



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

ANÁLISIS ESTEQUIOMÉTRICO DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS EN CULTIVO
PARA DISEÑO DE MEDIO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL QUÍMICA E
INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MARIANA ANGÉLICA FERNÁNDEZ URRUTIA

PROFESORA GUÍA:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BARBARA ANDREWS FARROW
LEONARDO SAENZ ITURRIAGA

SANTIAGO DE CHILE
2020

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: MARIANA ANGÉLICA FERNÁNDEZ URRUTIA
FECHA: 2020
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

ANÁLISIS ESTEQUIOMÉTRICO DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS EN CULTIVO PARA DISEÑO DE MEDIO

Chile es una de las potencias exportadoras de filete de pescado a nivel mundial, mercado el cual mueve alrededor de 25B US\$ al año, situándose en el segundo lugar con un 12% de las exportaciones. Aún cuando se alcanzan estos valores existen pérdidas de un 25-45% de los cultivos en crecimiento debido a Piscirickettsiosis o Septicemia rickettsial salmonídea (SRS) producida por una bacteria gram-negativa facultativa intracelular, es decir, puede requerir o no una célula huésped para reproducirse, llamada *Piscirickettsia salmonis*.

Se trabajó en conjunto con la empresa VacciVet de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde actualmente se produce una vacuna para *P. salmonis*. Sin embargo, la producción de esta se realiza en medios de cultivos no optimizados para este trabajo. Por lo tanto, a modo de objetivo general se busca optimizar un medio de cultivo acorde a los requerimientos celulares de *P. salmonis* utilizando el análisis de flujo metabólico (MFA).

Para el MFA fue necesario tener la composición de los medios de cultivo analizados y el sobrenadante en diferentes etapas del crecimiento celular, medir los aminoácidos presentes en cada una de las etapas utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica con el equipo HPLC y medir las concentraciones de azúcares con ensayos de espectrofotometría tras cadena de reacciones enzimáticas con el equipo Y15, ambos equipos ubicados en el Laboratorio de Cultivo - MCCL del CeBiB. Finalmente, se utilizaron estos datos para llevar a cabo el análisis de flujo metabólico.

Dentro de los resultados más relevantes se encuentra que es necesaria la adición de ciertos nutrientes para los medios de cultivo, los cuales se resumen en la siguiente tabla.

	Graces	L15	SFX
Agregar	Glc, gln, cys y met	Glc, suc, glu y gln	Gln, gly, his, asn, val y phe

Tabla 1: Resumen de los principales nutrientes deficientes en cada uno de los medios

Se concluye que para *P. salmonis* es importante la glucosa y que la presencia o ausencia de esta limitará su rendimiento y formación de biomasa. Para la propuesta de medio mejorado, se modificaron las concentraciones de glucosa para los medios Grace's y L15, y así la diferencia entre la concentración inicial de SFX pasa de ser 10 y 700 veces mayor respectivamente a ser 6 y 4 veces mayor, acotando la diferencia entre los 3 medios.

Como proyección a futuro se deberá realizar iteraciones de esta metodología para perfeccionar las composiciones de cada medio y así acercarse a la formulación óptima para *P. salmonis*.

A mis padres y hermanas que hicieron esto posible.

Agradecimientos

Me gustaría dedicarle unas palabras especiales a mi familia que siempre me ha sabido apoyar, aun cuando no entiendan del todo las palabras que esta tesis enmarca, sé que existieron los esfuerzos por leerla. Me gustaría agradecer a mi primo Sergio que a pesar de no poder haber visto cumplido mi trabajo, siempre estuvo pendiente de mis logros y preguntaba cuándo me iba a poder titular, sé que ahora estaría orgulloso de mi y bromearía al respecto. A mis padres José y Dora por siempre brindarme un espacio seguro dónde llegar y alimentar mi interés por la ciencia y el conocimiento desde que soy muy pequeña. A mis hermanas Karen, Paula, Natacha y Estefanía, las cuatro son muy diferentes como los dedos de una mano, pero nunca han dejado de mostrarme su amor incondicional y apoyo para los momentos más difíciles.

