

**PROYECTO: AISLAMIENTO DE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM,
BACTERIA SINTETIZADORA DE LISINA.**

Propuesto por:

Ing. Ramón Fernando Riera García

CI: 22.654.163.

Asesores:

Dra. Rosaima García (INIA-Mérida)

Dra. Nelly Delgado (IDEA)

MSc Ramón Riera Tona

Lic. Adriana Ramírez (IVIC)

1.- INTRODUCCIÓN:

En 1957, se descubre la producción de ácido glutámico por la bacteria *Micrococcus glutamicus*, más tarde renombrada por *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita 1985), con el tiempo el glutamato fue usado como un importante producto para la explotación industrial de microbiología (*Nandakumar et al. 2003; Jyothi et al. 2005; Kusumoto 2001*). Las especies de *Corynebacterium*, han sido utilizadas en la producción de masa de varios aminoácidos, incluyendo el ácido glutámico, un aditivo alimentario que se hace a una tasa de 1,5 millones de toneladas / año. (Shimizu and Hirasawa 2006). Es así que las vías metabólicas de *Corynebacterium* se han manipulado para producir lisina y treonina.

De acuerdo a lo anterior, se conoce que la producción de L-lisina es específica de *C. glutamicum* en la que las enzimas metabólicas centrales son manipuladas mediante ingeniería genética para impulsar el flujo metabólico hacia la producción de NADPH a partir de la vía de fosfato de pentosa, y el fosfato de L-4-aspartilo. L - lisina, lysC, dapA, dapC, y dapF. Estas enzimas están reguladas en la industria a través de la ingeniería genética para asegurar que se producen cantidades adecuadas de precursores de lisina para aumentar el flujo metabólico. Reacciones secundarias no deseadas como la producción de treonina y asparagina pueden ocurrir si se produce una acumulación de sustancias intermedias, por lo que los científicos han desarrollado cepas mutantes de *C. glutamicum* mediante ingeniería de PCR y knockouts químicos para asegurar que la producción de enzimas de reacción secundaria sea limitada. Muchas manipulaciones genéticas llevadas a cabo en la industria son mediante métodos cruzados tradicionales o inhibición de activadores transcripcionales.

La expresión del factor de crecimiento epidérmico humano funcionalmente activo se ha producido en *C. glutamicum*, demostrando así un potencial para la producción a escala industrial de proteínas humanas. Las proteínas expresadas pueden ser dirigidas a la secreción a través de la vía secretora general o la vía de translocación de la doble arginina.

A diferencia de las bacterias gram-negativas, las especies Gram-positivas de *Corynebacterium* carecen de lipopolisacáridos que funcionan como endotoxinas antigénicas en seres humanos.

También las especies no patógenas de *Corynebacterium* se utilizan para aplicaciones industriales muy importantes, como la producción de aminoácidos, nucleótidos y otros factores nutricionales (Martín, 1989); La bioconversión de los esteroides, la degradación de los hidrocarburos, el envejecimiento del queso y la producción de enzimas. Algunas especies producen metabolitos similares a los antibióticos: bacteriocinas de tipo corynecin-linocina, antitumorales, etc. Una de las especies más estudiadas es *C. glutamicum*, cuyo nombre se refiere a su capacidad Para producir ácido glutámico en condiciones aeróbicas. Esto se utiliza en la industria alimenticia como glutamato monosódico en la producción de salsa de soja y yogur.

Taxonómicamente, la bacteria es una Actinobacteria; Actinobacteria (class); Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Corynebacteriaceae; género *Corynebacterium* especie *Corynebacteriumglutamicum*.

