélico, arabinosa, galactosa, pequeñas cadenas de ácido micólico y ácidos grasos, de los cuales el de 16 átomos de carbono; saturado, y el de 18 átomos de carbono con una insaturación en el carbono uno son los principales. El contenido de guanina mas citosina (G+C) en su DNA varía de 55 a 57.7 mol%.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar un medio de cultivo para la producción de lisina en matraz agitado, utilizando la cepa: ATCC 21253 de *Corynebacterium glutamicum*.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar un diseño experimental que permitiera el estudio de 13 variables en 3 niveles cada una.

Diseñar un caldo de cultivo para el inóculo (semilla) que permitiera mantener viables y metabólicamente funcionales las células de *Corynebacterium glutamicum*.

Establecer una técnica espectrofotométrica para la determinación rápida y confiable de biomasa en los caldos de fermentación.

Desarrollar una técnica para el análisis de lisina en HPLC derivatizando la muestra con o-ftaldialdehido (OPA) haciendo la detección en la región ultravioleta.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de todos los experimentos se utilizó la cepa ATCC 21253 de *Corynebacterium glutamicum* previamente reactivada a partir de una preparación en doble vial. Esta especie ha sido ampliamente estudiada por la capacidad que tiene de producir Aa a partir de una diversidad de azúcares reductores, ácidos orgánicos y acetatos como fuente de carbono; además, se han realizado diversos trabajos enfocados a estudiar el comportamiento de esta especie de microorganismo bajo diferentes condiciones de cultivo y en una variedad de medios de fermentación.

Las condiciones y los métodos considerados para la propagación y conservación de la cepa bacteriana se incluyen en el apéndice B de este trabajo.

4.1.2. MATERIAL Y EQUIPO

Estufa (Felisa)

Incubadora (Felisa)

Baño con agitación (Lab-Time)

Incubadora con agitación mecánica (Crode)

Cámara de flujo laminar (Alder)

Espectrofotómetro (Spectronic 20)

Cromatógrafo de líquidos (Varian, automuestreador 9100, sistema de entrega de solventes 9012, detector de longitud de onda variable UV-Vis 9050)

4.1.3. SUBSTANCIAS

Todos los reactivos utilizados fueron grado QP y HPLC (Merck, Sigma y Alltech).

Glucosa

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)

Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Sulfato de manganeso tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

DL-Alanina

Biotina

Hidrocloreuro de tiamina

Nicotinamida

Hidrolizado de soya

Cloruro de sodio (NaCl)

4.1.4. SOLUCIONES

Solución de metanol al 70%

Solución buffer pH=4

Solución buffer pH=10

Hidróxido de sodio 2 N

Acido clorhídrico 1 N

Solución de ácido dinitrosalicílico DNS

o-ftaldialdehído (OPA) 1 mg/mL

Metanol, grado HPLC

Solución buffer de acetato de sodio 0.1 M, pH= 6.2

Solución buffer de ácido bórico 0.4 M, pH=10.4

β -mercaptoetanol

4.2. METODOS

Las variables que se evaluaron en este trabajo fueron: glucosa, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), DL-alanina, biotina, hidrocloreuro de tiamina, nicotinamida, hidrolizado de soya, pH y cloruro de sodio (NaCl); dichas variables se identificaron como: A, B, C, M, respectivamente.

Para la formulación del medio de cultivo a estudiar se decidió probar 3 concentraciones de glucosa: 100, 130 y 160 g/L; con la finalidad de observar el efecto de concentraciones mayores y menores a las reportadas en la literatura (120 a 130 g/L) y en medios de cultivo de composición diferente, se probaron concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 g/l de fosfato de potasio, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno inorgánico con concentraciones de 20, 25 y 30 g/L, biotina: 25, 50 y 75 $\mu\text{g/L}$, aunque existen publicaciones en las que han probado concentraciones mayores a estas, se probaron concentraciones de harina hidrolizada de soya de 10, 15 y 20 mg/L, cloruro de sodio 0.1, 0.2 y 0.4 g/L, se estudiaron 3 valores de pH: 6.5, 7.0 y 7.5 para observar el comportamiento, respecto a la producción de lisina, a valores de pH ligeramente ácidos y básicos, incluyendo el valor neutro.

Respecto a los micronutrientes: Mg, Fe y Mn, se utilizaron en este medio de cultivo ya que desempeñan funciones como cofactores enzimáticos en algunas enzimas como las metaloproteínas. Las concentraciones de cada uno de los minerales fueron: para magnesio, como sulfato de magnesio 0.2, 0.4 y 0.6 g/L; para hierro, como sulfato de hierro 0.005, 0.01 y 0.015 g/L y para manganeso, como sulfato de manganeso 0.005, 0.01 y 0.0015 g/L respectivamente.

Respecto a las vitaminas alanina, tiamina y nicotinamida no se tienen reportes acerca de las funciones que tiene éstas en el desarrollo de *Corynebacterium glutamicum* y de su efecto sobre la producción de lisina, sin embargo, las concentraciones utilizadas que se estudiaron fueron: para alanina 0.30, 0.35 y 0.40

g/L, para tiamina 150, 200 y 250 $\mu\text{g/L}$ y para nicotinamida 0.25, 0.50 y 0.75 mg/L respectivamente, tomando como referencia los valores dados por (Nakayama et al., 1978).

En diversos trabajos se han utilizado medios de fermentación conformados con diferentes ingredientes y en distintas concentraciones. En este trabajo se seleccionaron algunos ingredientes y se probaron distintas concentraciones con la finalidad de seleccionar los más adecuados para la producción de lisina.

En la tabla 2 se muestran los componentes (factores) del medio de cultivo evaluados, así como los niveles y las concentraciones de tales componentes.

El diseño experimental utilizado para el estudio de estos factores es un arreglo ortogonal altamente fraccionado $AO_{27}(3^{13})$ sin repeticiones ya que se tienen un total de 13 factores en tres niveles cada uno de ellos. Se obtuvieron un total de 27 tratamientos y se procedió de la siguiente manera para su ejecución; primero se aleatorizaron los experimentos utilizando una tabla de números aleatorios, posteriormente se fraccionaron dichos tratamientos en 3 bloques que incluyeron 9 tratamientos cada bloque. De ese modo se realizaron 9 tratamientos en una semana por lo que al cabo de tres semanas se desarrollaron los 27 tratamientos. En la tabla 3 se muestra el diseño experimental desarrollado y en la primera columna se muestra el orden en que se realizaron los tratamientos.

A cada uno de los experimentos se les determinó biomasa, glucosa y lisina; tomando a la concentración de lisina como factor respuesta principal.

Para la toma de muestras, se realizaron muestreos a intervalos de 6 horas bajo condiciones asépticas depositando las muestras en recipientes adecuados y mantenidas en refrigeración hasta su análisis.

Tabla 2. Factores considerados para el diseño experimental y valores de cada uno de los tres niveles estudiados.

FACTOR	NIVELES		
	1	2	3
Glucosa ^a	100	130	160
KH ₂ PO ₄ ^a	0.5	1.0	1.5
Magnesio ^a	0.2	0.4	0.6
Hierro ^a	0.005	0.01	0.015
Manganeso ^a	0.005	0.01	0.015
(NH ₄) ₂ SO ₄ ^a	20	25	30
DL-Alanina ^a	0.30	0.35	0.40
Biotina ^b	25	50	75
Tiamina ^b	150	200	250
Nicotinamida ^c	0.25	0.5	0.75
Soya ^c	10	15	20
pH	6.5	7.0	7.5
NaCl ^a	0.1	0.2	0.4

^a = gramos por litro (g/L)

^b = microgramos por litro (µg/L)

^c = miligramos por litro (mg/L)

Tabla 3. Diseño experimental desarrollado para el estudio de los 13 factores en 3 niveles, $AO_{27}(3^{13})$.

TRATAMIENTO	EXPERIMENTO	GLUCOSA	KH_2PO_4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	$(NH_4)_2SO_4$	DL-ALANINA	BIOTINA	TIAMINA	NICOTINAMIDA	SOYA	pH	NaCl
1	1	1	3	3	3	1	2	3	3	2	3	1	3	1
19	2	1	1	3	3	3	1	2	3	3	2	3	1	3
23	3	2	1	1	3	3	3	1	2	3	3	2	3	1
8	4	1	2	1	1	3	3	3	1	2	3	3	2	3
25	5	2	1	2	1	1	3	3	3	1	2	3	3	2
5	6	3	2	1	2	1	1	3	3	3	1	2	3	3
18	7	2	3	2	1	2	1	1	3	3	3	1	2	3
9	8	2	2	3	2	1	2	1	1	3	3	3	1	2
2	9	3	2	2	3	2	1	2	1	1	3	3	3	1
15	10	1	3	2	2	3	2	1	2	1	1	3	3	3
10	11	2	1	3	2	2	3	2	1	2	1	1	3	3
3	12	2	2	1	3	2	2	3	2	1	2	1	1	3
17	13	2	2	2	1	3	2	2	3	2	1	2	1	1
21	14	1	2	2	2	1	3	2	2	3	2	1	2	1
26	15	1	1	2	2	2	1	3	2	2	3	2	1	2
22	16	3	1	1	2	2	2	1	3	2	2	3	2	1
13	17	1	3	1	1	2	2	2	1	3	2	2	3	2
27	18	3	1	3	1	1	2	2	2	1	3	2	2	3
20	19	2	3	1	3	1	1	2	2	2	1	3	2	2
16	20	3	2	3	1	3	1	1	2	2	2	1	3	2
6	21	3	3	2	3	1	3	1	1	2	2	2	1	3
24	22	2	3	3	2	3	1	3	1	1	2	2	2	1
4	23	1	2	3	3	2	3	1	3	1	1	2	2	2
7	24	3	1	2	3	3	2	3	1	3	1	1	2	2
14	25	3	3	1	2	3	3	2	3	1	3	1	1	2
11	26	3	3	3	1	2	3	3	2	3	1	3	1	1
12	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

4.2.1. DETERMINACION DE BIOMASA

La determinación de biomasa se realizó inmediatamente después de la toma de muestra de los medios de fermentación inoculados con *Corynebacterium glutamicum* utilizando una técnica espectrofotométrica. Los niveles de absorbancia de cada una de las alícuotas se determinaron a 659 nm y éstos se extrapolaron utilizando la curva de calibración biomasa-absorbancia previamente realizada (ver apéndice B).

PROCEDIMIENTO

1. Se tomaron por duplicado 3 mL de muestra de caldo de cultivo y se colocaron en un tubo de ensaye.
2. Se centrifugaron los tubos con la muestra a 2800 r.p.m. durante 10 minutos
3. El sobrenadante se recolectó en tubos de ensaye etiquetados para posteriormente evaluar las concentraciones de glucosa y lisina
4. El precipitado obtenido se resuspendió en 2 mL de solución salina al 0.9%
5. La suspensión celular se homogeneizó y se determinó la absorbancia a 659 nm. El espectrofotómetro se calibró con la solución salina
6. Las concentraciones de biomasa en las diferentes muestras se obtuvieron a partir de los valores de absorbancia, los cuales se correlacionaron empleando la curva de calibración biomasa-absorbancia (ver apéndice B)
7. El valor de biomasa obtenido se multiplicó por un factor de 0.6666 dado por el efecto de dilución en la muestra.

4.2.2. DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

La determinación de glucosa se realizó mediante el método del ácido dinitrosalisílico (DNS) descrito por Miller, 1959. Para ello, se partió de muestras centrifugadas, utilizando solo el sobrenadante haciendo una dilución para ajustar las concentraciones de glucosa entre 0.1 y 1.0 mg/mL.

PROCEDIMIENTO

1. Se tomaron 25 μL de muestra y se colocaron en un tubo de ensaye.
2. Al tubo de ensaye con la muestra se le agregaron 4 mL de agua destilada y homogeneizó perfectamente en el vortex por 30 s.
3. De la mezcla anterior, se tomó por duplicado 200 μL y se colocaron en un tubo de ensaye limpio y se le agregaron 600 μL de DNS.
4. Los tubos se calentaron con la mezcla en un baño maría en ebullición durante 5 minutos.
5. Los tubos se retiraron del baño y se les agregaron a cada uno 1200 μL de agua destilada para completar un volumen total de 2000 μL .
6. El contenido del tubo se homogeneizó perfectamente en el vortex y se determinó la absorbencia de cada una de las muestras en el espectrofotómetro a 550 nm previamente calibrando con un blanco de reactivos tomando 200 μL de agua destilada y procesándolos de igual manera que la muestra.
7. La concentración de glucosa se determinó a partir de la curva de calibración (ver apéndice B).
8. El resultado de glucosa se multiplicó por un factor de 160.80 para corregir el factor de dilución y obtener la concentración real de glucosa en la muestra.

4.2.3. DETERMINACION DE L-LISINA

La determinación de lisina se realizó mediante una derivatización rápida de aminoácidos a temperatura ambiente. A valores de pH alcalinos (pH=10) y en medios acuosos (usualmente buffer de borato) los compuestos con grupos amino primarios reaccionan con o-ftaldialdehído (OPA) en presencia de grupos tiol dando el compuesto 1-alquiltio-2-alquilisoindoles, figura 5. Cuando el OPA/R-SH se encuentra en concentraciones que excedan de 2 a 3 veces la concentración del grupo amino, la reacción se lleva a cabo en 1-2 minutos a temperatura ambiente.

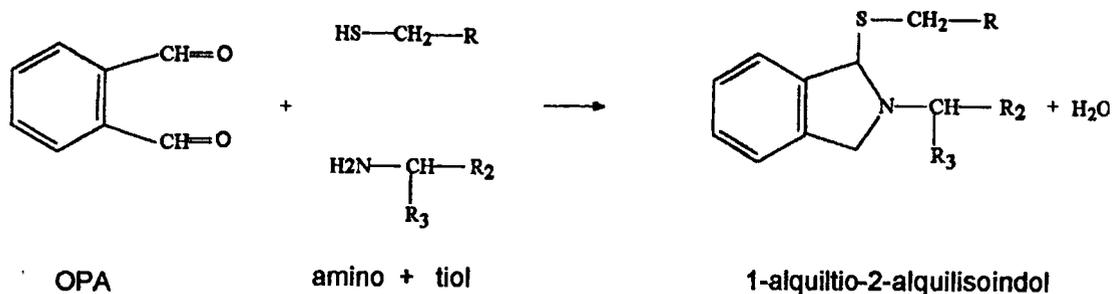


Figura 5. Formación de 1-alkiltio-2-alkuilisoindol (isoindol). Este compuesto se forma por la reacción del o-ftaldialdehido con un grupo amino primario y un grupo tiol.

PROCEDIMIENTO

La determinación de lisina se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando una columna C18 de 25 cm. La cuantificación se hizo a partir de una muestra centrifugada utilizando solo el sobrenadante, derivatizando la muestra con OPA. En la figura 5 se muestra la reacción que se lleva a cabo durante el proceso de derivatización y los productos finales de esta reacción.

La derivatización de la muestra se hizo simultáneamente en el automuestreador con el programa integrado automix tomando 40 μL de muestra y mezclándolos con 80 μL de OPA. Las condiciones de operación en el equipo fueron las que a continuación se describen para cada uno de los módulos:

DETECTOR (Varian 9050)

- a.- Wavelength (λ) = 267 nm
- b.- End Time = 10 min
- c.- End Action = Reset
- d.- Time = Constant
- e.- Rcdr AUFS = 0.005
- f.- A/Z = Yes

BOMBA (Varian 9012)

- a.- Flux = 1.2 mL/min
- b.- End Time = 10 min
- c.- Action = Equil
- d.- Equil Time = 1 min

AUTOMUESTREADOR (Varian 9100)

- a.- Injection Volume = 60 μ L
- b.- Wash Cycles = 5
- c.- Injections per vial = 1
- d.- Transfer Volume = 80 μ L
- e.- Mix Cycles = 1
- f.- Automix Wash Cycles = 1
- g.- Reaction Time = off
- h.- Loop Volume = 20 μ L

La fase móvil utilizada fue metanol/acetato de sodio 0.1 M pH 6.2 en una relación de 57% de metanol y 43% de acetato de sodio.

Los resultados obtenidos de área bajo la curva se extrapolaron en una curva de calibración para la lisina (ver apéndice B), obteniendo así la concentración de lisina en cada una de las muestras.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos y empleados para la construcción de la curva de calibración biomasa-absorbencia se muestran en la tabla 4, en la cual aparece en el primer renglón el número de estándar, en el segundo renglón su correspondiente valor de absorbancia y en el tercer renglón la concentración de biomasa, en gramos por litro (g/L), obtenida para cada uno de los seis estándares.

Tabla 4. Valores de absorbancia y concentración de biomasa para la curva de calibración biomasa-absorbencia.

No. de estándar	1	2	3	4	5	6
Absorbancia (659 nm)	0.117	0.248	0.500	0.614	0.774	0.876
Biomasa (g/L)	0.04166	0.0833	0.1667	0.2083	0.2777	0.3472

En la figura 6 se muestra la curva de calibración biomasa-absorbencia construida con los datos de concentración de biomasa y los niveles de absorbancia resumidos en la tabla 4. La linealidad de la curva ajustada fue aceptable hasta una concentración máxima de 0.3472 g/L de biomasa con una correlación de 0.9845.

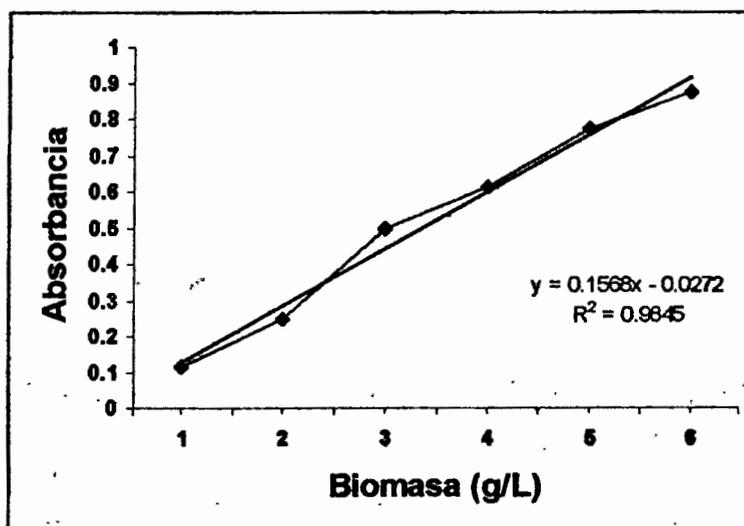


Figura 6. Curva de calibración de biomasa-absorbencia.

En la tabla 5, se muestran los niveles de concentración de biomasa obtenidos por la extrapolación del valor de absorbencia en la curva de la figura 4. Estos datos indican que en la mayoría de los tratamientos se alcanzó el máximo desarrollo de *Corynebacterium glutamicum* a las 12 y 18 horas de fermentación. Después de este lapso de tiempo inicia una disminución importante de los valores de concentración de biomasa en los caldos de fermentación. La explicación a este comportamiento se da en páginas posteriores.

Hasta el momento, no existen publicaciones respecto al comportamiento cinético de *Corynebacterium glutamicum* en los caldos de cultivo diseñados en este trabajo. El comportamiento de la curva típica de desarrollo bacteriano de este microorganismo observada en los caldos de cultivo diseñados no muestra una fase de desarrollo estacionaria sino que inmediatamente después de la fase logarítmica se presenta la fase de declinación

La ausencia de la fase estacionaria del *Corynebacterium glutamicum* durante la fermentación pudo deberse al efecto del pH. En estudios previamente realizados, el pH ha sido controlado durante el transcurso de la fermentación a valores cercanos a la neutralidad (pH = 7.0), sin embargo, en los tratamientos realizados en este trabajo no se controló el pH, sino que solo se ajustó al inicio de la fermentación a un valor dependiente del tratamiento.

Tabla 5. Concentración de biomasa en g/L de los 27 tratamientos a diferentes tiempos de fermentación.

No. de Trat.	TIEMPO DE INCUBACION (h)								
	00	06	12	18	24	30	36	42	48
1	0.0106	0.0582	0.0782	0.0738	0.0689	0.0525	0.0529	0.0552	0.0562
2	0.0106	0.0380	0.0732	0.0752	0.0613	0.0503	0.0419	0.0394	0.0435
3	0.0106	0.0262	0.0461	0.0465	0.0400	0.0328	0.0267	0.0242	0.0313
4	0.0106	0.0358	0.0525	0.0517	0.0445	0.0373	0.0290	0.0272	0.0410
5	0.0106	0.0423	0.0761	0.0751	0.0682	0.0210	0.0468	0.0548	0.0482
6	0.0106	0.0170	0.0408	0.0383	0.0345	0.0574	0.0189	0.0220	0.0284
7	0.0106	0.0167	0.0293	0.0289	0.0215	0.0205	0.0130	0.0146	0.0105
8	0.0106	0.0358	0.0545	0.0482	0.0453	0.0407	0.0277	0.0353	0.0299
9	0.0106	0.0196	0.0340	0.0428	0.0251	0.0195	0.0135	0.0151	0.0129
10	0.0106	0.0337	0.0475	0.0430	0.0384	0.0301	0.0272	0.0306	0.0272
11	0.0106	0.0167	0.0393	0.0409	0.0343	0.0272	0.0212	0.0203	0.0162
12	0.0106	0.0137	0.0151	0.0128	0.0127	0.0087	0.0062	0.0029	0.0078
13	0.0106	0.0708	0.1016	0.0936	0.0865	0.0770	0.0649	0.0663	0.0612
14	0.0106	0.0141	0.0350	0.0387	0.0345	0.0276	0.0602	0.0189	0.0224
15	0.0106	0.0782	0.1180	0.1089	0.1034	0.0936	0.0872	0.0888	0.0827
16	0.0106	0.0419	0.0776	0.0767	0.0629	0.0610	0.0555	0.0600	0.0624
17	0.0106	0.0253	0.0337	0.0349	0.0304	0.0261	0.0202	0.0196	0.0166
18	0.0106	0.0578	0.0811	0.0740	0.0696	0.0615	0.0614	0.0585	0.0375
19	0.0123	0.0509	0.0601	0.0614	0.0630	0.0513	0.0582	0.0508	0.0781
20	0.0123	0.0092	0.0094	0.0066	0.0660	0.067	0.0063	0.0121	0.0906
21	0.0123	0.0860	0.1032	0.0963	0.1008	0.0925	0.0881	0.0899	0.1017
22	0.0123	0.0553	0.0722	0.0677	0.0656	0.0599	0.0545	0.0550	0.0586
23	0.0123	0.0752	0.0910	0.0857	0.0813	0.0779	0.0744	0.0752	0.0725
24	0.0123	0.1085	0.1282	0.1247	0.1202	0.1163	0.1135	0.1090	0.1120
25	0.0123	0.1051	0.1230	0.1179	0.1143	0.1100	0.1118	0.1118	0.1076
26	0.0123	0.0746	0.0893	0.0881	0.0946	0.0760	0.0827	0.1528	0.2541
27	0.0123	0.0996	0.1210	0.1139	0.1101	0.0969	0.1003	0.0987	0.1210

En la tabla 6 se muestran, de manera resumida, las concentraciones de glucosa en gramos por litro (g/L) obtenidas de cada uno de los 27 tratamientos para cada uno de los 9 tiempos que se muestrearon. En esta tabla, se puede observar que la variación en la concentración de glucosa, en los diferentes tiempos, no fue significativa puesto que la glucosa no fue utilizada de manera importante por *Corynebacterium glutamicum* durante el transcurso de la fermentación.