Agradezco a todas las personas que me han acompañado en este largo camino que ha sido mi vida universitaria. A todas las amistades que hice y que me siguen acompañando hasta el día de hoy así como todas esas amistades pasajeras que maduraron para seguir con sus caminos. En primer lugar agradecerle toda su paciencia y amor a Sebastián por estar a mi lado y saber contenerme cuando no podía más de ansiedad. Al grupo de las Oncecitas donde todos los problemas parecían desaparecer esas tardes acompañadas con un tecito y un pan con palta. A mi grupo de "Solo entre chicas" donde mis amigas Francisca y Constanza me han acompañado casi toda mi vida universitaria, siendo una parte fundamental de quién soy, con quién hablo y busco apoyo (En especial, agradecerle a Constanza por revisarme las conclusiones de esta tesis). Agradecer a mi grupo más cercano de IQBT donde Cristian, Pablo, Pedro, Dagoberto y Constanza (nuevamente) me hacen rabiar y reír, pero por sobretodo siempre ha tenido una palabra de aliento para mi. No podría dejar de mencionar de todas las personas que me han acompañado, mis amigas del colegio Francisca, Consuelo, Rocio y Camila con las cuales seguimos en contacto hasta el día de hoy, pero por sobre todo a Paulina y Daniela que al estar presenta aquí en Santiago han sido muy importante para alguien de región sola en la gran ciudad.

Finalmente a agradecer a la Profesora Ziomara y a todo el Laboratorio de Cultivo MCCL por haber estado siempre en los momentos académicos más críticos y haberme acompañado estos últimos años llenos de sorpresas.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.2.1. Descripción del proyecto	3
1.2.2. Justificación	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Resultados esperados	4
2. Marco teórico	5
2.1. Diseño de medio	5
2.1.1. Medios de cultivo estequiométricos	5
2.1.2. Caracterización cuantitativa del crecimiento celular	8
2.1.3. Diseño de medio por medio de nutrientes consumidos	10
2.2. Análisis de Flujo Metabólico - MFA	10
2.2.1. Definir ecuaciones estequiométricas	12
2.2.2. Balance de carbono y nitrógeno	14
3. Metodología	15
3.1. Recopilación bibliográfica y comparación de medios de cultivos reportados	15
3.2. Caracterización de crecimiento celular	15
3.3. Análisis de medio de cultivo	16
3.3.1. Concentración de aminoácidos	16
3.3.2. Concentración de fuentes de carbono	17
3.3.3. Otras concentraciones de metabolitos relevantes	17
3.4. Análisis de Flujo Metabólico - MFA	17
3.5. Diseño por medio de nutrientes consumidos	18
4. Medios de cultivo	19
4.1. Contexto histórico	19
4.2. Comparación de medios de cultivos en la literatura	20
4.2.1. Sales inorgánicas	21
4.2.2. Aminoácidos	22
4.2.3. Vitaminas	24
4.2.4. Azúcares	25