Las características principales del género *Corynebacterium* fueron descritas por Collins y Cummins en 1986. Son bacterias gram positivas, positivas a la catalasa, no formadoras de espuma, no motrices, en forma de varilla, que son rectas o ligeramente curvadas. Los gránulos metacrómicos están generalmente presentes representando las regiones de fosfato almacenadas. Su tamaño cae entre 2 y 6 μm de longitud y 0,5 μm de diámetro. Las bacterias se agrupan de una manera característica, que se ha descrito como la forma de un "V", "palisades", o "letras chinas". También pueden aparecer elípticas. Son aerobios o facultativamente anaeróbicos, quimioorganotróficos. Son pleomórficos a través de sus ciclos de vida, ocurren en varias longitudes, y frecuentemente tienen espesamiento en cada extremo, dependiendo de las condiciones circundantes.

Las *Corynebacterias* crecen lentamente, incluso en medios enriquecidos. En términos de necesidades nutricionales, todos necesitan biotina para crecer. Algunas cepas también necesitan tiamina y PABA. Algunas de las especies de *Corynebacterium* con genomas secuenciados tienen entre 2,5 y 3,0 millones de pares de bases.

Para la producción de glutamato se ha reportado varios tipos de sustratos, microorganismos y soluciones nutricionales. (*Nampoothiri and Pandey 1996; Nampoothiri and Pandey 1999; Jyothi et al. 2005*). Así mismo para la producción industrial han sido probados muchos procesos fermentativos.

Con el presente proyecto se pretender obtener aislamientos autóctonos puros de la bacteria, que puedan servir para iniciar posteriormente un escalamiento de la mismas con fines de producción de lisina, el cual es un aminoácido requerido en la producción dietas alimenticias balanceadas destinadas a la alimentación animal para la producción de proteínas.

De tal manera que este proyecto, representa un aporte básico fundamental como contribución a la disminución de importaciones de lisina que es utilizado en la producción agroindustrial de alimentos concentrados para animales.

2.- OBJETIVOS:

General:

Obtener cepas autóctonas y puras de *Corynebacterium glutamicum* como base para la producción local y nacional de Lisina, aminoácido utilizado en la producción agroindustrial de alimentos concentrados para animales.

Específicos:

1. Evaluar medios de cultivos nutritivos para el aislamiento y purificación de la bacteria *C. Glutamicum*.
2. Caracterizar cultural, fisiológica y molecularmente los aislamientos puros de *C. Glutamicum*.
3. Optimizar un método de fermentación de la bacteria *C. Glutamicum*, utilizando sustratos locales enriquecidos.

3.- METODOLOGÍA:

La investigación se llevará a cabo en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Politécnica territorial de Mérida “Kleber Ramírez”, con apoyo del Lab. de fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola INIA-Mérida. La caracterización y confirmación molecular, se realizará en servicios de laboratorios de IDEA e IVIC.

Aislamiento de *Corynebacterium glutamicum*:

Para ello, se tomarán muestras de varios nichos conocidos de la bacteria, tales como tierra, agua, sangre, fragmentos rúmiales de animales poligástricos y alimentos concentrados en diferentes zonas. Se utilizaran diferentes medios de crecimiento: medio de Loeffler, agar de sangre de ovejo y agar de soja triplicasa (TSA). El desarrollo de pequeñas colonias grisáceas de aspecto granular, en su mayoría translúcidas, pero con centros opacos, convexos, con bordes continuos, es indicativo de aislamiento de la bacteria. El color tiende a ser blanco amarillento en el medio de Loeffler.

Cuando se aplique como método para aislar y cultivar *Corynebacteria* el utilizar agar de sangre de oveja, se usará además un medio selectivo como medio de recubrimiento primario tales como: agar de sangre Cystine-Tellurite o el medio Tinsdale.

Los medios serán vaciados en placas Petri, se sembraran con la solución microbial, se someteran a incubación a 37 °C entre 18 a 24 horas, en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono al 5%, sellando las placas Petri con parafilm.

Medio Loeffler:

En 1887, Friedrich Loeffler describe un medio de cultivo que contiene Suero de caballo, infusión de carne y dextrosa para su uso en el cultivo de *Corynebacteria* y para la diferenciación y para diferenciarlo de otros microorganismos.