El comportamiento que se observa en la tabla 6, respecto al contenido de glucosa, es con tendencia a disminuir en las primeras 6 horas de fermentación en los 27 tratamientos mientras que en algunos tratamientos se mantiene ésta tendencia hasta las 12 horas. Sin embargo, el comportamiento de la fermentación durante las 48 horas muestra que todos los tratamientos presentan variaciones en el contenido de glucosa. Existen varias razones por las que el contenido de glucosa presenta variaciones, una de ellas es la posible hidrólisis de los almidones de la harina de soya que al ser hidrolizados provocan un incremento en la concentración de azúcares reductores en el medio, otra causa puede ser debida al agotamiento de alguno o algunos de los ingredientes del medio de fermentación que pueden ser clave(s) en alguna(s) reacción(es) enzimática(s) involucradas en la ruta glucolítica y/o biosintética de *Corynebacterium glutamicum*.

Vallino, et al. 1994 y Sassi, et al. 1996 reportan que *C. glutamicum* empieza a consumir la glucosa, de manera significativa, a las 10 horas de iniciada la incubación y continúa el consumo de ésta hasta las 90 horas de incubación, comportamiento que no se observó en las fermentaciones realizadas.

Hollander, 1994 menciona que cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono, la actividad de la enzima isocitrato liasa es baja y en algunos casos es inducida sólo en presencia de acetato. De esta manera, si ésta enzima no es lo suficientemente activa no hay un flujo continuo de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos que produzca oxalacetato, ocasionado así una producción baja de este precursor de la lisina.

Tabla 6. Concentración de glucosa en g/L, de los 27 tratamientos.

No. de Trat	TIEMPO DE INCUBACION (h)								
	00	06	12	18	24	30	36	42	48
1	100	93.51	87.66	95.39	90.38	91.42	85.89	101.2	101.3
2	160	144.08	143.30	149.56	148.77	122.68	110.84	150.60	139.64
3	130	122.26	120.49	123.46	119.97	124.51	119.86	127.90	111.67
4	100	89.54	96.64	89.09	95.39	99.46	92.47	102.80	100.39
5	160	141.21	140.43	142.51	144.86	145.64	137.56	147.73	149.82
6	160	138.34	140.16	148.51	140.69	150.08	140.95	143.56	126.07
7	160	113.03	137.82	142.25	139.38	145.12	139.64	145.64	148.51
8	100	98.62	96.22	91.73	97.27	95.07	97.37	99.35	99.25
9	130	104.36	120.33	119.65	119.86	123.99	121.64	122.16	121.64
10	130	121.37	126.86	127.90	126.60	127.12	123.72	125.81	127.64
11	160	145.12	154.52	140.95	154.78	155.30	127.12	151.38	153.47
12	100	100.71	103.42	96.64	106.03	107.08	100.19	105.93	106.66
13	100	96.85	84.32	99.77	101.23	100.92	102.38	90.27	96.85
14	160	144.96	140.69	144.60	153.99	152.43	152.69	151.65	133.64
15	100	96.64	97.79	96.85	99.77	99.25	100.40	100.60	103.32
16	160	141.73	146.43	138.08	148.25	153.47	148.51	146.95	153.21
17	130	118.66	126.33	125.81	125.55	128.94	117.41	127.38	130.51
18	130	117.41	121.90	111.15	122.16	126.60	122.68	124.77	121.90
19	100	91.19	90.87	93.63	91.61	95.12	96.29	95.12	90.76
20	130	118.44	121.90	120.57	122.43	127.04	128.01	122.16	98.20
21	100	95.33	76.73	94.91	92.46	94.91	99.05	94.91	121.36
22	160	142.89	147.40	148.20	143.15	146.61	144.48	146.34	153.26
23	130	118.71	117.91	118.44	119.51	120.57	126.99	118.91	118.44
24	130	176.63	117.91	118.71	112.01	119.51	123.76	118.44	125.62
25	130	120.84	124.29	119.51	118.71	118.44	122.76	118.18	152.18
26	100	95.97	91.08	93.74	92.36	94.64	97.35	92.57	92.04
27	160	147.40	151.66	138.64	141.82	143.95	147.40	143.95	108.83

La determinación de lisina se realizó mediante un procedimiento de derivatización desarrollado en nuestro laboratorio, utilizando o-ftaldialdehido (OPA) como agente derivatizante en condiciones básicas. En la figura 7 se muestra el cromatograma obtenido en el que se puede observar el pico que corresponde a la lisina, el cual aparece a un tiempo de retención de 2.75 minutos. El pico mayor que se observa a éste tiempo de retención corresponde a un estándar de lisina de 1500 mg/L y el pico menor, a ese mismo tiempo, corresponde a una muestra de caldo de cultivo de 6 horas de fermentación.

Los picos mayores que se observan a tiempos de retención de 2.03 y 2.40 minutos corresponden al (OPA).

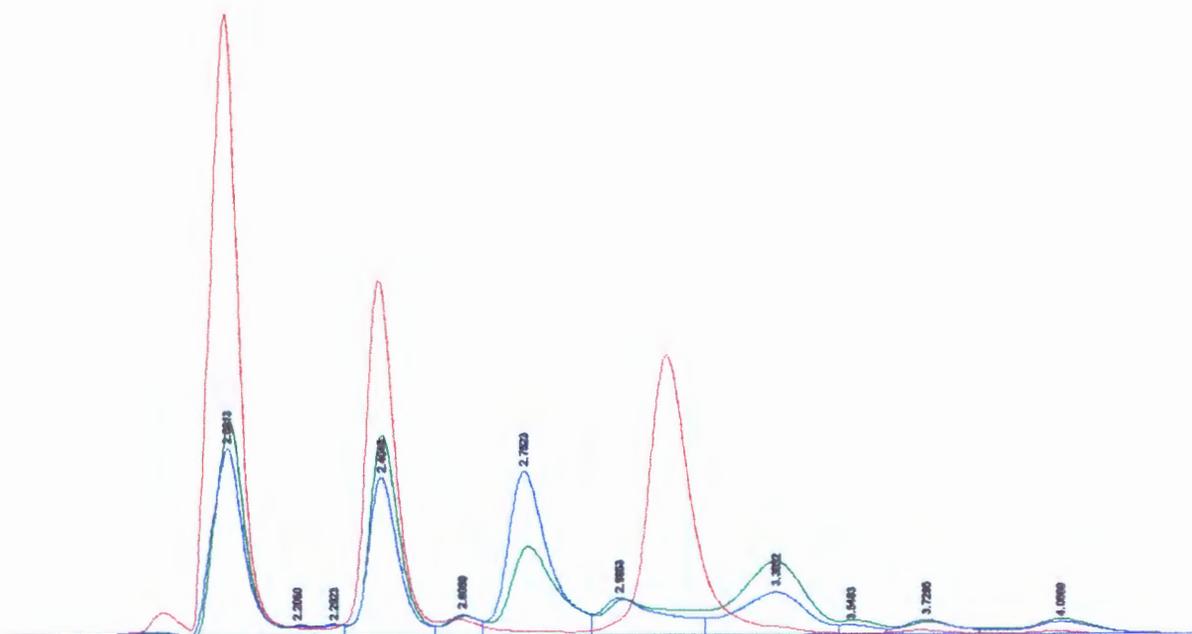


Figura 7. Cromatogramas de OPA (color rojo), estándar de lisina (color verde) y muestra de caldo de fermentación (color azul).

Para determinar la concentración de lisina, en cada una de las muestras, se determinó el área bajo la curva del pico correspondiente a la señal de lisina que aparece a los 2.75± 0.4% minutos de tiempo de retención.

Los resultados de concentración de lisina, obtenidos de las fermentaciones para optimizar el medio de cultivo en matraz, muestran que los tratamientos 15, 10 y 24 son los que mostraron una mayor concentración de lisina aunque a diferentes tiempos de fermentación, a las 48, 18 y 30 horas respectivamente. Las concentraciones de los 27 tratamientos realizados se muestran, de manera resumida en la tabla 7.

Se puede observar que la producción de lisina por *Corynebacterium glutamicum* se inició a las 6 horas finalizando en algunos casos a las 12 horas. No obstante, después de las 18 horas algunos experimentos empezaron a disminuir la producción de lisina. Respecto a este comportamiento, Vallino, Et al. 1994 y Sassi, et al. 1996 encontraron que la producción de lisina se inició desde las 20 horas hasta las 100 horas de fermentación, comportamiento que no fue observado en los tratamientos realizados. Como se señaló previamente para el comportamiento de la producción de biomasa y el consumo de la glucosa, la producción de lisina se afectó posiblemente por las mismas causas que afectaron a los dos parámetros antes mencionados puesto que este fenómeno se observa en el mismo lapso de tiempo correspondiente a las primeras 18 horas de fermentación. En este caso, para los 27 tratamientos realizados, la producción de lisina fue sólo de las 6 a las 18 horas de fermentación.

Estudios realizados por Vallino et al. 1992, 1994 y Sassi et al. 1996 muestran que la producción de lisina continúa independientemente después de que la biomasa a alcanzado su máximo. Esto sugiere que la actividad metabólica de *C. glutamicum* posiblemente fue inhibida por el efecto del pH, debido a que este no se controló durante la fermentación impidiendo así la producción continua tanto de biomasa como de lisina.

Tabla 7. Concentraciones de lisina en mg/L de los 27 tratamientos realizados, a diferentes tiempos de fermentación.

No. de Trat.	TIEMPO DE INCUBACION (h)							
	06	12	18	24	30	36	42	48
1	261.29	301.42	77.77	178.41	175.95	43.84	83.33	28.49
2	316.17	317.41	211.71	199.99	194.96	94.05	104.64	96.04
3	331.78	167.98	144.11	111.09	103.37	29.57	46.89	48.89
4	275.33	144.35	103.61	91.67	60.03	12.48	31.05	93.04
5	272.06	274.70	237.06	219.48	88.60	83.17	107.12	12.73
6	260.71	173.78	123.86	81.10	270.15	35.00	35.47	11.72
7	288.00	196.47	97.61	111.78	101.82	38.03	42.83	28.06
8	201.07	114.45	71.96	57.32	27.51	-	31.16	-
9	242.04	116.49	102.12	78.39	61.39	-	-	-
10	436.25	179.25	130.38	109.68	112.29	168.67	127.32	125.37
11	337.71	195.84	124.58	98.08	87.94	31.87	75.79	43.53
12	272.43	120.66	73.03	247.55	28.82	33.20	91.97	173.55
13	229.78	296.02	282.69	85.10	219.10	207.59	319.13	425.67
14	264.64	145.15	82.88	81.67	37.84	42.52	58.39	34.35
15	202.21	406.22	359.77	339.92	250.05	363.90	319.00	595.52
16	224.93	215.65	185.21	177.92	174.67	165.74	179.70	284.53
17	196.00	136.03	93.39	61.33	44.59	89.07	43.00	163.97
18	133.35	182.39	196.11	165.77	167.86	222.38	196.58	180.00
19	194.64	103.73	190.74	190.28	239.11	117.08	284.76	51.64
20	163.95	66.70	100.00	108.51	126.77	89.15	165.87	112.57
21	111.72	128.75	136.69	173.28	126.77	125.19	155.96	98.25
22	118.22	112.13	193.54	157.02	107.40	106.44	151.09	77.93
23	125.22	63.40	108.40	132.05	104.05	97.19	146.80	88.71
24	168.19	273.49	347.81	347.03	400.47	396.04	356.38	238.26
25	219.94	250.21	280.50	267.26	270.37	301.20	351.04	212.72
26	94.80	28.51	148.25	71.29	115.26	111.70	102.14	27.52
27	113.99	229.52	321.82	275.44	414.40	263.19	249.13	170.96

-Valores no detectados

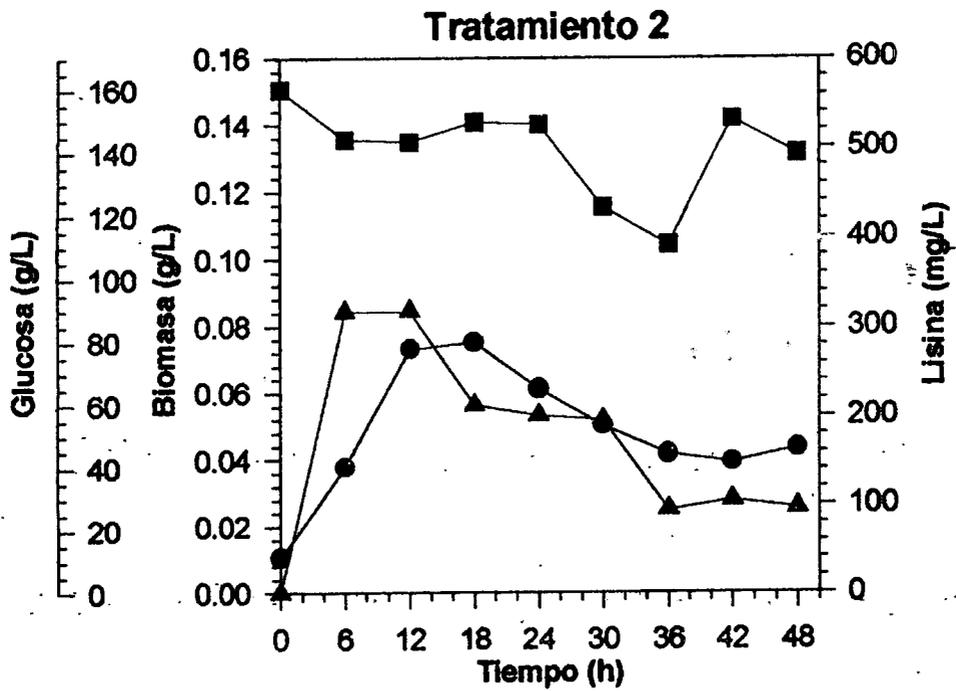
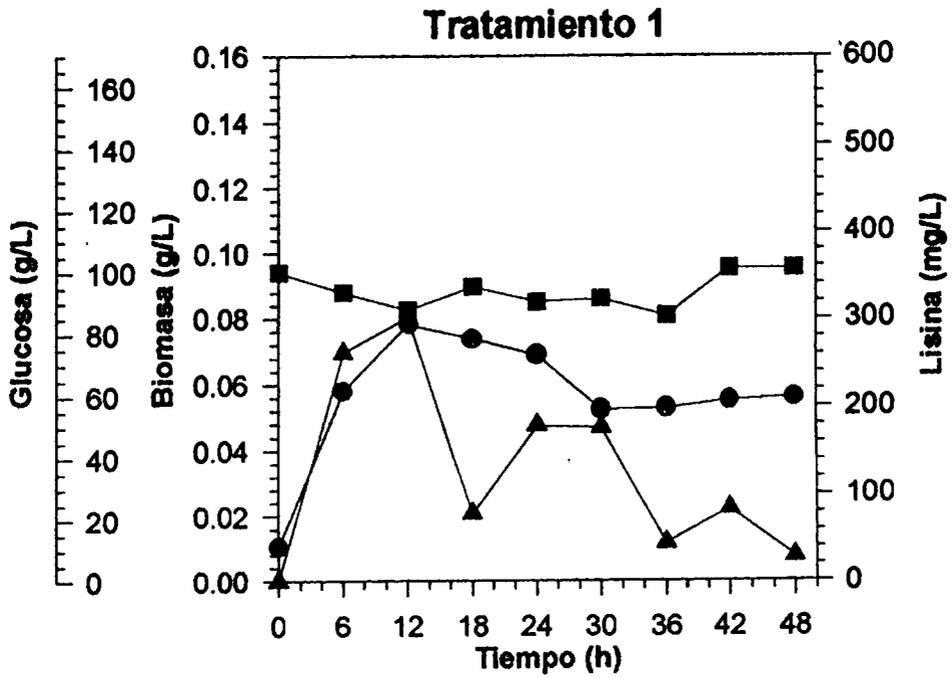
Analizando de manera conjunta el comportamiento del consumo de glucosa, la producción de biomasa y lisina mostrados en la figura 8 (tratamientos del 1 al 27), se observa que la glucosa disminuyó ligeramente al mismo tiempo que se presentó el máximo desarrollo de *Corynebacterium glutamicum* y la máxima producción de lisina. Este comportamiento sugiere que hay una relación estrecha entre el consumo de la glucosa, la producción de biomasa y la biosíntesis de lisina.

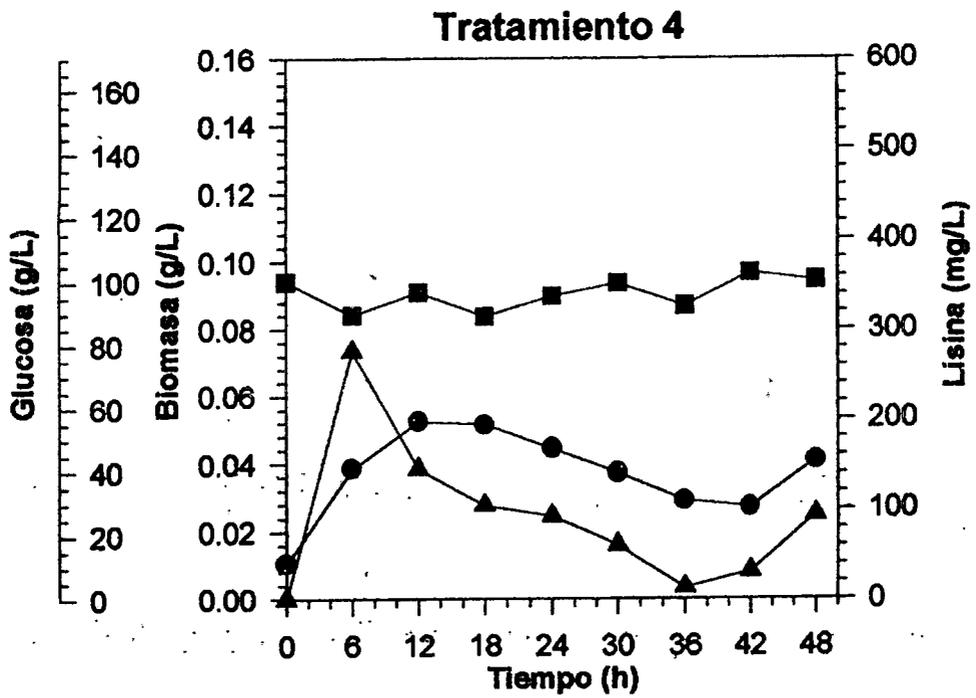
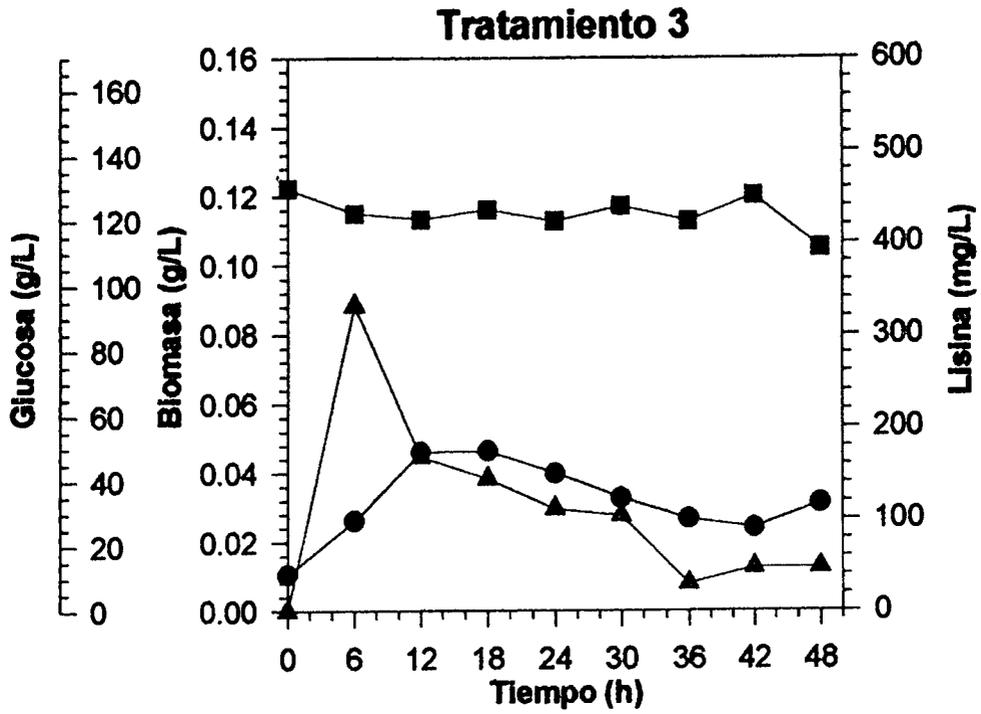
Por otro lado, con la finalidad de saber el comportamiento del pH durante la fermentación, se realizó un experimento adicional en el que se hicieron determinaciones de pH a intervalos de 6 horas encontrándose que éste disminuyó drásticamente de 6.5 a 4.8 en las primeras 18 horas de fermentación, fenómeno que concuerda con el cese en la producción de lisina y biomasa e igualmente para el consumo de la fuente de carbono.