4.2.5. Otros componentes	26
5. Resultados y discusiones	27
5.1. Curva de crecimiento de cada medio	27
5.2. Concentración inicial de los medios de cultivo	28
5.3. Medio Grace's	29
5.3.1. Caracterización de curva de crecimiento en Medio Grace's	29
5.3.2. Curvas cinéticas	31
5.3.3. Razón estequiométrica según datos medidos	36
5.3.4. Composición propuesta basada en medio Grace's utilizando datos obtenidos	37
5.3.5. Flujos metabólicos en el metabolismo central	38
5.3.6. Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA	41
5.3.7. Composición propuesta basado en el medio Grace's utilizando MFA	42
5.4. Medio L15	43
5.4.1. Caracterización de curva de crecimiento en Medio L15	43
5.4.2. Curvas cinéticas	44
5.4.3. Radios estequiométricos según datos medidos	48
5.4.4. Composición propuesta basada en medio L15 utilizando datos obtenidos	49
5.4.5. Flujos metabólicos en el metabolismo central	51
5.4.6. Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA	52
5.4.7. Composición propuesta basada en el medio L15 utilizando MFA	54
5.5. Medio SFX	55
5.5.1. Caracterización de curva de crecimiento en Medio SFX	55
5.5.2. Curvas cinéticas	56
5.5.3. Radios estequiométricos	60
5.5.4. Composición propuesta basada en medio SFX utilizando datos obtenidos	62
5.5.5. Flujos metabólicos en el metabolismo central	63
5.5.6. Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA	64
5.5.7. Composición propuesta basada en el medio SFX utilizando MFA	66
5.6. Comparación de los tres medios con Análisis de Flujo Metabólico	67
5.6.1. Tabla comparativa de aminoácidos que se deben agregar según datos obtenidos y MFA	68
5.6.2. Tabla comparativa de la propuesta concentración de aminoácidos y azúcares para los medios de cultivo	69
 Conclusión	 72
 Bibliografía	 74
A. Metodología de medición de aminoácidos mediante HPLC	78
B. Determinación de concentración de metabolitos	83
C. Metodología para determinación de concentración de glucosa/sacarosa	101

D. Metodología para determinación de concentración de amonio	104
E. Metodología para determinación de concentración de lactato	107
F. Metodología de medición de glutamato y glutamina	110

Índice de Tablas

1.	Resumen de los principales nutrientes deficientes en cada uno de los medios	i
2.1.	Peso seco usual en células	5
2.2.	Ecuaciones para metabolismo central	13
2.3.	Ecuación para formación de biomasa	13
2.4.	Ecuaciones de metabolismo de aminoácidos	14
4.1.	Comparación de concentración de biomas para cada uno de los medios de cultivo.	20
4.2.	Comparaciones de sales inorgánicas en cada uno de los medios de cultivo.	22
4.3.	Composición de aminoácidos en cada uno de los medios de cultivo	23
4.4.	Composición de vitaminas en cada uno de los medios de cultivo.	24
4.5.	Composición de azúcares en cada uno de los medios de cultivo.	25
4.6.	Composición de otros componentes en cada uno de los medio de cultivo.	26
5.1.	Razón estequiométrica, según datos medidos para medio Grace's	36
5.2.	Composición propuesta para el medio Grace's según datos obtenidos	37
5.3.	Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA para medio Grace's	41
5.4.	Composición propuesta para medio Grace's según MFA	42
5.5.	Razón estequiométrica, según datos medidos para medio L15	49
5.6.	Composición propuesta para el medio L15 según datos obtenidos	50
5.7.	Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA para medio L15	53
5.8.	Composición propuesta para medio L15 según MFA	54
5.9.	Razón estequiométrica, según datos medidos para medio SFX	61
5.10.	Composición propuesta para medio SFX según MFA	62
5.11.	Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA para medio SFX	65
5.12.	Composición propuesta para medio SFX según MFA	66
5.13.	Tabla comparativa según datos obtenidos y MFA	69
5.14.	Tabla comparativa de precios para los diferentes medios	71