Composición del Medio de Cultivo Loeffler:

Formula Proximal	Por L de agua Pura
Suero de caballo	70.0 g
Musculo de corazón, para infusión (solidos)	0.72 g
Digestión de Pectina de tejido animal	0.71 g
Cloruro de sodio	0.36 g
Dextrosa	0.71 g
Huevo (entero, seco)	7.5 g

Medio Tryptona-Soya-Agar:

Agar de Soya Tryptona (TSA) o Caldo de Soya Tryptona (TSB) con agar son medios de crecimiento para el cultivo de bacterias. Son medios de uso general, no selectivos que proporcionan nutrientes suficientes para permitir que una amplia variedad de microorganismos crezca. Se utilizan para una amplia gama de aplicaciones, incluyendo almacenamiento de la cultura, enumeración (contar), aislamiento en cultivos puros, o simplemente cultura general. TSA contiene digestión enzimática de caseína y harina de soya, que proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, por lo que es un medio nutritivo para una variedad de organismos. La glucosa es la fuente de energía. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, mientras que el fosfato dipotásico actúa como tampón para mantener el pH. Agar extraído de cualquier número de organismos se utiliza como agente gelificante.

El medio puede ser suplementado con sangre para facilitar el crecimiento de bacterias o agentes antimicrobianos más exigentes para permitir la selección de diversos grupos microbianos a partir de una microbiota pura. Como con cualquier medio, se pueden hacer cambios menores para adaptarse a circunstancias específicas. TSA es frecuentemente el medio base de otros tipos de placas de

agar. Por ejemplo, se preparan placas de agar sangre (BAP) mediante el enriquecimiento de placas TSA con sangre de oveja desfibrinada, y el agar de chocolate se hace mediante cocción adicional de BAP. El agar nutritivo es similar al TSA.

Composición del medio TSA:

- 15 g Tryptona
- 5 g soytone – digestión enzimática de miel de soya
- 5 g de Coluro de sodio.
- 15 g agar

Las células de *Corynebacterium glutamicum*, pueden ser exactamente identificadas al observar formaciones de "letra china", como resultado de su estilo de división.

Purificación de la bacteria:

Una vez aislada la bacteria en alguno de los medios de cultivos, se procederá a tomar colonias separadas que serán nuevamente sembradas en los mismos medios, unas dos veces hasta obtener la colonia totalmente pura.

Caracterización de la bacteria:

Las colonias bacterianas purificadas en los referidos medios, serán caracterizadas culturalmente tomando en cuenta, su borde, color, elevación y tamaño.

También se realizará la caracterización fisiológica de la misma, en cuanto a capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas tomando como base lo señalada en la bibliografía, ello dará la cinética de crecimiento, muy útil para el mantenimiento de las cepas de la bacteria y los trabajos posteriores de escalamiento de la misma.

Para lo anterior, se tomará en cuenta que las *Corynebacteria* son generalmente no móviles, Gram positivas, tipo bacilar pleomorfas no esporogénico, siempre en división celular incrustadas con aspecto de letras chinas, son quimiogranotróficas, aeróbicas o anaeróbicas facultativas, de metabolismos fermentativo (carbohidratos a ácido láctico), bajo ciertas condiciones y crecen en medios enriquecidos.

La confirmación segura de la especie bacteriana, se realizará mediante uso de la biología molecular, para lo cual, las muestras y ADN extraídos, serán enviados al Instituto de Investigaciones científicas ubicado en Caracas, quienes ofertan el servicio para tales fines.

Fermentación *In vitro* de para incrementar la biomasa:

Para ello, se utilizaran los siguientes componentes en g/LT:

Se utilizarán como sustratos carbónicos diferentes fuentes locales: extracto de palma aceitera, caña panelera y yuca entre otros.