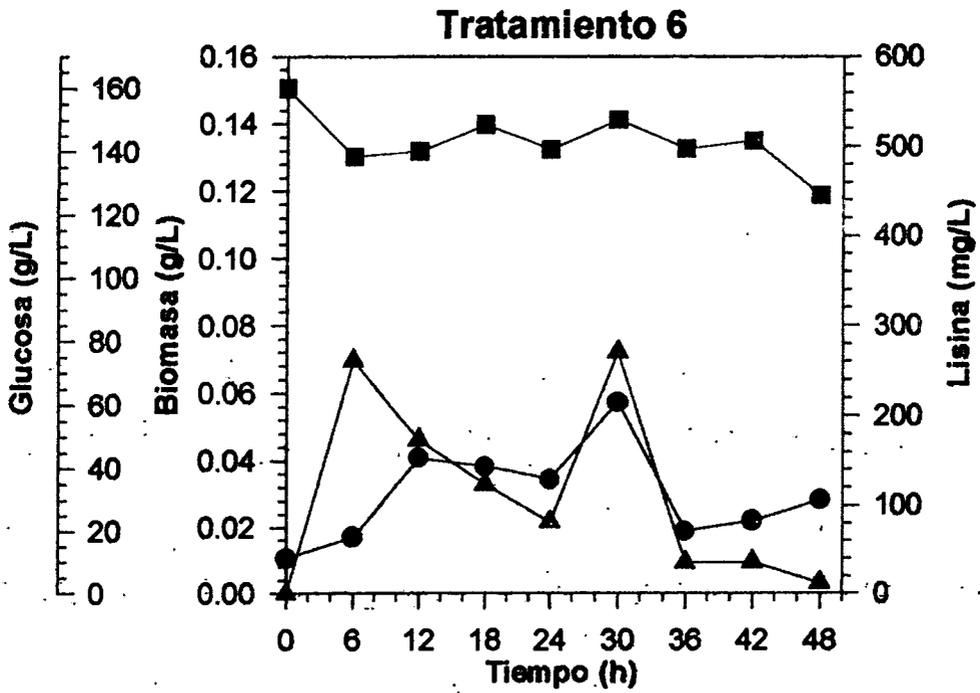
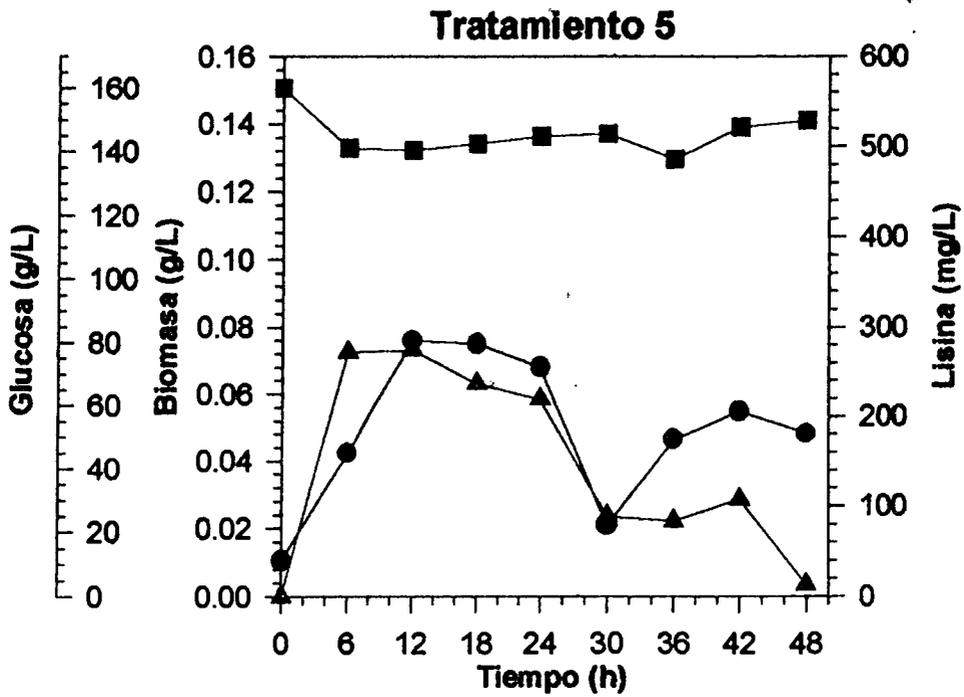
Este hallazgo apoya las explicaciones dadas con anterioridad respecto del comportamiento de la producción de biomasa, biosíntesis de lisina y para el consumo de la glucosa.

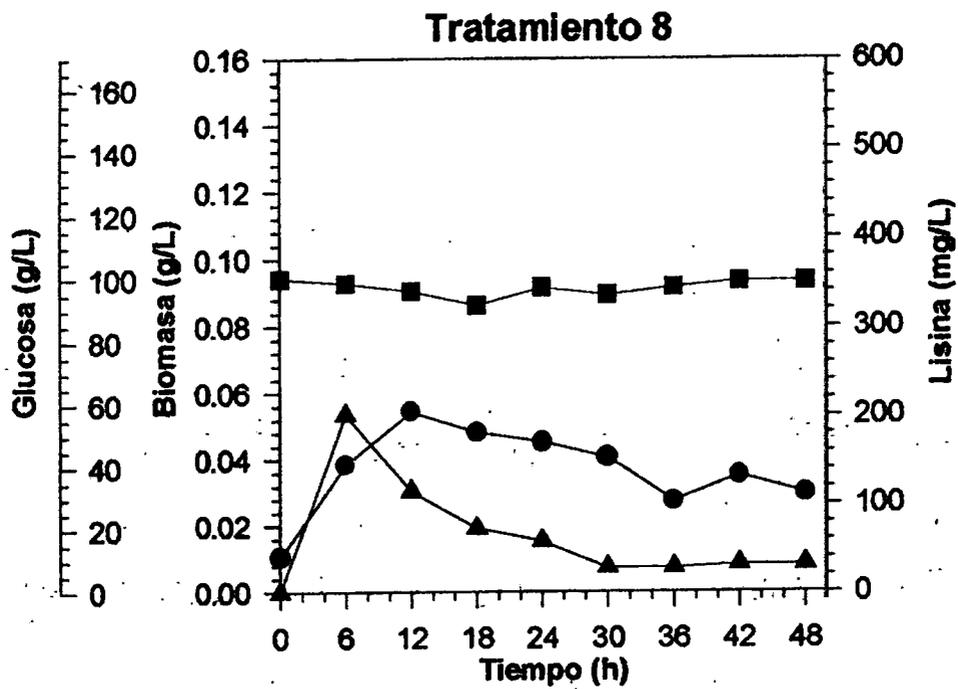
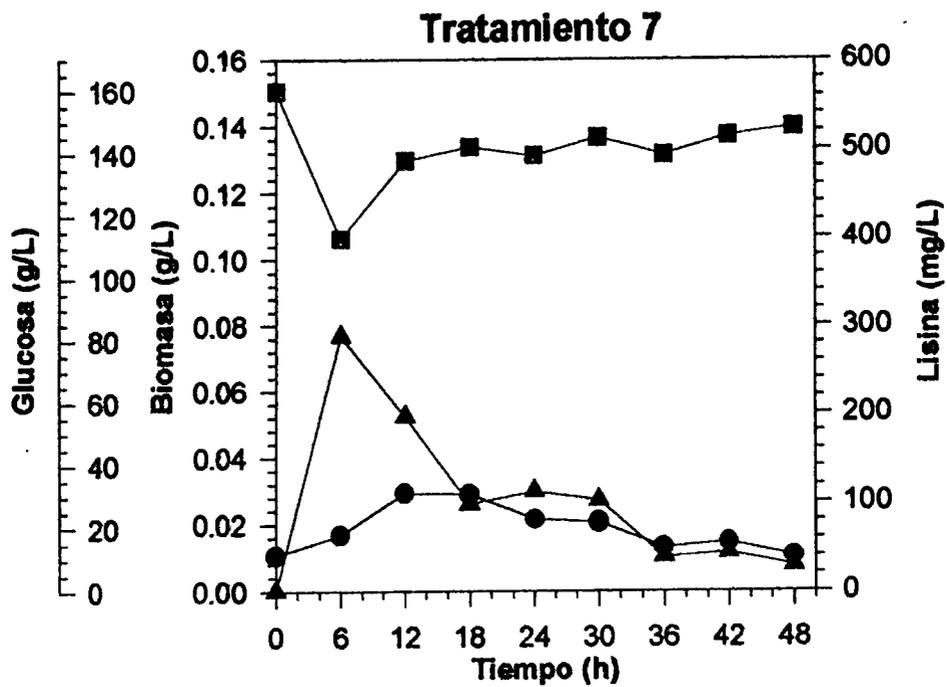
En la figura 8 se muestra el comportamiento cinético para la producción de biomasa (círculo), la biosíntesis de lisina (cuadro) y para el consumo de la glucosa (triángulo).

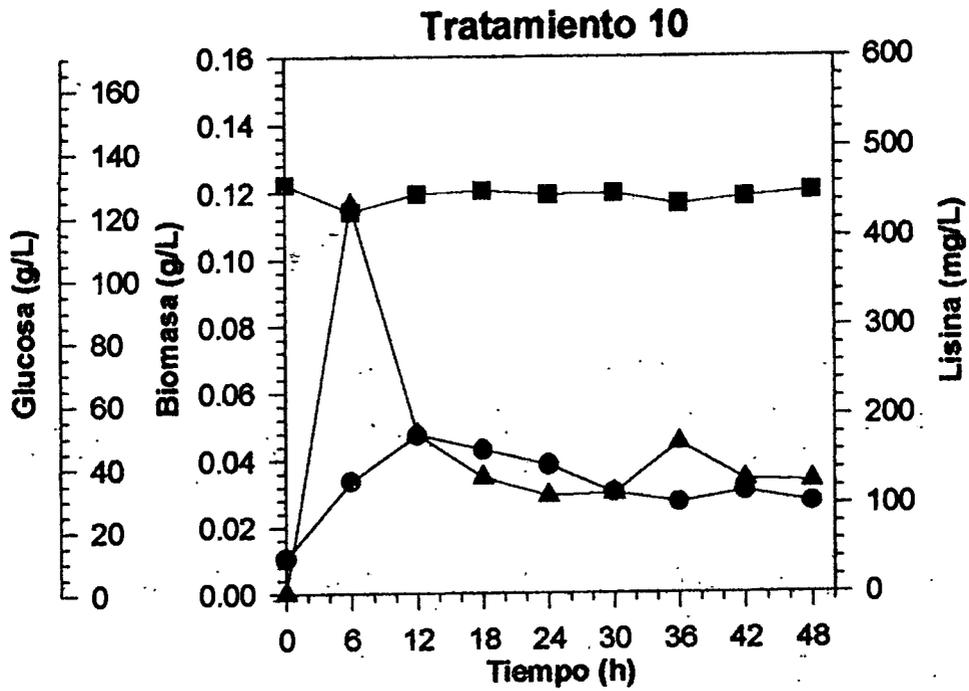
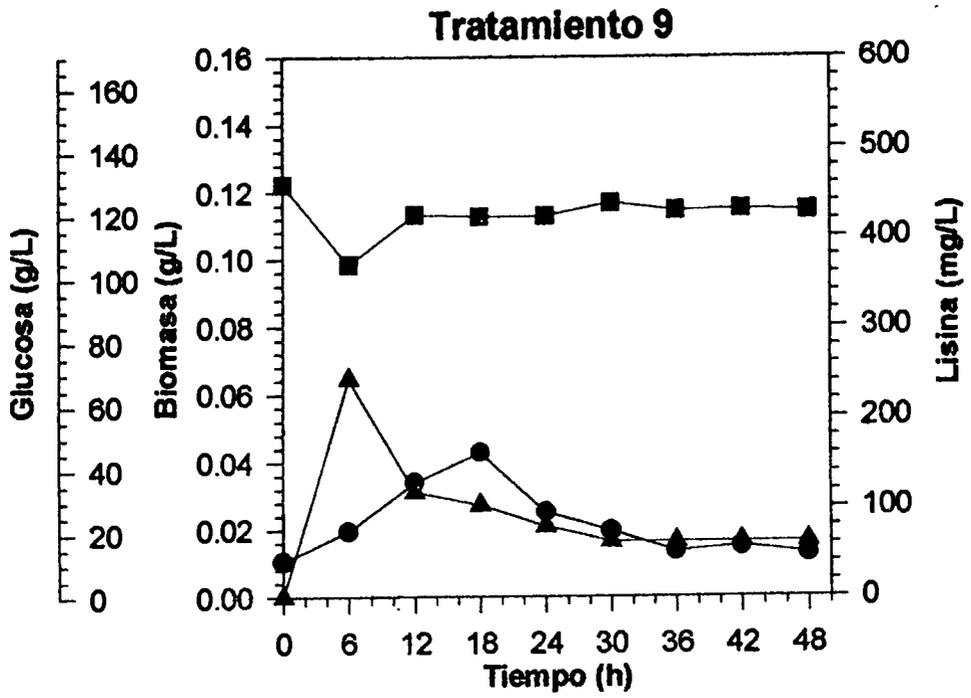
Figura 8. Producción de biomasa (●) y de lisina (▲) y consumo de glucosa (■) por *C. glutamicum*.

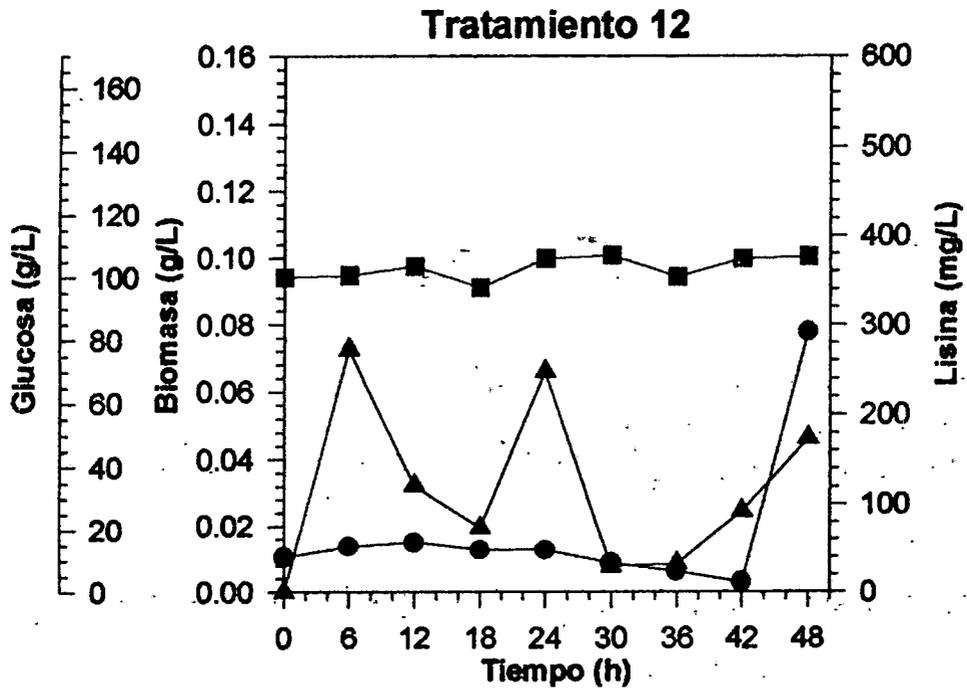
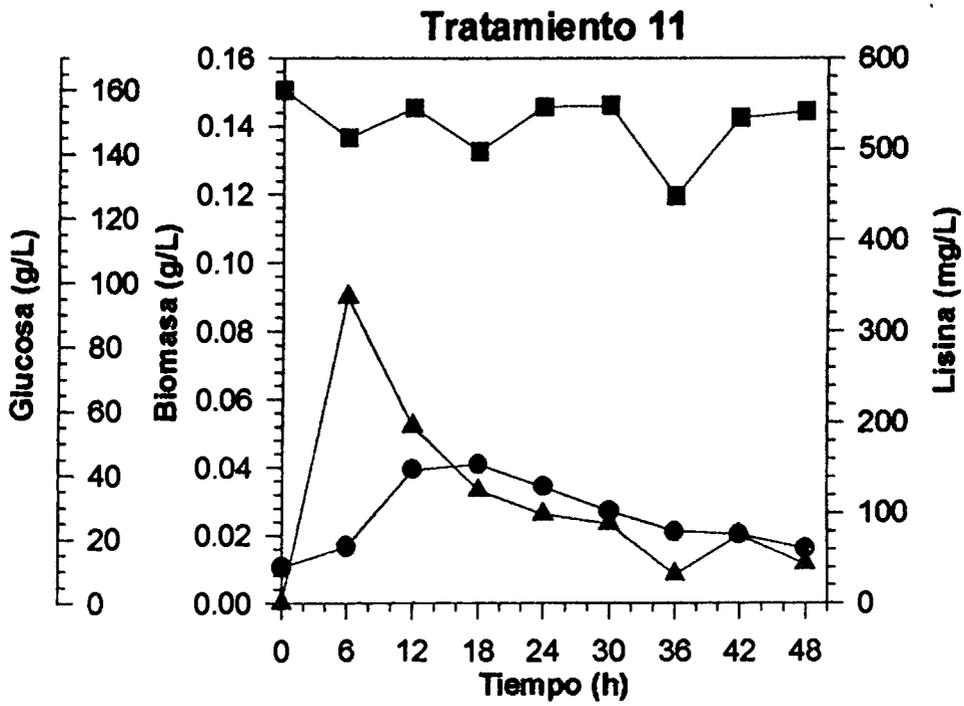


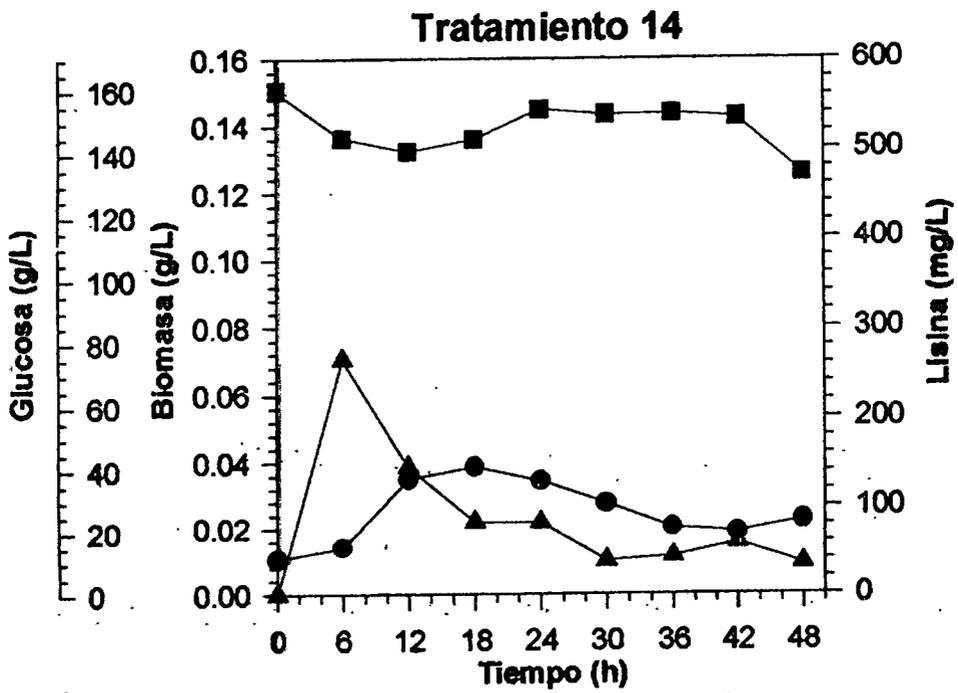
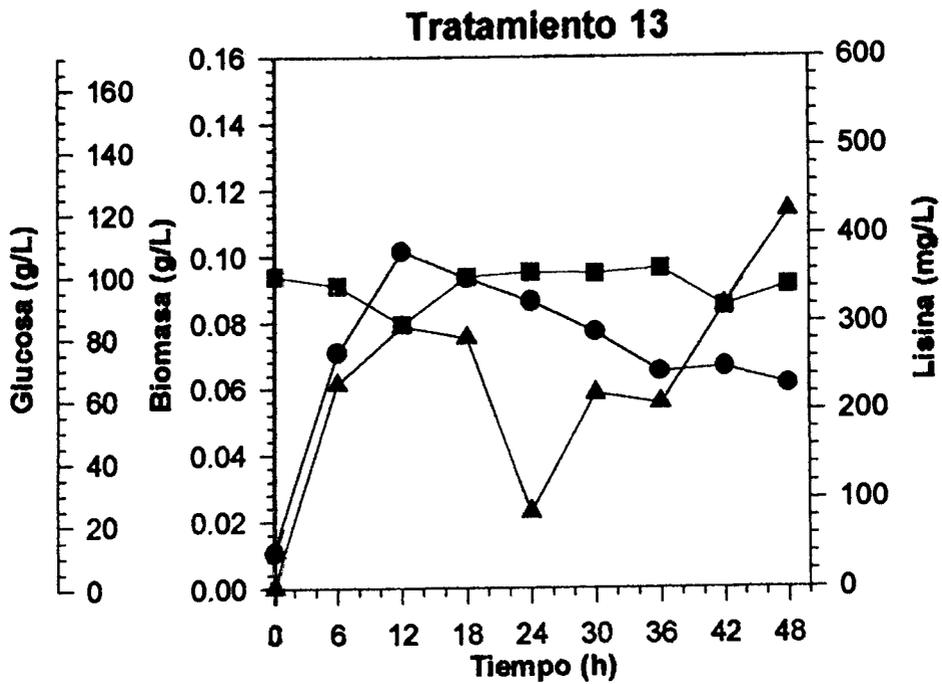


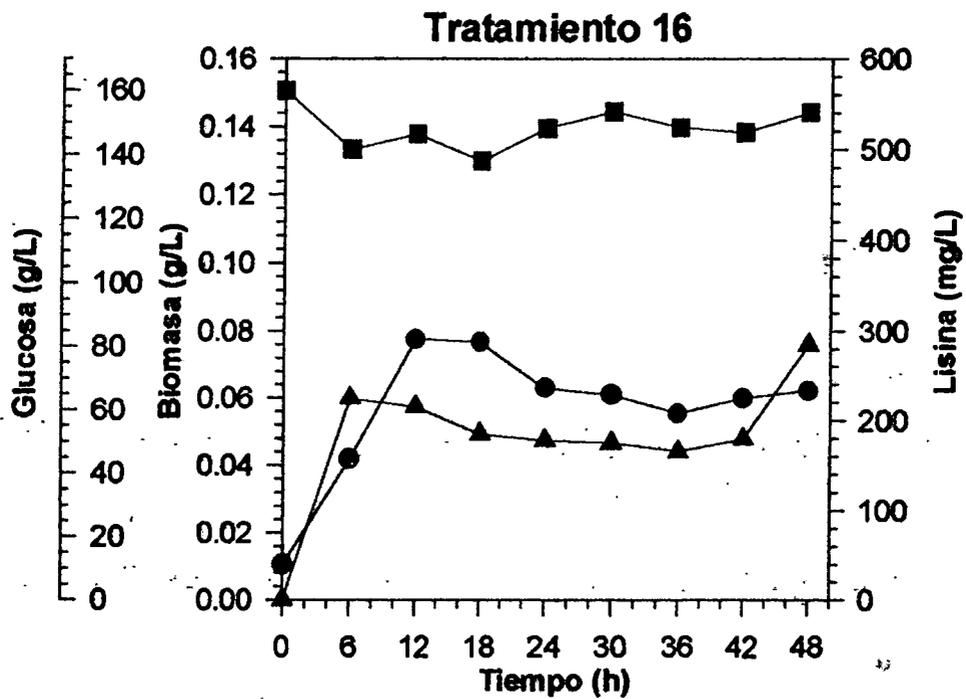
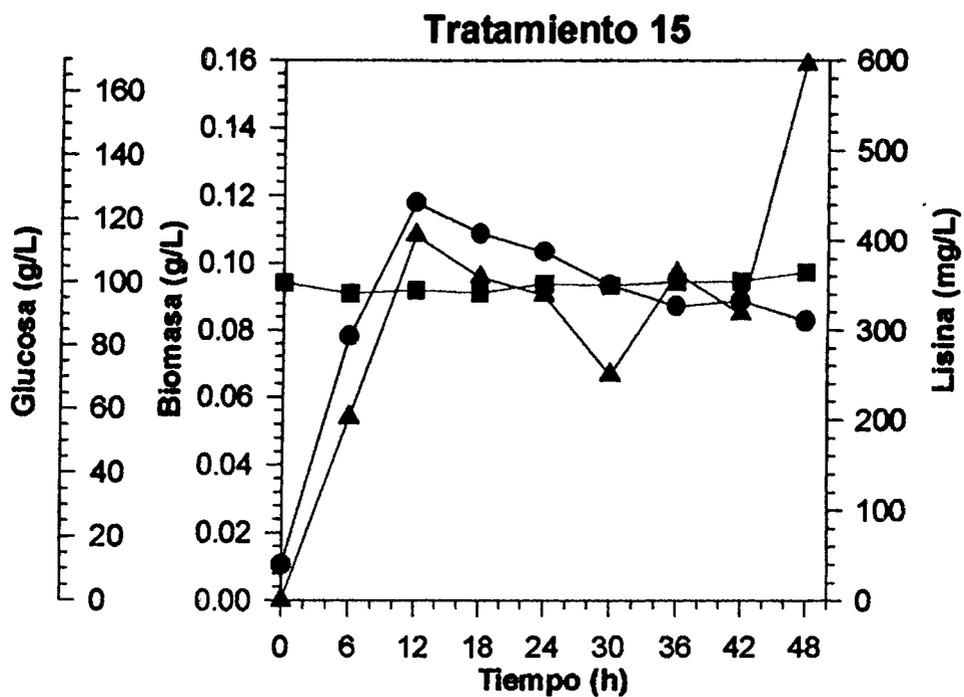


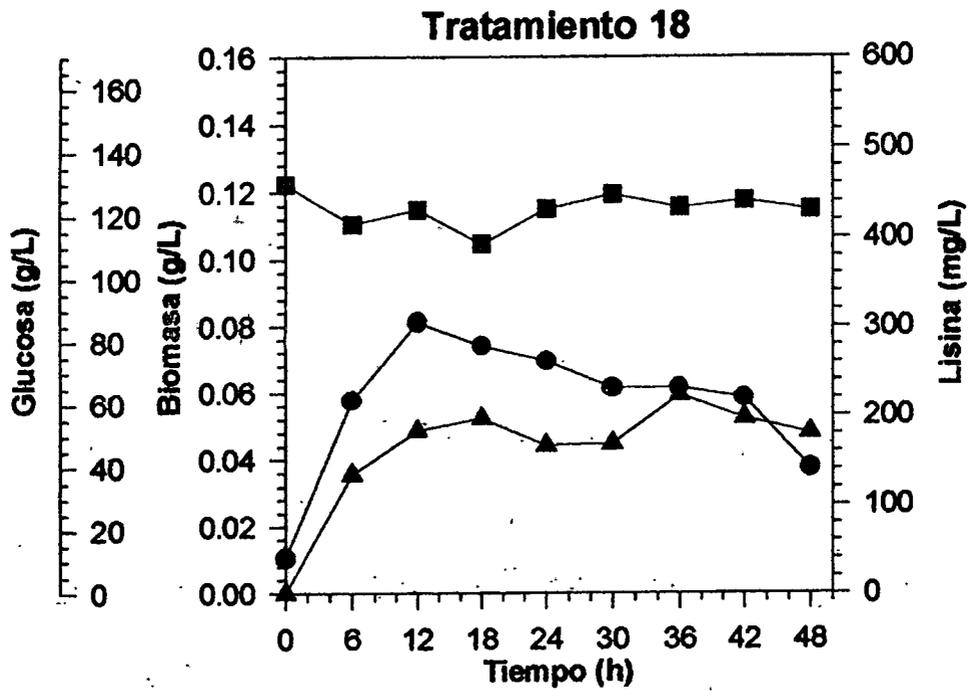
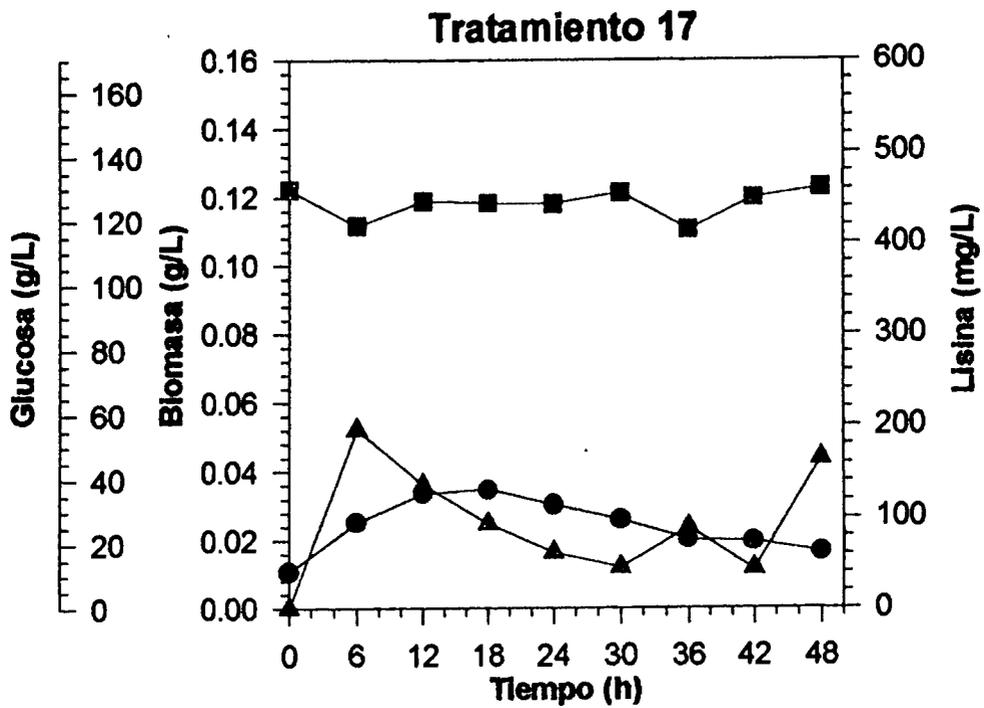


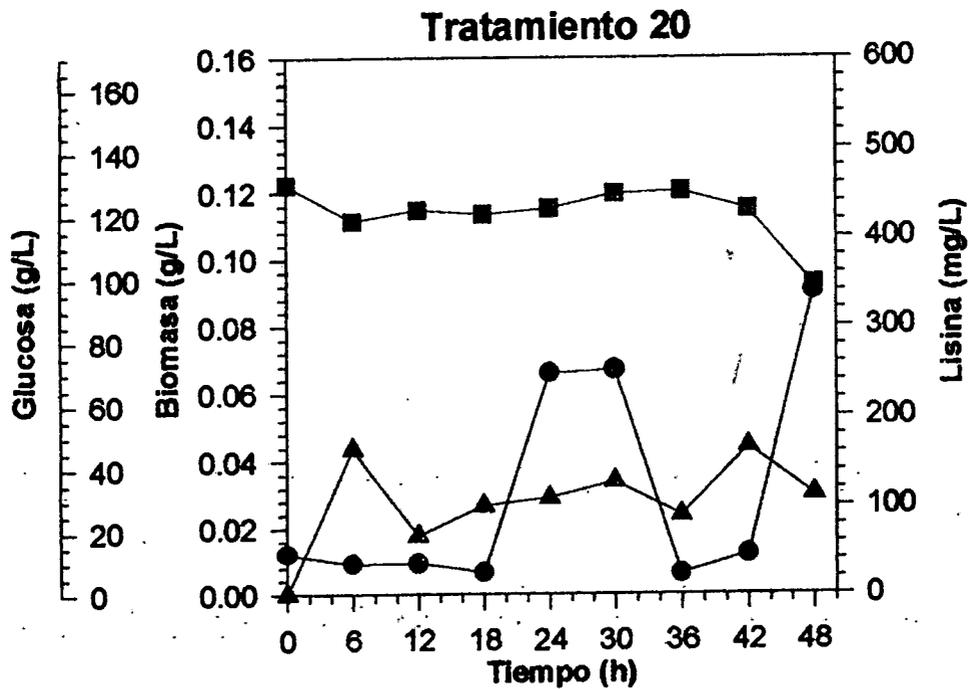
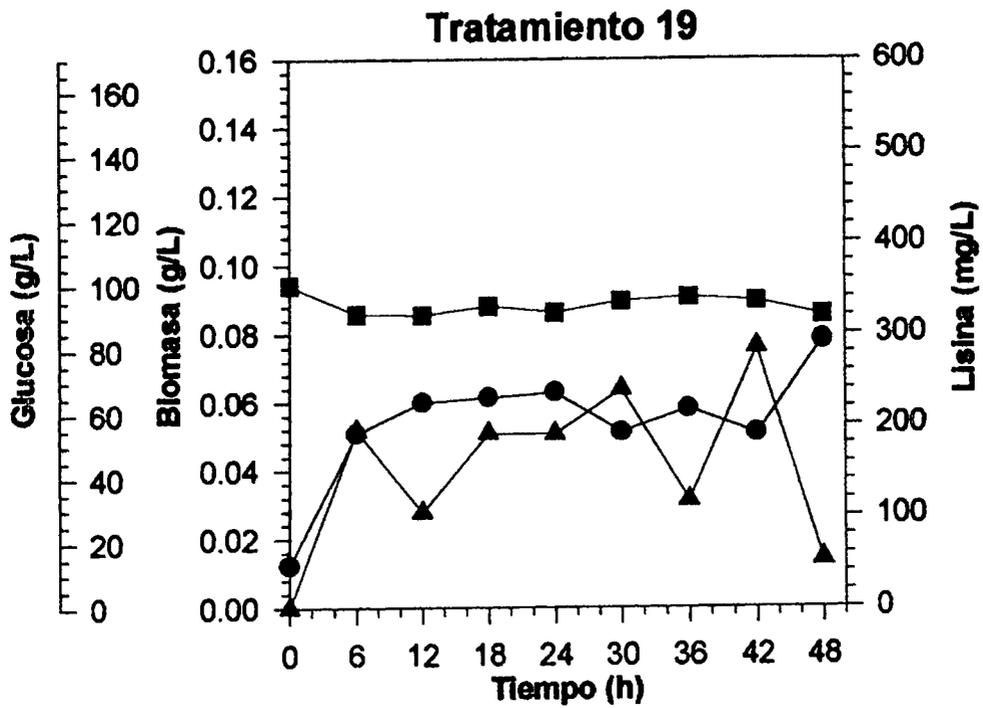


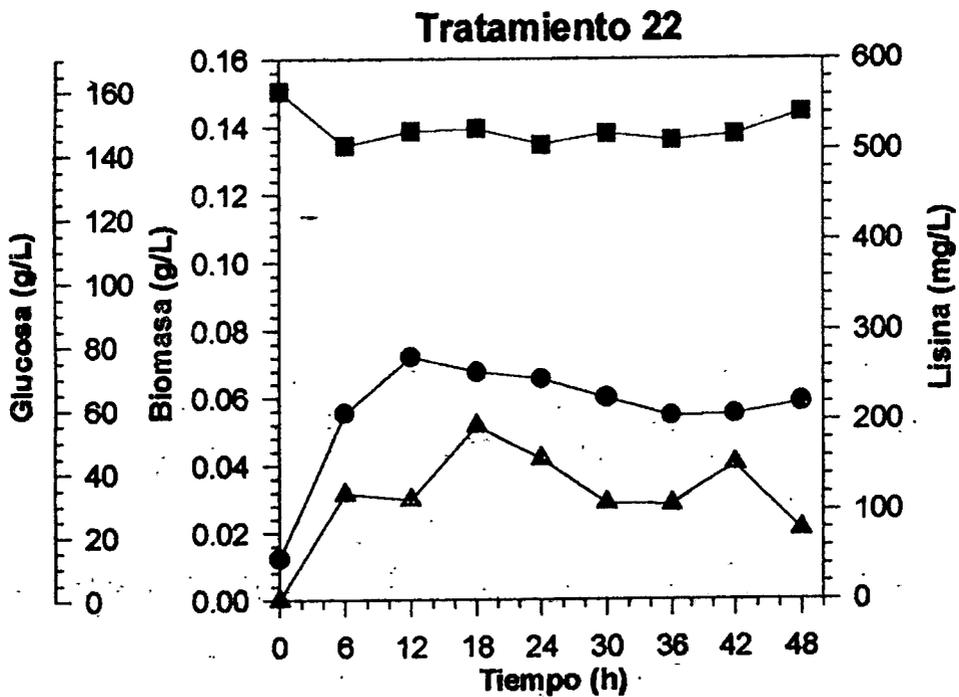
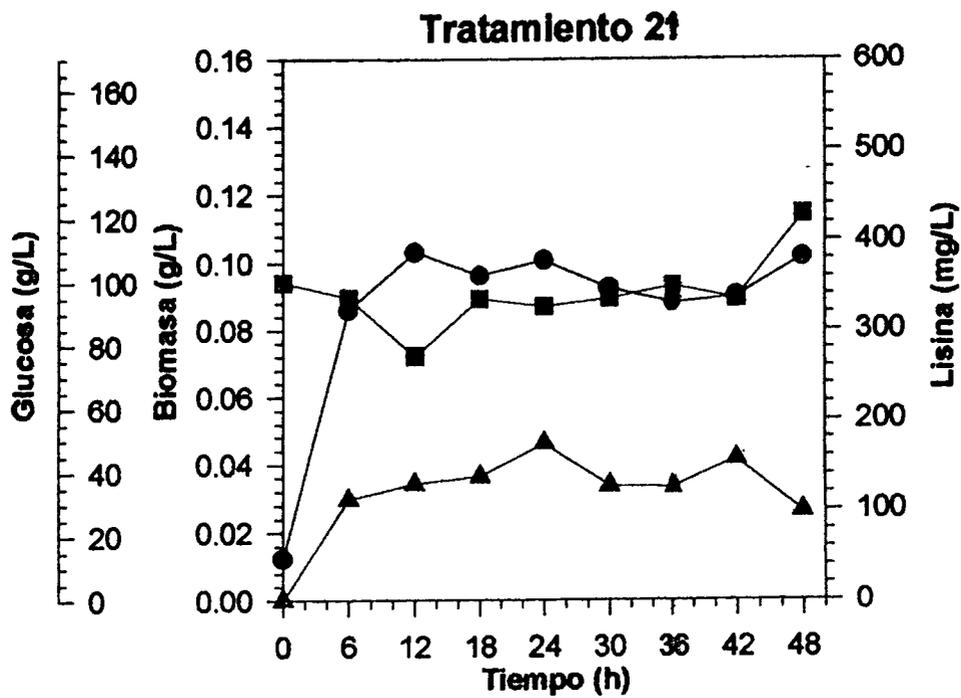


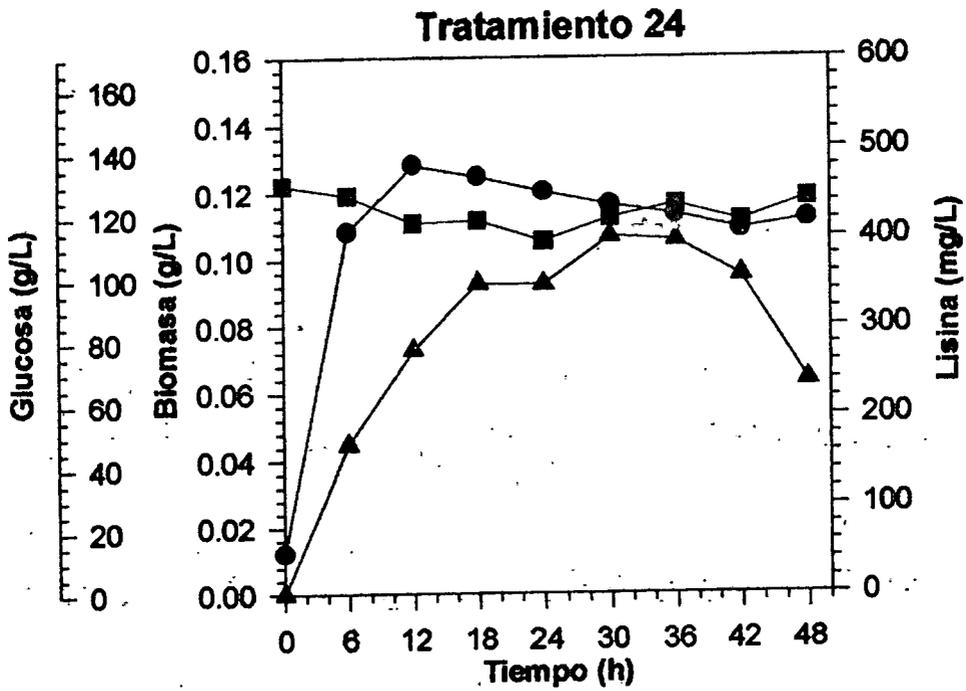
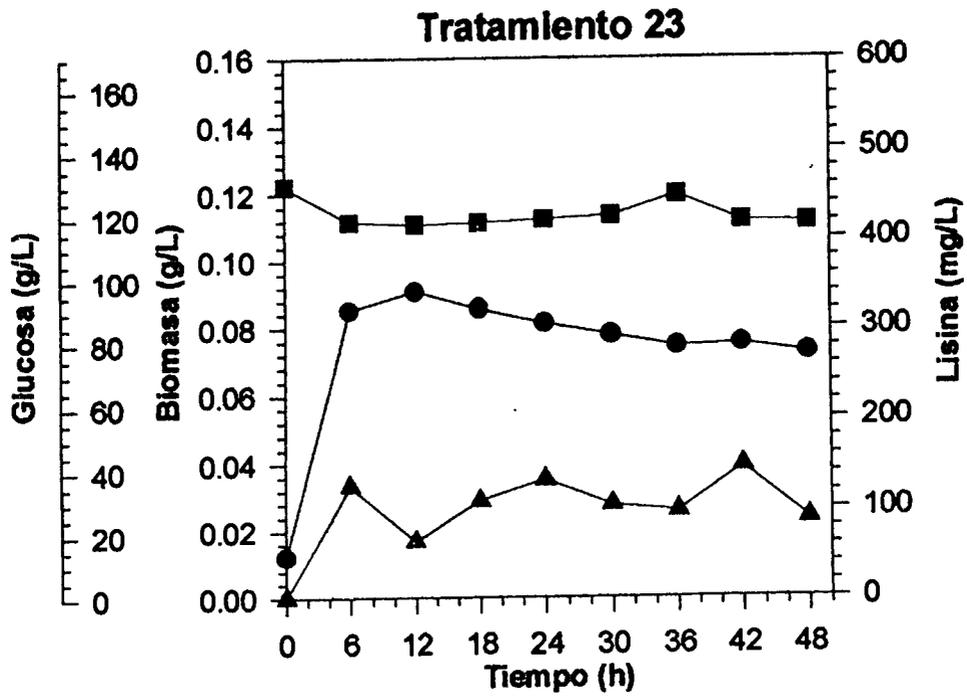