A cada Sustrato se le adicionarán elementos nutricionales requeridos para el crecimiento óptimo de la bacteria *C. glutamicum*:

- Urea: 3.0,
- MnSO₄.H₂O: 0.01
- FeSO₄ .7H₂O: 0.01
- MgSO₄ .7H₂O: 2.0
- Ajustar el pH a 7.0 con HCl y NaOH

Filtrar y dispensar en Erlenmeyer de 500 mL e incubar a 35°agitando bajo condiciones de 300 rpm durante 48 horas, adicionar Penicillin G (5000,000 U) a las 10 horas después de la fermentacion.

4.- RESULTADOS Y/O PRODUCTOS ESPERADOS:

- Cepas de *Corynebacterium glutamicum*, caracterizadas morfológicas, fisiológicas y molecularmente.
- Protocolos optimizados para el aislamiento y caracterización de la bacteria *C. Glutamicum*.
- Almenos 01 protocolo de proceso optimizado para incrementar la biomasa de la bacteria *C. Glutamicum* por fermentación utilizando locales o recursos nacionales disponible.

5.- BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA:

- Akers, Angela S., *Corynebacterium* Akers, Angela S., *Corynebacterium*. Virginia Tech.
- Esteban, J. et al. (1999). "Microbiological characterization & clinical significance of *Corynebacterium amycolatum* strains." European Journal of Clinical Microbial Infectious Diseases, 18: 518-521.
- <http://www.madsci.org/posts/archives/2000-02/951527342.Mi.r.html>. [accedido el 5 de junio de 2017].
- <http://www.highlands.edu/academics/divisions/scipe/biology/labs/rome/selectivedifferential.htm>. [accedido el 5 de junio de 2017].
- <http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lab/differentialMedia/selectiveDifferentialMedia.htm>. [accedido el 5 de junio de 2017].
- <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/microbiology-products.html?TablePage=18176518>. [accedido el 5 de junio de 2017].

- Jump up . Loeffler, F. (1887). Darauf theilte Herr Loeffler en einem Zweiten vortrag die ergebnisse seiner weiteren unter suchungen uber die Diphtherie-Bacillen mit. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. 2:105-112.
- Jump up . Perry, C.A., and E.I. Petran. (1939). Routine laboratory examinations for *C. diphtheriae*. J. Lab. Clin. Med. 25:71-78.
- Jump up . Buck, T.C. (1949). A modified Loeffler's medium for cultivating *Corynebacterium diphtheriae*. J. Lab. Clin. Med. 34:582-583.
- Jyothi, A. N., Sasikiran, K., Nambisan, B., & Balagopalan, C. (2005). Optimisation of glutamic acid production from cassava starch factory residues using *Brevibacterium divaricatum*. Process Biochemistry,40, 3576–3579.
- Kinoshita, S. (1985). Glutamic acid bacteria. In A. L. Demain & N. A. Solomon (Eds.), Biology of industrial micro-organisms (pp.115–142).London: Benjamin/Cummings.
- Kusumoto, I. (2001). Industrial production of L-glutamine. Journal of Nutrition, 131, 2552S–2555S.
- Mahmoud Tavakkoli, Zohreh Hamidi-Esfahani & Mohammad Hossein Azizi. (2009). Optimization of *Corynebacterium glutamicum* Glutamic Acid Production by Response Surface Methodology. Food Bioprocess Technol (2012) 5:92–99.
- Murphy, John R. University of Texas Medical Branch: *Corynebacterium Diphtheriae* .
- Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (1996). Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp. Biotechnology Letters,18,199–204.
- Nandakumar, R., Yoshimune, K., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (2003). Review: microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,23,87–100.
- Optimización de *Corynebacterium glutamicum* Producción de ácido glutámico por la metodología de superficie de respuesta (PDF disponible). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/226731919_Optimization_of_Corynebacterium_glutamicum_Glutamic_Acid_Production_by_Response_Surface_Methodology [accedido el 5 de junio de 2017].
- Shimizu, H., & Hirasawa, T. (2006). Production of glutamate and glutamate-related amino acids: molecular mechanism analysis and metabolic engineering. Microbial Monographs,5,1–38.