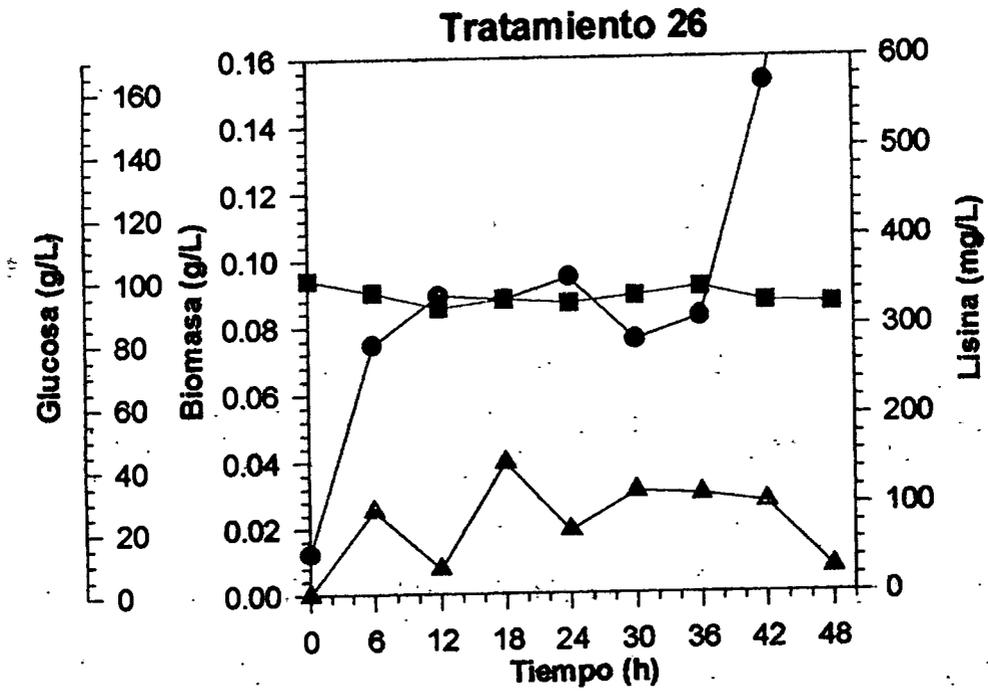
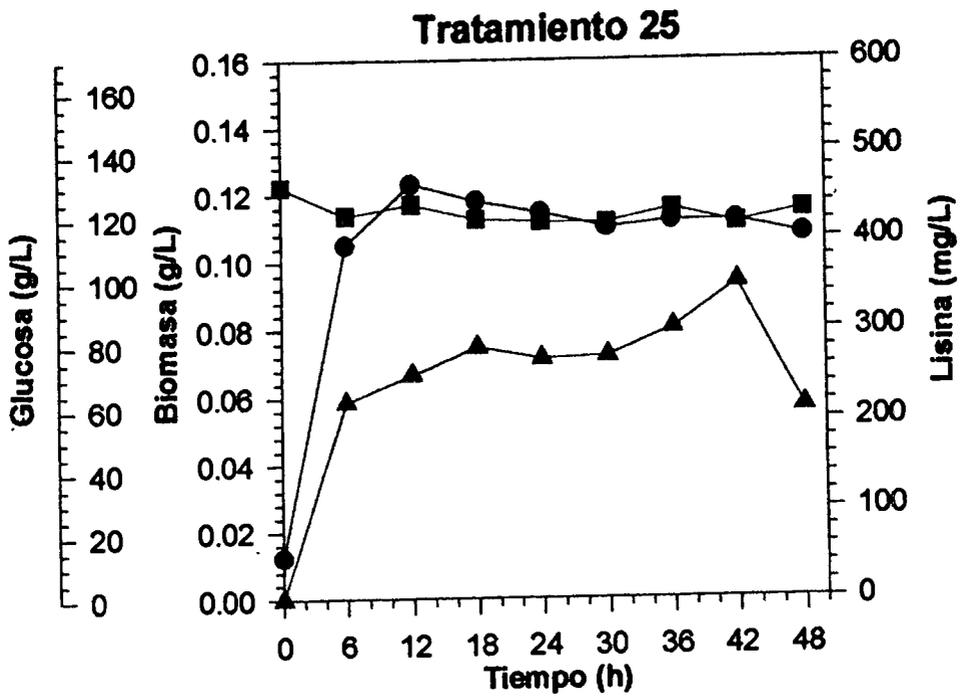


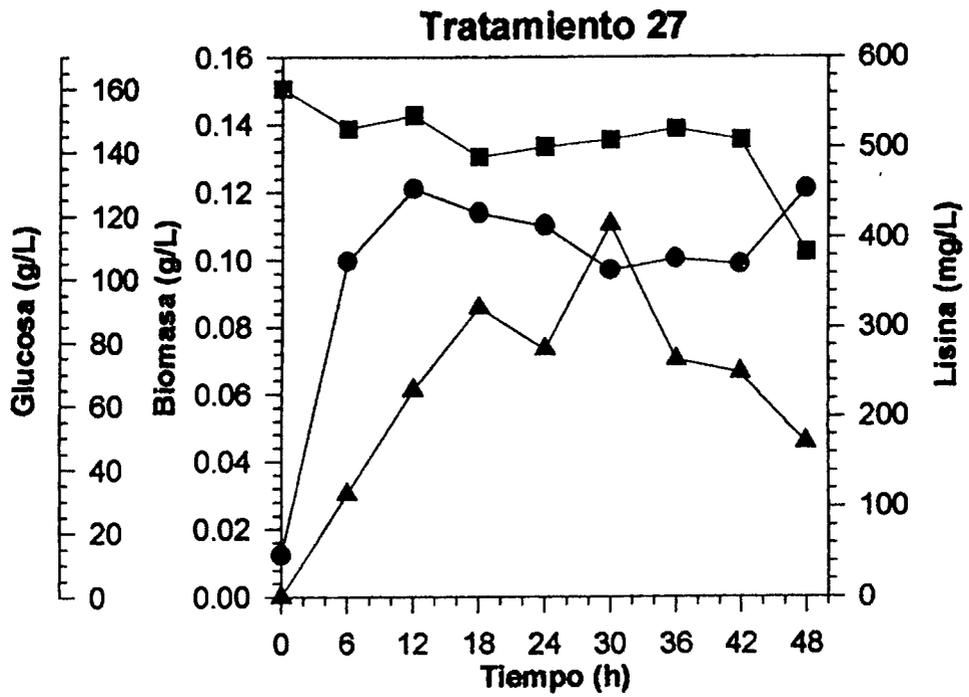












Para determinar de mejor manera el comportamiento de cada uno de los factores estudiados se procedió a realizar un análisis descriptivo del comportamiento de los diferentes niveles probados de cada uno de los 13 factores. Para ello se decidió tomar los resultados obtenidos a las 6 horas de fermentación dado que a este tiempo se produjo la mayor cantidad de lisina puesto que 17 de los 27 tratamientos mostraron la mayor producción de lisina. De esta manera se tiene para cada una de las variables el siguiente análisis estadístico.

GLUCOSA

Como se puede apreciar en la figura 9, de las tres concentraciones de glucosa empleadas en los diferentes tratamientos, no hay una concentración de la fuente de carbono con la que se obtenga una producción predominantemente mayor de lisina, sino que a los diferentes tiempos hay una concentración de glucosa óptima distinta. Este comportamiento puede ser debido en parte al escaso consumo de la glucosa durante el transcurso de la fermentación.

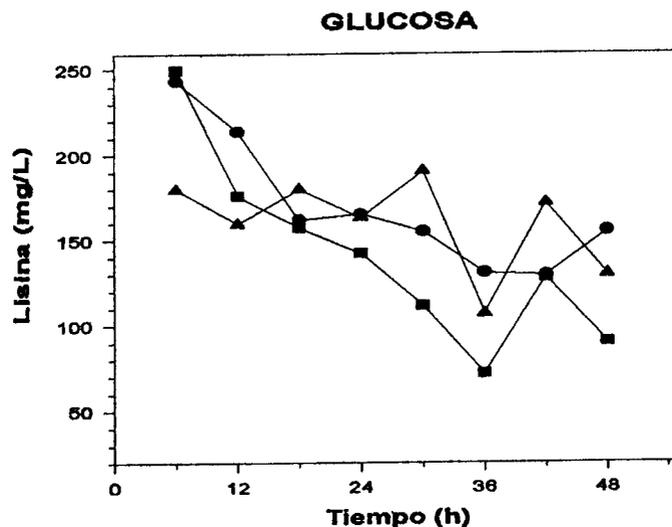


Figura 9. Comportamiento de la producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de glucosa. 100 g/L (●), 130 g/L (■) y 160 g/L (▲)

Se sabe que para la producción de lisina es necesario proveer una fuente de carbono, al medio de cultivo, en este caso se utilizó glucosa como fuente de carbono.

aunque existen otras fuentes de carbono como lo son la melaza, acetato, lactato y mezclas de glucosa/lactato y lactato/acetato (Cocaign et al., 1993; Hirao et al., 1989). Se ha publicado que la fuente de carbono afecta marcadamente la conversión de biomasa que se tiene (productividad) modificando con ello la producción de lisina ya que su producción está estrechamente asociada con el desarrollo bacteriano (Hollander et al., 1994; Hirao et al., 1989).

Peters-Wendish y colaboradores (1997) sugieren que la enzima piruvato-carboxilasa es regulada por la naturaleza de la fuente de carbono en el medio de cultivo. De esta manera, si *Corynebacterium glutamicum* es crecido en un medio de cultivo que contiene lactato o piruvato como única fuente de carbono, la actividad de la enzima piruvato-carboxilasa es alta (45 nmol/min/mg de peso seco) y es de 2 a 3 veces menos si se cultiva en presencia de glucosa o acetato como única fuente de carbono.

FOSFATO DE POTASIO

En la figura 10 se puede ver que la mejor concentración de fosfato de potasio a utilizar es la correspondiente a 0.5 g/L puesto que con esta concentración se obtiene la mayor concentración de lisina durante todo el transcurso de la fermentación. Se puede apreciar también que a las 6 y 48 horas se podrían obtener mayores cantidades de lisina utilizando concentraciones menores a la antes mencionada de fosfato de potasio.

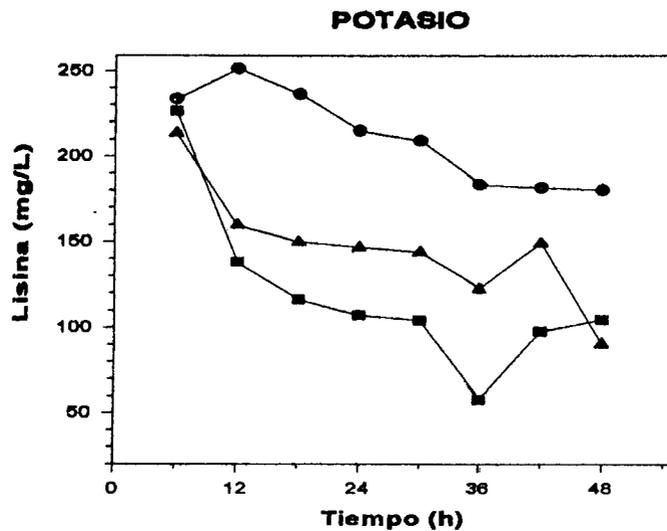


Figura 10. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de fosfato de potasio. 0.50 g/L (●), 1.0 g/L (■) y 1.50 g/L (▲).

El uso de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) provee el fósforo necesario para la producción de energía en forma de ATP en conjunto con la glucosa, por otro lado, puede actuar también como amortiguador en el medio de cultivo dada su capacidad que tiene de donar protones H^+ (Cocaign et al., 1993).

SULFATO DE MAGNESIO

El magnesio interviene de manera importante en la fijación no autotrófica de bióxido de carbono, ya que proporciona un mecanismo para la síntesis de compuestos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos de los productos del metabolismo de los carbohidratos. Una de estas reacciones, catalizada por magnesio es la formación de oxalacetato más ATP a partir de fosfoenolpiruvato, ADP y CO_2 . Otra reacción, que además de este elemento requiere biotina, es la formación de axalacetato, ADP y P_i a partir de ATP, piruvato y CO_2 , (Pelczar, et al., 1977).

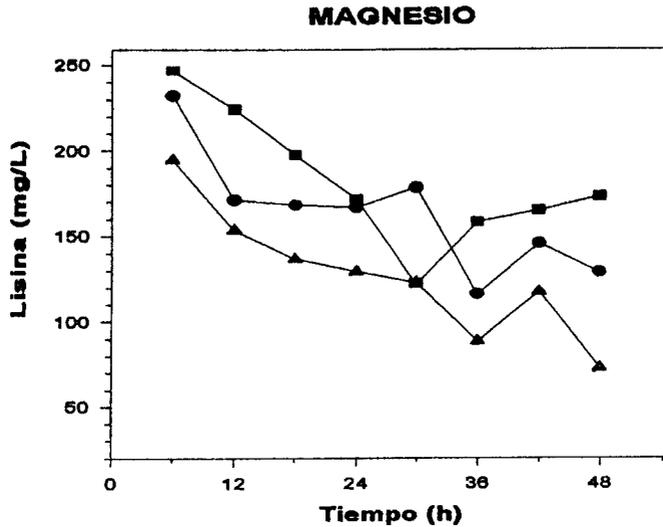


Figura 11. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de magnesio. 0.20 g/L (●), 0.40 g/L (■) y 0.60 g/L (▲).

Los resultados que se muestran en la figura 11 indican que la mejor concentración a utilizar es la correspondiente a 0.4 g/L, considerando que el tiempo elegido es a las 6 horas.

SULFATO DE HIERRO

Una de las funciones principales que desempeña el hierro en los sistemas microbiológicos es la de mantener activa la cadena respiratoria, los citocromos. De esta manera, este elemento es el responsable de las propiedades oxidantes o reductoras de los citocromos. La figura 12 muestra que hay una variabilidad a través del tiempo en cuanto a la mejor concentración de hierro a utilizar ya que la concentración de este elemento con la que se obtiene la máxima concentración de lisina es diferente.

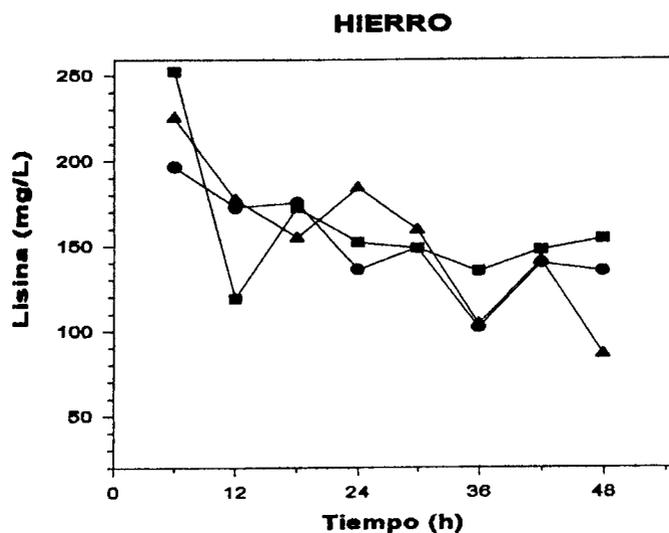


Figura 12. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de hierro. 0.0050 g/L (●), 0.010 g/L (■) y 0.0150 g/L (▲).

SULFATO DE MANGANESO

En cuanto a la concentración del manganeso, se puede observar en la figura 13 que de las tres concentraciones probadas, la que mejores resultados mostró a las 6 horas fue la correspondiente al nivel 2 de 0.015 n/l

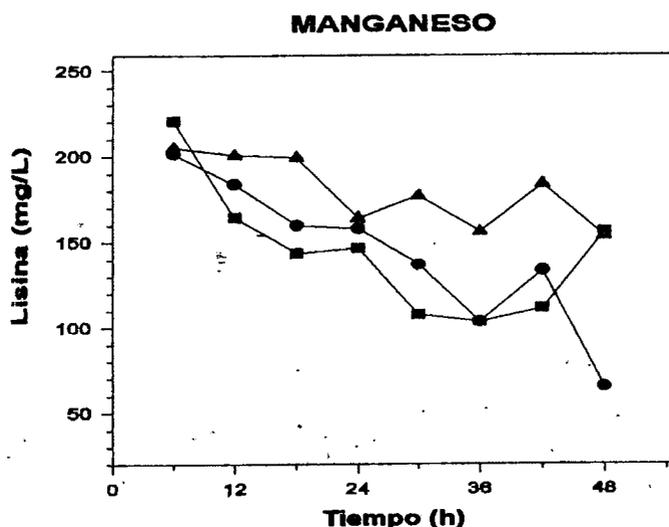


Figura 13. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de manganeso. 0.0010 g/L (●), 0.010 g/L (■) y 0.0150 g/L (▲).

SULFATO DE AMONIO

Respecto a la fuente de nitrógeno, se encontró que no hay un nivel óptimo durante la fermentación, sino que existen variaciones entre las concentraciones correspondientes a los niveles 1 y 2. Este comportamiento se puede apreciar de manera más clara en la figura 14.

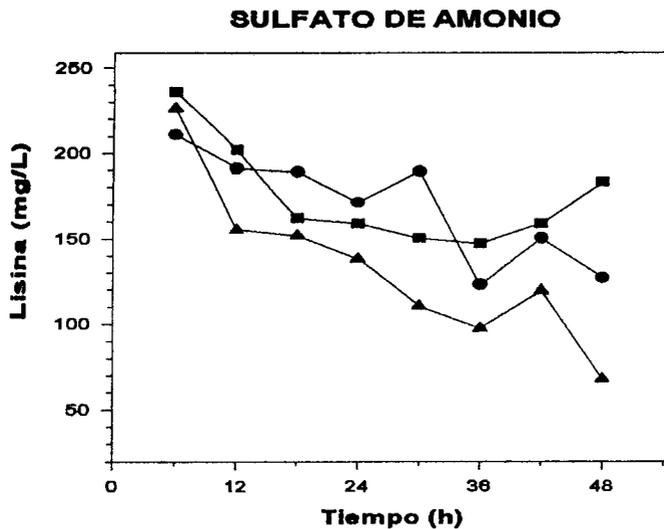


Figura 14. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de sulfato de amonio. 0.20 g/L (●), 0.40 g/L (■) y 0.60 g/L (▲).

En cuanto a la fuente de nitrógeno se ha reportado que los sistemas enzimáticos glutamina-sintetasa (GS) y glutamina-2-oxoglutarato-aminotransferasa (GOGAT) de *B. flavum*, son reprimidos a concentraciones de 5 g/L de sulfato de amonio y 5 g/L de urea (Khoiry et al., 1993). Por otra parte, De Hollander y colaboradores (1994), compararon una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con otros microorganismos y encontraron que la enzima glutamato-sintetasa es dependiente de energía y que la reacción es preferible a bajas concentraciones de amonio mientras que a concentraciones elevadas de amonio la reacción que cataliza la glutamato-deshidrogenasa es más activa.

DL-ALANINA

Las 3 concentraciones de DL-alanina probadas en los caldos de fermentación, muestran que no hay un nivel óptimo durante las 48 horas de fermentación, sino que los niveles tienen un comportamiento mixto entre ellos. En la figura 15, se puede observar que la mejor concentración de lisina obtenida a las 6 horas fue con 0.35 g/L.

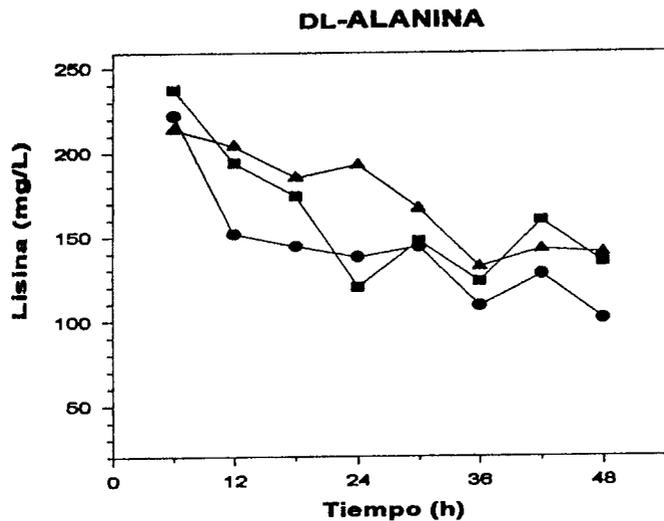


Figura 15. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de DL-alanina. 0.30 g/L (●), 0.35 g/L (■) y 0.40 g/L (▲).

BIOTINA

El comportamiento que muestran las 3 diferentes concentraciones de biotina probadas en los experimentos, según la tendencia que se muestra en la figura 16, sugieren que la mejor concentración de lisina se obtiene utilizando la concentración de 75 $\mu\text{g/L}$. La tendencia que muestran los tres niveles estudiados de biotina, en los tratamientos realizados, muestran que podrían obtenerse mejores resultados utilizando concentraciones mayores, esto concuerda con lo reportado por Peters-Wedisch y colaboradores (1997), donde encontraron que a mayores concentraciones de biotina hay una mayor producción de lisina.

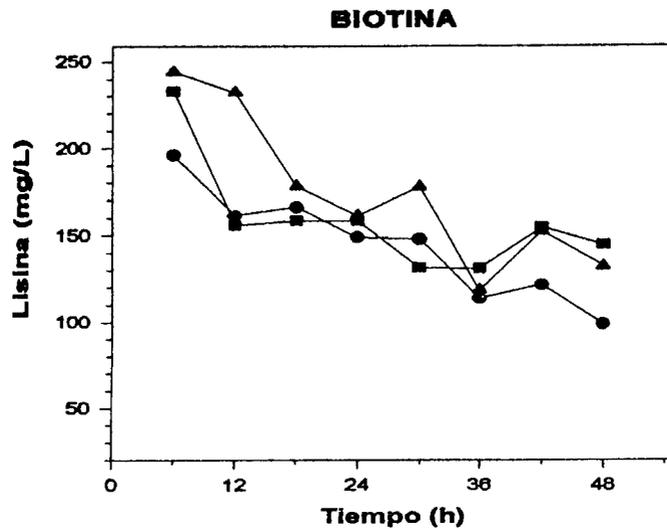


Figura 16. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de biotina. 25 µg/L (●), 50 µg/L (■) y 75 µg/L (▲).

Los grupos de investigadores de Kholy (1993) y de Bu`lock (1987) mencionan que las células de *Corynebacterium glutamicum* secretan grandes cantidades de glutamato bajo condiciones limitantes de biotina, además reportan que concentraciones de 1 µg/L de biotina reducen la concentración interna de glutamato y a concentraciones de 200 µg/L de biotina se incrementa la concentración intracelular de glutamato. Wihardja y colaboradores (1993) publicaron que el piruvato es preferencialmente convertido a oxalacetato por la enzima piruvato-descarboxilasa, la cual es dependiente de biotina (500 µg/L) provocando con ello un incremento en el flujo de carbono hacia la síntesis de lisina. Domínguez y colaboradores (1993) señalan que bajo condiciones en las cuales se modifica la permeabilidad de la membrana por limitaciones de biotina en el medio o por la adición de agentes surfactantes al medio de cultivo, las células de *Corynebacterium glutamicum* acumula altas concentraciones de ácido glutámico en el medio de cultivo.

Peters-Wendish y colaboradores (1997) señalan que las células de *Corynebacterium glutamicum* desarrolladas en medios con bajas concentraciones de biotina, menores a 5 µg/L, la actividad de la enzima piruvato-carboxilasa (PCx) fue

drásticamente reducida, indicando que esta enzima es dependiente de biotina. Además, experimentos que realizaron les indicaron que tanto la cepa silvestre así como otra cepa modificada deficiente de la enzima fosfoenol-piruvato-carboxilasa de *Corynebacterium glutamicum* cultivadas en un medio de cultivo con glucosa como única fuente de carbono mostró una mayor demanda de biotina la cepa modificada en comparación con la cepa silvestre; mientras que ambas cepas demandaron mayores concentraciones de biotina para crecer en medios de cultivo con lactato como fuente de carbono y además, requieren menores concentraciones de biotina para desarrollar en medios de cultivo con acetato como única fuente de carbono.

TIAMINA

Como se observa en la figura 17, existen diferentes concentraciones óptimas a diferentes tiempos con las que se pueden obtener las mejores concentraciones de lisina. Para el análisis de las 6 horas, la mejor concentración es la correspondiente a 250 $\mu\text{g/L}$. De la misma manera que para la biotina, se podrían obtener mejores resultados utilizando concentraciones mayores a la correspondiente al nivel 3 según lo muestra la tendencia de los niveles estudiados.

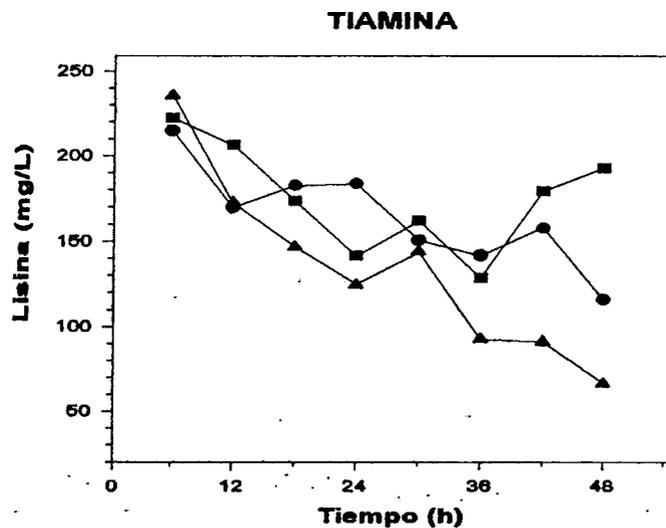


Figura 17. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de tiamina. 150 $\mu\text{g/L}$ (●), 200 $\mu\text{g/L}$ (■) y 250 $\mu\text{g/L}$ (▲).

NICOTINAMIDA

Las 3 concentraciones de nicotinamida utilizadas en los tratamientos muestran variaciones entre las concentraciones de 0.25 y 0.75 mg/L, siendo recomendable en las primeras 12 horas utilizar la concentración más baja, según se puede apreciar en la figura 18.

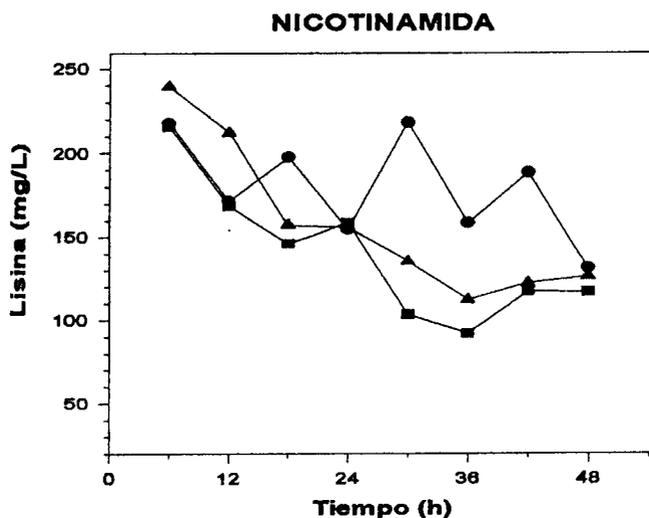


Figura 18. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de nicotinamida. 0.250 mg/L (●), 0.50 mg/L (■) y 0.75 mg/L (▲)

HIDROLIZADO DE SOYA

Como se puede apreciar en la figura 19, el comportamiento de las concentraciones de proteína es heterogéneo entre las concentraciones 10 y 15 mg/L excepto para las primeras 6 horas en las cuales la mejor concentración de proteína a utilizar es la de 20 mg/L.

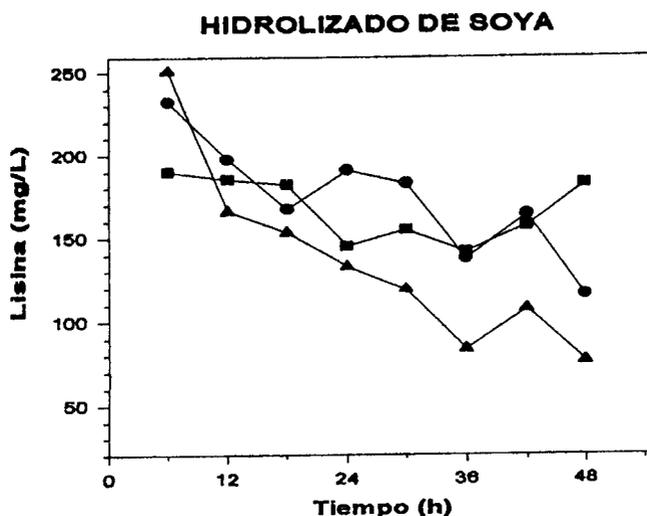


Figura 19. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de la roteinamagnésio. 10 mg/L (●), 15 mg/L (■) y 20 mg/L (▲).

Otra de las variables a estudiar en este trabajo fue la concentración de proteína. Como fuente de proteína se utilizó la harina de soya hidrolizada. Velizarov y colaboradores (1992) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura, 0 a 15 g/L, y encontraron que a concentraciones bajas (0.2 g/L) se obtenía una mayor concentración de lisina que a concentraciones de 5 y 15 g/L respectivamente utilizando células de *C. glutamicum* inmovilizadas en alcohol polivinílico debido a que a altas concentraciones de proteína se presenta desarrollo bacteriano y no una producción de lisina.

pH

Los resultados que se obtuvieron, en cuanto al pH, indican que durante las primeras 6 horas de fermentación *Corynebacterium glutamicum* produce la mayor cantidad de lisina, no así para el resto del tiempo que duró la fermentación en el que se puede observar que el mejor valor de pH es el de 6.5 seguido del de 7.0 y 7.5. Una posible causa de este comportamiento de pH en el valor mayor puede ser debido a que en un principio sí hubo una producción de lisina pero a causa del descenso en los valores de este parámetro a inicios de la fermentación ocasionó que

la síntesis de la lisina descendiera por debajo de las concentraciones logradas con los valores medio y bajo.

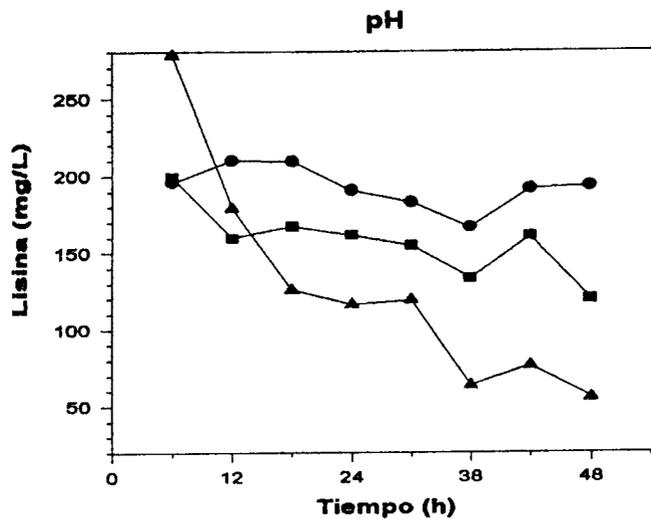


Figura 20. Producción de lisina a través del tiempo en función del valor de pH. 6.50 (●), 7.0 (■) y 7.5 (▲).

El pH óptimo de desarrollo de *Corinebacterium glutamicum* es muy cercano a la neutralidad (pH = 7.0) en este caso, como se trata de un medio de cultivo diferente en composición a los reportados, fue conveniente probar valores un tanto diferentes a los reportados.

CLORURO DE SODIO

Observando el comportamiento de las 3 diferentes concentraciones de cloruro de sodio probadas en los caldos de fermentación, se puede observar que al inicio la mejor concentración de cloruro de sodio es la correspondiente a 0.4 g/L. No obstante, después de las 12 horas la mejor concentración es la correspondiente a 0.2 g/L según como se puede apreciar en la figura 21.

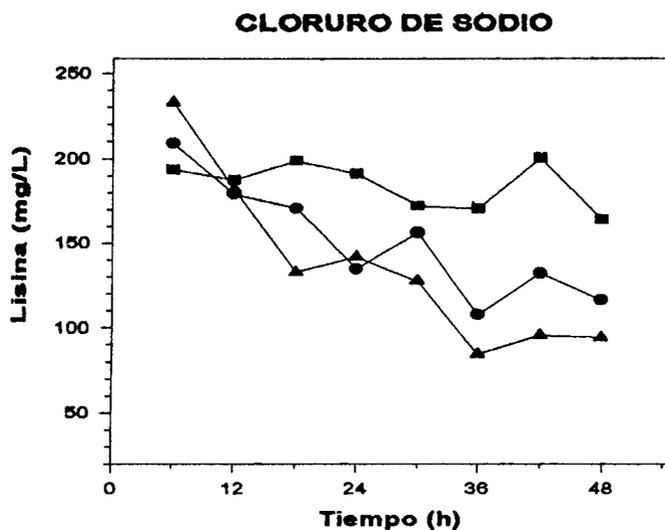


Figura 21. Producción de lisina a través del tiempo en función de la concentración de cloruro de sodio. 0.10 g/L (●), 0.20 g/L (■) y 0.40 g/L (▲).

El efecto que tiene el cloruro de sodio fue estudiado por Skjerdal y colaboradores (1995). Ellos mencionan que una elevada osmotolerancia en las bacterias gram (+) es debido a un grupo de aminoácidos intracelulares, y que el cloruro de sodio, así como la sacarosa, ácido glutámico y la propia lisina son compuestos que pueden estresar a las células bacterianas. Gillouet y colaboradores (1995) observaron que cuando se incrementa la osmolaridad del medio de cultivo de 0.4 a 2 osmol/kg se reducía la tasa de crecimiento máxima de 0.7 a 0.2 /h y la conversión de glucosa a biomasa de 0.6 a 0.3 g/g.

Al analizar de manera conjunta las figuras 8 (del tratamiento 1 al 27) a la figura 21, muestran que predominantemente la mayor concentración de lisina se logró durante las primeras 6 horas de fermentación. Este comportamiento se presentó tanto en las gráficas de las 27 cinéticas, correspondiente a los 27 tratamientos, así como en las correspondientes a las 13 variables estudiadas. Dado este comportamiento, se procedió a analizar los resultados obtenidos, de los 27 tratamientos, correspondientes a las primeras 6 horas de fermentación.

En la figura 22 se puede observar que al graficar los 8 diferentes tiempos de muestreo de los 27 tratamientos contra la concentración de lisina alcanzada se obtiene que la mayor concentración de lisina se obtuvo en las primeras 6 horas con variabilidad menor hacia valores mayores.

Cabe mencionar que la que se presentó en los tratamientos realizados esta dada en parte por la falta de repeticiones de los tratamientos ya que no se realizaron replicas.

Haciendo un diagrama de cajas para cada una de las 13 variables estudiadas en sus tre niveles y exclusivamente a las 6 horas de fermentación, primer tiempo de muestreo, se puede apreciar de una manera muy clara la tendencia y el comportamiento de cada una de las variables así como su variabilidad con un nivel de significancia del 95% utilizando la prueba de Tukey, Figura 23.

Figura 22. Concentraciones de lisina alcanzadas en los diferentes tiempos de muestreo por los 27 tratamientos.

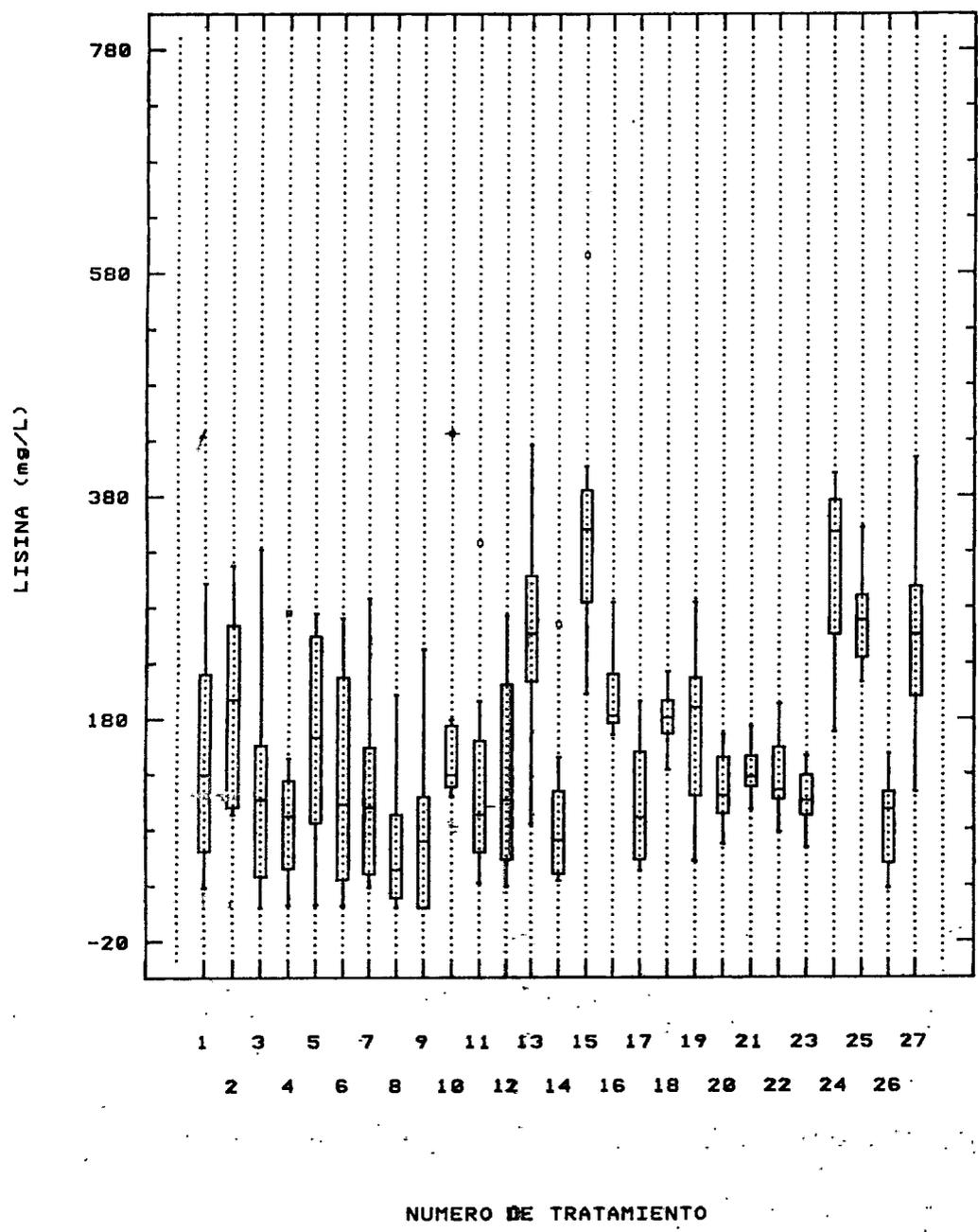
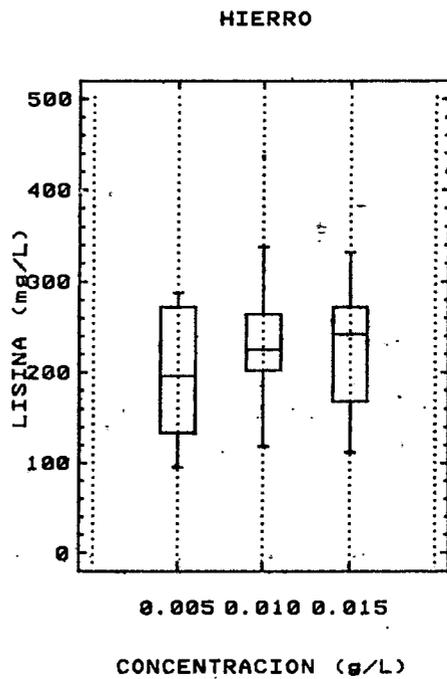
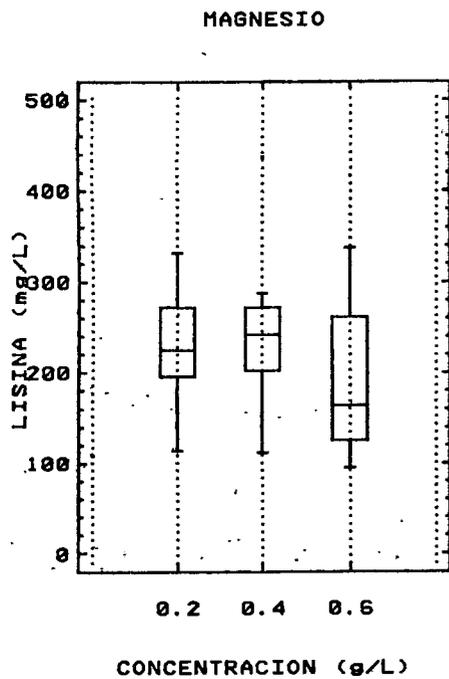
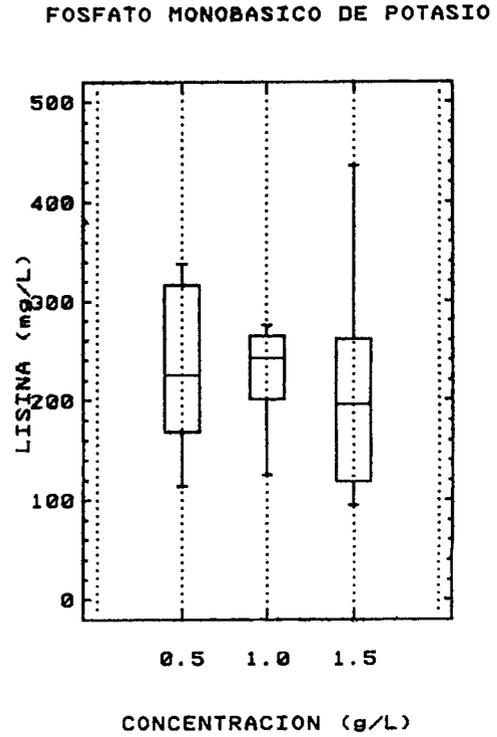
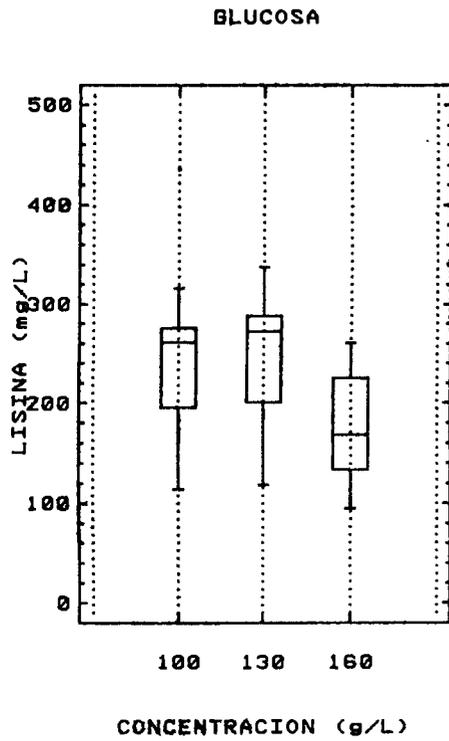
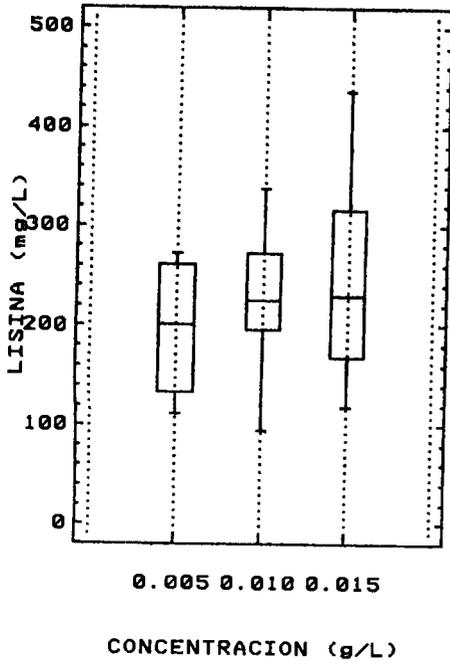


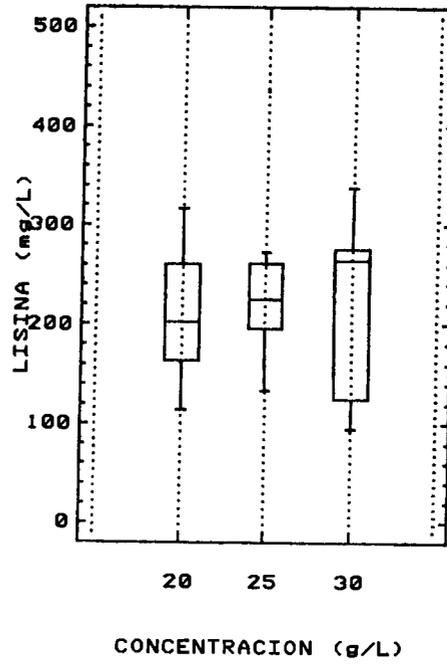
Figura 23. Niveles óptimos de las variables a las 6 horas de fermentación.



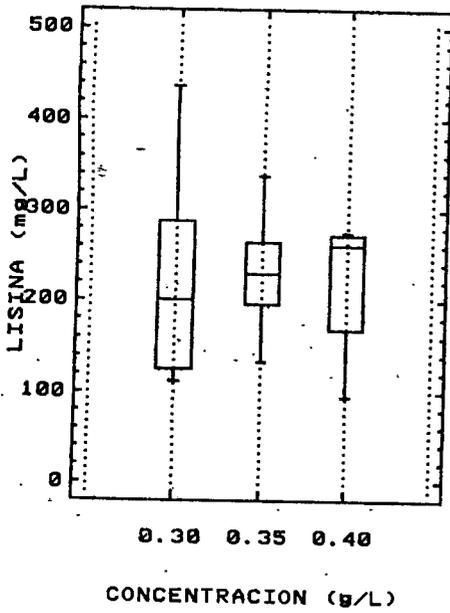
MANGANESO



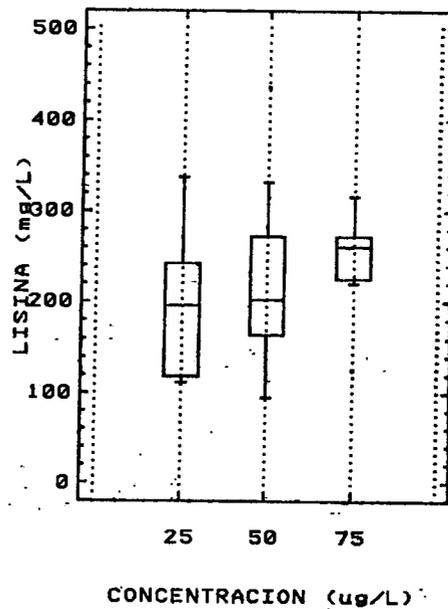
SULFATO DE AMONIO



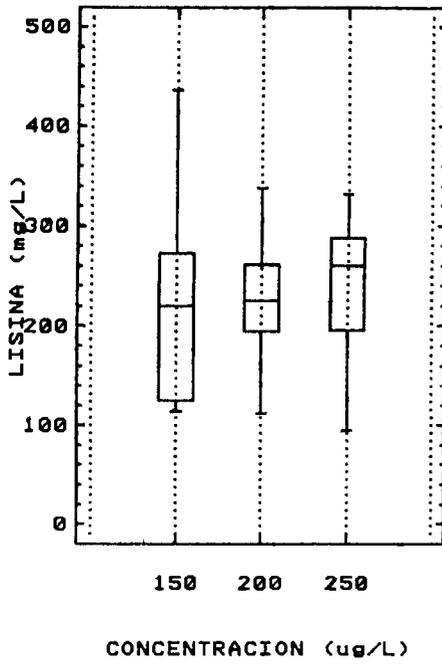
DL-ALANINA



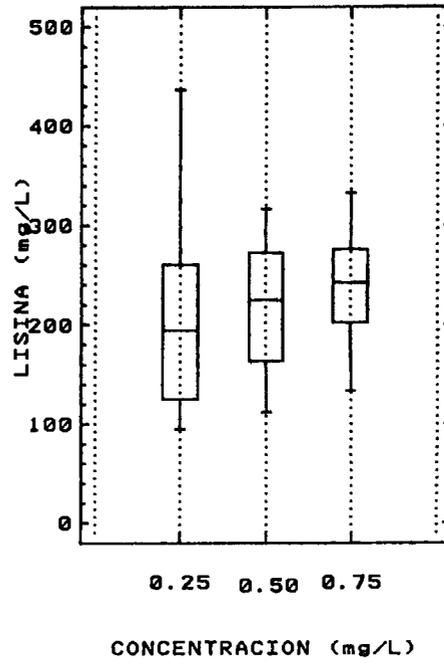
BIOTINA



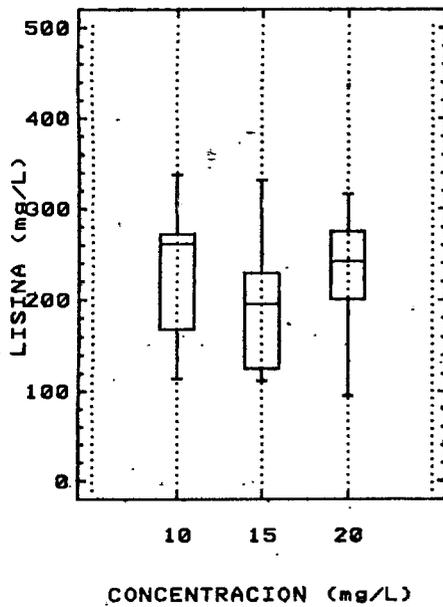
TIAMINA



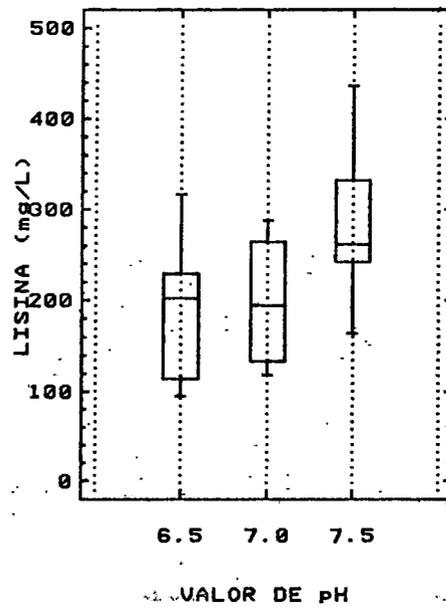
NICOTINAMIDA



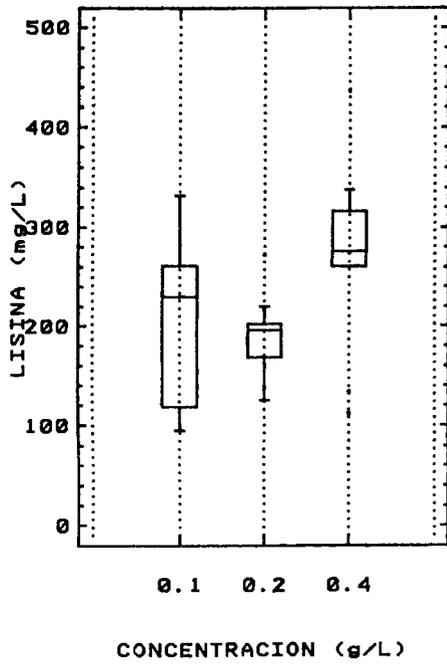
HIDROLIZADO DE SOYA



pH



CLORURO DE SODIO



Considerando el comportamiento de las cajas de la figura 23 se tiene que los niveles de cada uno de los factores que mejores resultados mostraron son: para glucosa nivel 2; fosfato de potasio monobásico nivel 2; sulfato de magnesio nivel 2; sulfato de hierro nivel 3; sulfato de manganeso nivel 3; sulfato de amonio nivel 3; DL-alanina nivel 3; biotina nivel 3; tiamina nivel 3; nicotinamida nivel 3; hidrolizado de soya nivel 1; pH nivel 3 y cloruro de sodio nivel 3.

De esta manera, la respuesta óptima a las 6 horas se puede obtener, según un análisis descriptivo de cada una de las variables estudiadas a ese tiempo, combinando el nivel de cada una de las variables en las que se obtuvo la mayor concentración de lisina.

Respuesta óptima a las 6 horas = Y_{op}

$$Y_{op} = Y_{A2} + Y_{B1} + Y_{C2} + Y_{D2} + Y_{E2} + Y_{F2} + Y_{G2} + Y_{H3} + Y_{I3} + Y_{J3} + Y_{K3} + Y_{L3} + Y_{M3} - 12(Y)$$

Si se sustituyen los valores de cada Y_{op} de las 13 variables, correspondientes a las 6 horas de fermentación, podemos obtener el valor óptimo de Y_{op} tomando el valor promedio de $Y = 222.57$ mg/L.

$$Y_{op} = 140.77 + 211.33 + 182.39 + 160.15 + 144.15 + 174.78 + 160.97 + 174.57 + 134.32 + 157.65 + 136.28 + 126.64 + 136.60 - 12(222.57)$$

De esta manera el valor óptimo de Y_{op} es:

$$Y_{op} = 569.76 \text{ mg/L.}$$

6. CONCLUSIONES

Las concentraciones de lisina obtenidas durante las primeras 6 horas de fermentación indican que la síntesis de éste Aa se inició poco antes y después de este tiempo, ya que en 15 caldos de fermentación diseñados alcanzaron la máxima concentración a este tiempo, 436.25 mg/L. De los 12 caldos restantes en 6 de ellos la producción de lisina se mantuvo hasta las 12 horas, alcanzándose una concentración máxima de lisina de 406.22 mg/L, mientras que en 3 a las 18 horas y uno a las 24 horas con concentraciones máximas de lisina de 359.77 mg/L y 347.81 mg/L respectivamente.

Una de las posibles causas por las que no se continuó la síntesis de la lisina a lo largo de la fermentación es el efecto del pH sobre el desarrollo y la actividad metabólica de *C. glutamicum*, dado que los valores de pH registrados a las 6 y 12 horas de fermentación fluctuaron entre 4.8 y 5.0; condiciones que son consideradas como muy ácidas para el desarrollo y actividad metabólica del microorganismo si se les compara con el pH de desarrollo óptimo reportado que es de 7.0 o muy cercano a este.

Por otro lado, se puede considerar también que el agotamiento de alguno de los ingredientes del medio de fermentación como lo son aminoácidos, las vitaminas, específicamente la biotina, pudieron haber ocasionado el bloqueo de la ruta biosintética de la lisina en una determinada reacción.

La máxima concentración de lisina obtenida a las 48 horas de fermentación, 595.52 mg/L, correspondió al tratamiento número 15 sin embargo, éste podría no ser el óptimo dado el efecto de enmascaramiento que se presenta por la rápida declinación en la producción de biomasa y lisina. De esta manera, se puede decir que los tratamientos más adecuados fueron el 10, 15 y 2, aunque a diferentes tiempos de fermentación: 6, 12 y 48 horas, respectivamente.

Respecto al desarrollo bacteriano, al igual que para la producción de lisina, se encontró que en la mayoría de los tratamientos se obtuvo la mayor concentración de biomasa en las primeras horas de la fermentación. La producción de biomasa y lisina se detuvo en las primeras 18 horas de la fermentación, lo cual indica que las causas

que afectaron a la producción de biomasa pudieran ser las mismas que ocasionaron el cese en la producción de lisina.

En las primeras 6 a 12 horas de fermentación, el máximo consumo de glucosa coincidió con los niveles máximos en la producción de biomasa y lisina. Así, el poco consumo de glucosa fue para la síntesis de biomasa y lisina. Mas aun, el consumo de glucosa comparado con los valores de pH registrados conduce a establecer una relación entre el poco consumo del carbohidrato, el escaso desarrollo y producción de lisina y el pH alcanzado, durante este periodo de tiempo.

En conjunto, las concentraciones de biomasa y de lisina, así como el consumo de glucosa y los tiempos a los que se presentaron, se puede concluir que la producción de la lisina se lleva a cabo durante el desarrollo de la bacteria y, posiblemente la cepa de *C. glutamicum* no alcanzó la fase de máximo desarrollo sino que por el efecto del pH se detuvo tanto su desarrollo como la actividad metabólica, ocasionando así la disminución en el consumo de glucosa.

Finalmente, el diseño experimental utilizado en este trabajo permitió analizar el comportamiento de 13 variables. Además, este trabajo se desarrolló por primera vez como un inicio a la implementación de un sistema de fermentación continuo para la producción de lisina utilizando el medio de cultivo que rinda la máxima concentración de producto.

7. PERSPECTIVAS

Con los resultados que se tienen del presente trabajo resulta interesante realizar experimentos confirmatorios, que permitan corroborar los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico, haciendo la combinación de factores con los niveles que mostraron la máxima producción de lisina y confrontar el resultado experimental con el obtenido mediante el modelo estadístico. Por otro lado, con la finalidad de saber en que estado se encuentran las células de *C. glutamicum*, es conveniente determinar si sobrevive en las condiciones de pH que se alcanzaron, así como los límites de pH en que esta bacteria puede desarrollar y presentar actividad metabólica.

Es importante también, plantear una estrategia experimental que permita discernir de manera clara que es lo que ocasiona que se detenga la producción de biomasa (y con ello la de lisina). De tal manera que se puedan descartar, de los siguientes factores, el o los causantes de tal efecto. Dichos factores son: el agotamiento de alguno de los ingredientes, efecto del pH, muerte celular o por falta de oxigenación ya que los experimentos se realizaron sin el suministro de oxígeno al medio.

8. BIBLIOGRAFIA

- Badui, D. S., 1981. Química de los Alimentos. Primera Edición. Alhambra Mexicana Editores.
- Bu`Lock, J., Kristiansen, B. 1987. Basic Biotechnology. Academic Pres (Ed.)
- Coello, N., Pan, J. G., Labeault. 1992. Physiological aspects of L-lysine production: effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 38:259-262.
- Cocaign, M., Monnet, C., Lindley, N. D. 1993. Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use o substrate mixtures to localice metabolic bottlenecks. Applied Microbiology and Biotechnology. 40:526-530.
- Cremer, J., Eggeling, L. And Sahm, H. 1991. Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. Applied and Environmental Microbiology. 57:1746-1752.
- Domínguez, H., Nezondet, C., Lindley, N. D. and Cocaign, M. 1993. Modified carbon flux during oxigen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction. Biotechnology Letters. 15:449-454.
- De Hollander, J. A. 1994. Potencial metabolic limitations in lysine production by *Corynebacterium glutamicum* as reveled by metabolic network analysis. Applied Microbiology and Biotechnology. 42:508-515.
- Eggeling, L.; Morbach, S., Sahm, H. 1997. The fruits of molecular physiology: engineering the L-Isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology. 56:167-182.
- Eggeling, L., Oberle, S., Sahm, H. 1998. Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: Use of dapA resulting in increased flux combined with growth limitation. Applied Microbiology and Biotechnology. 49:24-30.
- Fernandez-Artigas, P., Garcia-Villanova, B., and Guerra-Hernandez E. 1999. Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. Journal of the Science of Food and Agriculture. 79:851-854.
- Gluber, M., Park, S. M., Jetten, M., Stephanopoulos, G., Sinskey A. J. 1994. Effects of phosphoenol pyruvate carboxilase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. Applied Microbiology and Biotechnology. 40:857-863.

Guillouet, S., Engasser, J. M. 1995. Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44: 496-500.

Hirao, T., Nakano, T., Azuma, T., Sugimoto, M. And Nakanishi, T. 1989. L-Lysine production in continuous culture of a L-Lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32:269-273.

Jacobs, J. A., Court, D. and Guarneros, G. 1990. Lysine and methionine overproduction by an *Escherichia coli* strain transformed with *Pseudomonas acidovorans* DNA. *Biotechnology Letters*. 12:425-430.

Kholy, B. E. R., Eikmanns, B. J., Gutmann, M. and Sahm H. 1993. Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:2329-2331.

Kiss, R. D. and Stephanopoulos, G. 1991. Metabolic activity control of the L-lysine fermentation by restrained growth fed-batch strategies. *Biotechnology Progress*. 7:501-509.

Kiss, R. D. and Stephanopoulos, G. 1992. Metabolic characterization of a L-lysine-producing strain by continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 39:565-574.

Kwong, S. C. W., Rao, G. 1991. Utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 38:1034-1040.

Lee, H. W., Pan, J. G., Lebeault. 1995. Characterization of kinetic parameters and metabolic transition of *Corynebacterium glutamicum* on L-Lysine production in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43:1019-1027.

Lehninger, A. L., 1979. *Biochemistry*. Second Ed., Worth Publishers, Inc.

Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A. A., Saham, H., Eggeling, L. 1997. Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnology and Bioengineering*. 56:168-180.

Nakayama, K. and Kinoshita, S. 1978. Chapter 6. Aminoacids in primary products of metabolism. *Economic Microbiology*, Vol. 2, Edited by Rose, A.H., School of Biological Science, University of Bath, Bath, England.

Oh, Jong-Won., Lee, Jin-Ho., Noh, Kap-Soo., Lee, Hyune-Hwan., Lee, Jae-Heung and Hyun, Hyung-Hwa. 1991. Improved L-lysine production by the amplification of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthetase in *E. coli*. *Biotechnology Letters*. 13:727-732.

Pátek, M., Bilic, M., Krumbach, K., Eikmanns, B., Sahm, H. and Eggeling, L. 1997. Identification and transcriptional analysis of the *dapB*-ORF2-*dapA*-ORF4 operon of *Corynebacterium glutamicum*, encoding two enzymes involved in L-lysine synthesis. *Biotechnology Letters*. 19:1113-1117.

Patek, M., Krumbach, K., Eggeling, L. and Sahm, H. 1994. Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme activities, structure of *leuA*, and effect of *leuA* inactivation on lysine synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:133-140.

Pelczar, M. J., Reid R. D., Chain, E. C. S. 1977. *Microbiología*. McGraw-Hill (Ed.). Cuarta edición (segunda edición en español).

Peters-Wendisch, P. G., Wendisch, V. F., Paul, S., Eikmanns, B. J. and Sahm, H. 1997. Pyruvate carboxylase as an anaplerotic enzyme in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*. 143:1095-1103.

Prenosil, J. E., Dunn, I. J., Heinzle, E. 1992 *Biocatalisyst Reaction Engineering*. In: H. Braver (Ed) *Fundamentals of Biochemical*. Vol.6. Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering Science. 492-514.

Sassi, A. H., Coello, N., Deschamps, A. M., Lebeault, J. M. 1990. Effect of medium composition on L-lysine production by a variant strain of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21513. *Biotechnology Letters*. 12:295-298.

Sassi, A.H., Deschamps, A. M. And Lebeault, J. M. 1996. Process analysis of L-lysine fermentation with *Corynebacterium glutamicum* under different oxygen and carbon dioxide supplies and redox potentials. *Process Biochemistry*. 31:493-497.

Skjerdal, O. T., Sletta, H., Flenstad, S. G., Josefsen, K. D., Levine, D. W., Ellingsen, T. E. 1995. Changes in cell volume, growth and respiration rate in response to hyperosmotic stress of NaCl, sucrose and glutamic acid in *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43:1099-1106.

Scriban, R. 1984. *Biotechnología*. El Manual Moderno (Ed.). Segunda edición.

Velizarov, S.G., Rainina, E. I., Sinitsyn, A. P., Varfolomeyev, S. D. 1992. Production of L-lysine by free and PVA-Cryogel immobilized *Corynebacterium glutamicum* cells. *Biotechnology Letters*. 14:291-296.

Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G. 1993. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. *Biotechnology and Bioengineering*. 41:633-646.

Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G. 1994. Carbon flux distribution at the glucose 6-phosphate branch point in *Corynebacterium glutamicum* during lysine overproduction. *Biotechnology Progress*. 10:327-334.

Wihardja, B. S., Cail, R.G. and Rogers, P.L. 1993. Kinetic analysis of the L-lysine production by a fluoropyruvate mutant of *B. lactofermentum*. *Biotechnology Letters*. 15:577-582.

9. APENDICE A

Solución de Biotina (50 µg/L)

Pesar 0.0026 g. de biotina y colocarlos en un matraz aforado de 50 mL. Aforar con agua destilada hasta la marca; de esta manera se obtiene una solución de biotina de 50,000 µg/L.

NOTA: Esterilizar esta solución en frío, mantener en refrigeración y utilizar en condiciones estériles.

Solución de Tiamina (200 µg/L)

Pesar 0.0100 g. de hidrocloreuro de tiamina y colocarlos en un matraz aforado de 50 mL. Aforar con agua destilada hasta la marca; de esta manera se obtiene una solución de tiamina de 200,000 µg/L.

NOTA: Esterilizar esta solución en frío, mantener en refrigeración y utilizar en condiciones estériles.

Solución de Nicotinamida (0.5 mg/L)

Pesar 0.01 g. de nicotinamida y colocarlos en un matraz aforado de 50 mL. Aforar hasta la marca con agua destilada; de esta manera se obtiene una solución de nicotinamida de 200 mg/L.

NOTA: Esterilizar esta solución en frío, mantener en refrigeración y utilizar en condiciones estériles.

Solución de DL-Alanina (0.35 g/L)

Pesar 3.8885 g. de DL-alanina y colocarlos en un matraz aforado de 50 mL. Aforar hasta la marca con agua destilada: de esta manera se obtiene una solución de alanina de 77.77 mg/L.

NOTA: Esterilizar esta solución en frío, mantener en refrigeración y utilizar en condiciones estériles.

Solución Salina (0.9 %)

Pesar 0.9 g de cristales de cloruro de sodio y disolverlos en exactamente 100 mL de agua destilada, guardar en recipiente adecuado par su uso en la determinación de biomasa. Esta solución debe renovarse cada ve que se observe precipitado.

Buffer de Acido Bórico (0.4 M, pH=10.4)

Pesar 24.7376 g de ácido bórico (H_3BO_3) y colocarlos en un matraz fondo plano de 1000 mL. A este matraz adicionar 850mL de agua grado cromatográfico (HPLC) y deferminarle el valor de pH. Si el valor de pH no es de 10.4, ajustarlo a este valor con hidróxido de potasio (KOH). Una vez ajustado el pH, trasvasar la solución a un matraz aforado de 1000 mL y aforar hasta la marca con agua grado cromatográfico y guardar en refrigeración.

Buffer de Acetato de Sodio (0.1 M pH=6.2)

Para preparar 1000 mL de buffer pesar 8.203 g de acetato de sodio y colocarlos en un matraz fondo plano de 1000 mL perfectamente limpio, adicionarle 850 mL de agua grado cromatográfico agitar para disolver la sal y determinar su valor de pH. Si el valor de pH no es 6.2, ajustar a este valor con ácido acético glacial. Una

vez ajustado el valor de pH trasvasar la solución a un matraz aforado de 1000 mL perfectamente limpio y aforar hasta la marca con agua grado cromatográfico.

Para ser usado en el cromatógrafo de líquidos, filtrar la cantidad necesaria a través de una membrana de filtración millipore de 0.45 μm de tamaño de poro.

Solución de OPA (O-Ftaldialdehído)

Esta solución se preparó según indicaciones del catalogo de cromatografía (Chromatography Catalog 1998-99, Regis Technologies, Inc. Procedimiento 23), para la derivatización de aminoácidos con o-ftaldialdehído.

Para preparar 100 mL de solución de OPA pesar 100 mg de OPA y colocarlos en un matraz aforado de 100 mL, con mucho cuidado verter la cantidad de OPA pesada en el matraz y agregarle 0.5 mL de β -mecaptoetanol para disolver el OPA. Si éste no se alcanza a solubilizar completamente, adicionarle poco a poco de 3-5 mL de buffer de ácido bórico 0.4 M y pH 10.4. Una vez que se ha solubilizado completamente el OPA, aforar hasta la marca con buffer de ácido bórico, guardar en refrigeración y en un recipiente protegido de la luz ya que es fotosensible.

Este procedimiento se debe hacer lo más rápido posible para evitar la descomposición por exposición a la luz. Antes de su uso, dejar reposar 24 horas en refrigeración.

Solución de Acido Dinitrosalisílico (DNS)

Para preparar esta solución mezclar en 1416 mL de agua destilada 10.6 g de ácido 3,5-dinitrosalisílico y 19.8 g de lentejuelas de hidróxido de sodio (NaOH), agitar hasta disolver. A esta mezcla se adicionan 306 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$), 7.6 mL de fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$); previamente fundido a 50°C en baño maría y 8.3 g de metabisulfito de sodio (NaHSO_3).

Finalmente tomar 3 mL de esta solución y titularlos con ácido clorhídrico 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador. Si la titulación se gasta mas de 5-6 mL de

ácido clorhídrico, adicionar 2 g de hidróxido de sodio por cada mililitro de ácido gastado de más.

10. APENDICE B

Activación de la Cepa de *Corynebacterium glutamicum*

Objetivo

Rehidratación del cultivo liofilizado de *C. glutamicum* a partir de una preparación en doble vial.

Material Biológico

Cepa liofilizada de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 21253).

MATERIAL Y EQUIPO

Tubos de ensaye de 10 mL con tapón de baquelita.

Mechero

Pizeta con agua

Pinzas par disección

Autoclave

Incubadora

Campana de flujo laminar

Balanza analítica

Micropipeta de 1000 μ L

Reactivos

Solución germicida de etanol al 70%.

Ingredientes

Caldo soya tripticasa

Agua destilada estéril

Biotina

Tiamina

Procedimiento

1. En condiciones estériles, limpiar perfectamente el vial en el que se encuentra la cepa liofilizada y en la flama del mechero calentar el extremo superior del vial.
2. Con la pizeta poner unas gotas de agua estéril en el extremo calentado hasta estrellar el vidrio del vial.
3. Con el extremo de las pinzas de disección golpear la parte estrellada del vial hasta romper completamente.
4. Con cuidado remover el aislante del primer vial, extraer al vial interno y con las pinzas de disección estériles extraer el algodón.
5. Asépticamente adicionar al material liofilizado de .3 a .5 mL (no mas) de medio líquido con la micropipeta.
6. Mezclar perfectamente y transferir la mezcla a los tubos estériles con 5-6 mL de caldo soya tripticasa adicionados de biotina y tiamina.
7. Incubar los tubos con la mezcla a 30°C durante 24 horas.

NOTA: La concentración de biotina y tiamina es de 50 y 200 µg/L, respectivamente.

Conservación de la Cepa de *Corynebacterium glutamicum*

Objetivo

Conservar las características y la viabilidad de *Corynebacterium glutamicum* para ser utilizado como semilla en la preparación del inóculo.

Material Biológico

Cultivo en placa de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC21253)

MATERIAL Y EQUIPO

Cajas Petri de vidrio

Probeta

Vaso de precipitado

Matraz Erlen Meyer de 150 mL

Haza de platino

Micropipeta de 200 μ L

Mechero

Espátula

Campana de flujo laminar

Incubadora

Autoclave

Balanza analítica

Papel parafilm

Ingredientes

Agua destilada

Agar Soya Trypticasa

Biotina y Tiamina

Reactivos

Solución alcohólica al 70%

Procedimiento

1. Preparar la cantidad de medio según especificaciones del envase para el número de cajas que se desee preparar.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
3. En la campana de flujo laminar agregar al medio 100 µL de la solución de biotina y tiamina de 50000 y 200000 µg/L y homogeneizar.
4. Ya adicionado, el medio, vaciarlo en las cajas Petri y esperar que este solidifique.
5. Con cuidado, con una haza de platino estéril, tomar una azada del tubo que contiene el caldo soya tripticasa en el que se activó la cepa y sembrar por estría en las cajas petri que se deseen sembrar.
6. Incubar a 30°C durante 24 horas.
7. Observar si hay desarrollo.

NOTA: La temperatura del medio de cultivo para la suplementación con las vitaminas debe ser de aproximadamente 40°C para evitar que solidifique antes de ser suplementado.

Preparación del Inóculo

Objetivo

Obtener la semilla de *Corynebacterium glutamicum* para inocular el caldo de fermentación en cada uno de los 27 experimentos y en los experimentos en los que se requiera de inóculo.

El inóculo se preparó cada vez que se realizaron experimentos.

Material Biológico

Cultivo en placa de *Corynebacterium glutamicum*.

Material y Equipo

Matraz Erlen-Meyer de 500 mL

Probeta de 100 mL

Algodón

Baño con agitación a 30°C Y 200 r.p.m..

Autoclave

Haza de platino

Campana de flujo laminar

Micropipeta de 200 µL

Mechero

Balanza analítica

Espátula

Ingredientes

Para la preparación del inóculo se preparo un caldo de cultivo con la siguiente composición por litro de agua destilada:

Glucosa 5 g.

Extracto de levadura 5 g.

Triptona 15 g.

Cloruro de sodio 2.5 g.

Solución de Biotina 100µL.

Solución de Cloruro de tiamina 100 µL.

Reactivos

Solución de etanol al 70%

Procedimiento

1. Con ayuda de una probeta medir la cantidad de medio que se desee preparar y disolver en ella los ingredientes, excepto la biotina y tiamina.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
3. En la campana de flujo laminar, y a 40°C, adicionar la cantidad necesaria de biotina y de tiamina par obtener una concentración final de 50 y 200 µg por litro respectivamente.
4. Homogeneizar perfectamente el caldo de cultivo suplementado y con una Haza de platino estéril tomar una azada de la placa de *C. glutamicum* de 24 horas de incubación y solubilizarla completamente dentro del matraz evitando toda posibilidad de contaminación.
5. Bien tapado el matraz, incubarlo en el baño de agua a 30°C y 200 r.p.m. por un intervalo de tiempo de 8 a 10 horas.

NOTA: La biotina y la tiamina se adicionan al medio frío (40°C) para evitar su descomposición por calor.

Curva de Crecimiento para el Inóculo

Objetivo

Obtener información de cada una de las diferentes fases de desarrollo, tiempo de duración y comportamiento del desarrollo de *Corynebacterium glutamicum* en medio para inóculo.

Reactivos

Solución de etanol al 70%

Procedimiento

1. Con ayuda de una probeta medir la cantidad de medio que se desee preparar y disolver en ella los ingredientes, excepto la biotina y tiamina.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
3. En la campana de flujo laminar, y a 40°C, adicionar la cantidad necesaria de biotina y de tiamina par obtener una concentración final de 50 y 200 µg por litro respectivamente.
4. Homogeneizar perfectamente el caldo de cultivo suplementado y con una Haza de platino estéril tomar una azada de la placa de *C. glutamicum* de 24 horas de incubación y solubilizarla completamente dentro del matraz evitando toda posibilidad de contaminación.
5. Bien tapado el matraz, incubarlo en el baño de agua a 30°C y 200 r.p.m. por un intervalo de tiempo de 8 a 10 horas.

NOTA: La biotina y la tiamina se adicionan al medio frío (40°C) para evitar su descomposición por calor.

Curva de Crecimiento para el Inóculo

Objetivo

Obtener información de cada una de las diferentes fases de desarrollo, tiempo de duración y comportamiento del desarrollo de *Corynebacterium glutamicum* en medio para inóculo.

Material Biológico

Placa con desarrollo de *Corynebacterium glutamicum*

Material y Equipo

El mismo que para la preparación del inóculo, adicionalmente:

Perilla

Tubos de ensaye

Espectrofotómetro

Centrífuga

Micropipeta de 1000 μ L

Gradilla

Cronómetro

Pipetas pasteur

Ingredientes

Los mismos que para la preparación de inóculo

Reactivos

Solución de etanol al 70%

Solución salina al 0.9%

Procedimiento

Proceder igual que para la preparación del inóculo hasta el paso número 5.

6.- A intervalos de tiempo de 2 horas; en la campana de flujo laminar tomar alícuotas de 5 mL de caldo de fermentación y colocarlas en tubos de ensaye

- 7.- De la alícuota tomar dos muestras de 2 mL cada una y colocarlas en tubos de ensaye y centrifugar a 2800 r.p.m. durante 10 minutos
- 8.- Con ayuda de la micropipeta desechar el sobrenadante con cuidado de no resuspender el precipitado y adicionar 2 mL de solución salina
- 9.- Homogeneizar perfectamente la suspensión celular y determinarle su valor de absorbencia en el espectrofotómetro a 659 nm contra el blanco de solución salina
- 10.- Los resultados de absorbencia obtenidos extrapolarlos en la curva de biomasa-absorbencia para obtener la concentración de biomasa en gramos por litro (g/L)
- 11.- Graficar los datos obtenidos de biomasa contra tiempo de incubación para obtener la curva de desarrollo bacteriano

Resultados

En la tabla 8 se muestran los datos experimentales obtenidos de absorbencia y concentración de biomasa respecto del tiempo de incubación en medio para inóculo.

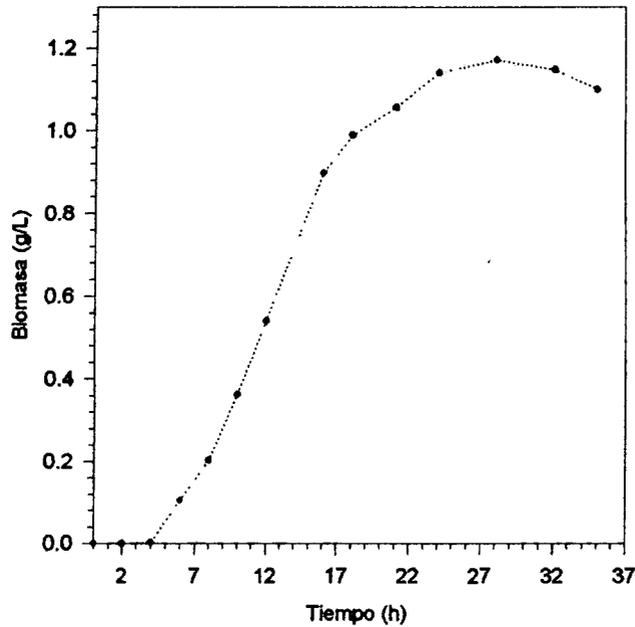
Valores cinéticos de crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en medio para inóculo.

Tiempo de incubación (h)	Concentración de biomasa (g/L)
00	0.0000
02	0.0000
04	0.0024
06	0.1041
08	0.2023
10	0.3623
12	0.5401
16	0.8974
18	0.9892
21	1.0573
24	1.1399
29	1.1715
32	1.1476

En la figura se muestra la gráfica de los valores de biomasa con respecto del tiempo.

Como se puede observar, se tiene una curva de desarrollo bacteriano típica, que muestra cada una de las diferentes fases de desarrollo.

Curva de crecimiento de *Corynebacterium glutamicum* en medio para inóculo.



En la gráfica se puede observar que cuando se siembra el caldo de inóculo a partir de una caja de 24 horas de incubación tarda aproximadamente 4 horas para empezar a desarrollarse (fase de adaptación), pero después de este tiempo comienza a proliferar de manera muy acelerada hasta las 16 o 17 horas manteniéndose mas o menos constante después de este tiempo hasta las 29 horas que es cuando empieza a declinar.

Curva de Calibración Biomasa-Absorbencia para la Determinación de Biomasa

La composición del caldo de fermentación, que se utilizó para el desarrollo de la biomasa utilizada para la curva biomasa-absorbencia, por litro de agua destilada es la siguiente:

- Glucosa 130 g.
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 1.0 g.
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.4 g.
- Sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.1 g.
- Sulfato de manganeso tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.1 g.
- Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 25 g.
- DL-Alanina 0.35 g.
- Biotina 50 μg .
- Cloruro de tiamina 200 μg .
- Nicotinamida 0.5 mg.
- Hidrolizado de soya 15 mg.
- Cloruro de sodio 0.2 g.
- El pH se ajustó a 7.0 ± 0.1

Este caldo de fermentación, previamente esterilizado, se sembró con un 5% de inóculo y se incubó en un baño de agua a 30°C y 200 r.p.m. durante 48 horas.

PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR

Del caldo fermentado, se tomó una alícuota de 100 mL y colocó en tubos para centrífuga, se centrifugó la muestra por 10 minutos a 2500 r.p.m. Posteriormente, con mucho cuidado de no perder biomasa de la pastilla formada, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se resuspendió el paquete celular en solución salina.

Posteriormente se resuspendió el paquete celular en un volumen de solución salina conocido. De esta suspensión celular se preparó una solución madre de concentración tal que se obtenga un valor de absorbencia menor que la unidad, para ello fijar en el espectrofotómetro la longitud de onda de 659 nm y ajustar a cero de absorbencia con la solución salina. Hecho lo anterior, se determinó la absorbencia de la solución madre, si la lectura de absorbencia es mayor a la unidad, diluir la solución hasta obtener un valor de absorbencia lo más cercano posible a la unidad. De esta misma solución, hacer diferentes diluciones de tal manera que la mas diluida quede lo más cercano posible a 0.1 unidades de absorbencia para tener una mayor confiabilidad en el rango lineal de la curva resultante.

Determinación de Biomasa por Peso Seco

Para la determinación de biomasa mediante el peso seco se procedió de la siguiente manera; a partir de la solución madre se tomó una alícuota de 3 mL y se filtró a través de una membrana filtración de Nylon de 0.45 µm de poro, que ha sido puesta a peso constante. La membrana con la muestra se seco a 90°C hasta peso constante finalmente se restó el peso de la membrana sola al peso de la membrana con muestra y dividiendo este producto entre el volumen de muestra tomado para obtener finalmente el peso de biomasa en gramos por mililitro.

$$\frac{\text{Membrana + muestra (g)} - \text{membrana sola (g)}}{\text{Volumen de muestra (mL)}} = \text{biomasa g/mL}$$

Curva de Calibración para Determinación de Glucosa

Para preparar la curva de calibración para la cuantificación de glucosa en las muestras de caldo de fermentación se procedió de la siguiente manera: se preparó

una solución madre de glucosa de 1000 mg/L pesando un 0.1 gramo de glucosa, con la mayor exactitud posible, en una balanza analítica y se disolvió completamente en un matraz aforado de 100 mL con agua destilada hasta la marca. A partir de esta solución se prepararon 5 estándares de concentraciones 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 y 1.0 mg/mL de glucosa respectivamente.

Posteriormente, de cada uno de los 5 estándares se tomaron 200 μ L y se colocaron en tubos de ensaye limpios y se les adicionaron a cada uno de los 5 tubos 600 μ L de ácido dinitrosalicílico (DNS), se homogeneizaron perfectamente y se calentaron en baño de agua hirviendo durante 5 minutos exactamente; se enfriaron los tubos y se les agregó a cada uno 1200 μ L de agua destilada y se homogeneizaron perfectamente con ayuda de un vortex. Finalmente, a cada uno de los tubos se les determinó su valor de absorbencia a 550 nm tomando como blanco un tubo procesado de la misma manera que los estándares, solo que el blanco contiene 200 μ L de agua destilada en vez de muestra.

En la tabla 9 se muestra de manera resumida la preparación de la curva de calibración para glucosa en la que se da el volumen tomado de cada uno de los estándares así como el volumen de DNS, agua destilada y la concentración final de glucosa de cada uno de los 5 estándares.

Curva de calibración para glucosa.

ST	1	2	3	4	5
μ L de ST	200	200	200	200	200
μ L DNS	600	600	600	600	600
μ L agua dest.	1200	1200	1200	1200	1200
Glucosa (mg/mL)	0.1	0.3	0.5	0.8	1.0

Los valores obtenidos de absorbencia de cada uno de los estándares son graficados contra la concentración de cada uno de los estándares y se determina el coeficiente de correlación (r). En este caso solo se aceptaron aquellas curvas cuya correlación fuera mayor de 0.99 con la finalidad de dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos.

Curva de Calibración para Lisina

Para preparar la curva de calibración para determinar lisina en las muestras de caldo de fermentación se preparó una solución madre de lisina de 20, 000 mg/L. Para ello, en una balanza analítica se pesaron 0.1 g de lisina pura (como hidrocloreuro de lisina) y se colocaron en un matraz aforado de 50 mL y se aforó hasta la marca con agua destilada.

De la solución madre de lisina se prepararon 4 estándares de concentraciones 100, 500, 1000 y 1500 mg/L en matraces aforados de 10 mL. En la tabla 10 se muestran de manera resumida los volúmenes tomados de solución madre para prepara cada uno de los estándares así como la concentración de lisina en mg/L.

Preparación de la curva de calibración para lisina.

ST	1	2	3	4
Vol. de sol. madre (μ L)	50	250	500	750
Conc. de lisina (mg/L)	100	500	1000	1500

De cada uno de los 4 estándares se hicieron inyecciones por triplicado en el HPLC bajo las condiciones descritas en la metodología y de los cromatogramas obtenidos se determinó el área bajo la curva para cada uno de los estándares y se correlacionó con la concentración correspondiente de cada estándar graficando área bajo la curva contra concentración. Finalmente se determinó el valor del coeficiente de correlación (r) de la curva, para este caso se aceptaron las curvas de calibración que mostraran un valor de r mayor a 0.90.

11. APENDICE C

Programa de Automuestreado

Iniciando con el automuestreador encendido, pero en espera (autosampler stopped), proceder de la siguiente manera.

- 1.- Presionar la tecla *edit* y con las flechas del cursor avanzar hasta la línea de *edit method*
- 2.- Presionar la tecla de *yes* y presionar avanzar
- 3.- Aparece la leyenda *met 1*, presionar avanzar
- 4.- Aparece *met 1 first rack-vial 1-1*, colocar en este paso el número del rack en el que se iniciará el automuestreado y presionar avanzar
- 5.- Se muestra la misma leyenda que en 4 pero ahora en *1-1*, en este paso dar al número de vial en el rack dado en el paso 4; en este paso se da el número de vial en el que iniciará el sistema de automuestreo y presionar avanzar
- 6.- Aparece nuevamente la leyenda del paso 4, en este caso dar al automuestreador, en el primer carácter el número de rack en el que terminará el ciclo de automuestreado y en el segundo carácter (misma leyenda que en paso 5) dar el número de vial correspondiente al último a ser muestreado y presionar avanzar
- 7.- Aparecerá la leyenda *meth 1 injection volume*, en el espacio disponible colocar el volumen de muestra a inyectar en el equipo oprimiendo las teclas de *increase decrease* y presionar avanzar
- 8.- Aparece la leyenda *meth 1 injection per vial*, en este paso introducir el número de inyecciones por vial que se deseen hacer y presionar avanzar
- 9.- Entonces aparece la leyenda *meth 1 wash cycles*, introducir el número de ciclos de lavado y presionar avanzar
- 10.- Aparece la leyenda *meth 1 next sampling time off*, en este paso no modificar y presionar avanzar

- 11.- Aparece la leyenda *meth 1 automix*, en este paso introducir el programa de automezclado; para ello, ver programa de *automix*
- 12.- Una vez editado el programa de *áutomix A*, en la leyenda *meth 1 automix* , presionar la tecla *inrese* y aparecerá la letra *A* y un guión intermitente, presionar avanzar 2 veces y el equipo preguntará *add metodo*, presionar la tecla *no* y posteriormente presionar la tecla *status*
- 13.- Debe aparece la leyenda *autosampler stopped*. en este paso, el automuestreador está listo para trabajar en coordinación con el módulo de bombeo y el de detección

Programa de Automezclado

- 1.- En el paso 11 del programa de automuestreado, presionar la tecla de *inrese* y aparecerá *A*. Entonces presionar la tecla *edit* y el equipo preguntará *edit sequence table*, presionar *no*; y presionar avanzar
- 2.- El equipo pregunta *edit method*, presionar *no* y presionar avanzar
- 3.- El equipo pregunta *edit automix routine*, presionar *si* y presionar avanzar
- 4.- Aparecerá la leyenda *automix A*, presionar avanzar
- 5.- Aparecerá *automix A Source rack-vial 2-1*, en los dos espacios numéricos colocar el número de rack y vial del que tomará el volumen por mezclar y presionar avanzar 2 veces
- 6.- El equipo mostrará ahora la leyenda *automix A transfer volume*, introducir el volumen a transferir y presionar avanzar
- 7.- Aparecerá *automix A mix cycles*, introducir el número de ciclos de mezclado y presionar avanzar
- 8.- Aparecerá *automix A wash cycles*, dar el número de ciclos de lavado y presionar avanzar
- 9.- El equipo muestra la leyenda *automix A reaction time off*, no hacer modificaciones y presionar avanzar
- 10.- Aparecerá la leyenda *automix routine B*, presionar la tecla *status* y aparecerá nuevamente la leyenda *autosampler stopped*