Índice de Ilustraciones

1.1. Representación gráfica de países que exportan filetes de pescado (2018) - OEC [1].	2
1.2. Evolución de exportaciones Chilenas de salmón y trucha	2
2.1. Fórmula ejemplo utilizada al hacer MFA	6
2.2. Resultado de la búsqueda filogenética de <i>P. salmonis</i>	7
2.3. Curva ve crecimiento celular	8
2.4. Modelo simplificado de vía metabólica central	12
3.1. Metodología para Concentración de aa	16
3.2. Metodología para MFA	17
4.1. Etapa donde el glutamato ingresa al ciclo de Krebs.	23
5.1. Curva de crecimiento para cada uno de los medios utilizados.	27
5.2. Tabla comparativo de concentración inicial de aminoácidos para los diferentes medios de cultivo	28
5.3. Curva de crecimiento y parámetros asociados al medio Grace's.	30
5.4. Zonas de estados metabólicos en curva de crecimiento Grace's	31
5.5. Perfil de concentración de glucosa, glutamina y sacarosa	32
5.6. Perfil de concentración de amonio y lactato para medio Grace's.	33
5.7. Perfil de aminoácidos esenciales gln, arg, lys para medio Grace's	34
5.8. Perfil de aminoácidos esenciales thr, val, ile, leu, phe para medio Grace's . .	34
5.9. Perfil de aminoácidos no esenciales glu, ser, gly, his para medio Grace's . . .	35
5.10. Perfil de aminoácidos no esenciales asp, asn, ala, pro, cys, tyr, met para medio L15	35
5.11. Representación gráfica de los flujos en el metabolismo central para le medio Grace's	38
5.12. Comparación de flujos del metabolismo central para medio Grace's	39
5.13. Curva de Crecimiento y parámetros asociados al medio L15.	43
5.14. Zonas de estados metabólicos en curva de crecimiento para medio L15	44
5.15. Perfil de concentración de glucosa, glutamina y sacarosa para medio L15 . .	45
5.16. Perfil de concentración de amonio y lactato para medio L15.	45
5.17. Perfil de aminoácidos esenciales gln, arg, lys para medio L15	46
5.18. Perfil de aminoácidos esenciales thr, val, ile, leu, phe para medio L15	46
5.19. Perfil de aminoácidos no esenciales glu, ser, gly, his para medio L15	47
5.20. Perfil de aminoácidos no esenciales asp, asn, ala, pro, cys, tyr, met para medio L15	48

5.21. Representación gráfica de los flujos en el metabolismo central para medio L15	51
5.22. Curva de Crecimiento y parámetros asociados al medio SFX.	55
5.23. Zonas de estados metabólicos en curva de crecimiento para medio SFX . . .	56
5.24. Perfil de concentración de glucosa, glutamina y sacarosa para medio SFX . .	57
5.25. Perfil de concentración de amonio y lactato para medio SFX.	57
5.26. Perfil de aminoácidos esenciales gln, arg, lys para medio SFX	58
5.27. Perfil de aminoácidos esenciales thr, val, ile, leu, phe para medio SFX	59
5.28. Perfil de aminoácidos no esenciales glu, ser, gly, his para medio SFX	59
5.29. Perfil de aminoácidos no esenciales asp, asn, ala, pro, cys, tyr, met para medio SFX	60
5.30. Representación gráfica de los flujos en el metabolismo central para medio SFX	63
5.31. Representación gráfica de los flujos en el metabolismo central comparando los 3 medios	68
5.32. Tabla comparativa de la nueva concentración de aminoácidos y azúcares para los medios de cultivo	70

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes generales

Chile es una de las potencias exportadoras de filete de pescado a nivel mundial, mercado el cual mueve alrededor de 25B US\$ al año, situándose en el segundo lugar con un 11 % de las exportaciones, seguido por Noruega con un 8 % [1] (Figura 1.1). Si solo se considera el mercado de exportación de salmón y trucha, se observa que es un mercado creciente que en los últimos años genera ganancias superiores a los 3.000 MM US\$ al año, superando la barrera histórica de los 5.000 MM US\$ durante el año 2018 (Figura 1.2). En particular, más del 90 % de estas ganancias son generadas por la exportación de algún tipo de salmón, principalmente salmón atlántico y salmón pacífico [2].

Aun cuando se alcanzan estos valores, reportes oficiales indican que al menos 15 agentes causantes de enfermedades han sido diagnosticados desde centros de cultivos de salmones en Chile. Existen pérdidas de un 10-50 % de los cultivos en crecimiento debido a enfermedades infecciosas, de las cuales entre el 50-95 % corresponden a Piscirickettsiosis o síndrome rickettsial del salmón (SRS) [3], enfermedad sistémica severa que afecta los tejidos y órganos de un alto espectro de salmonídeos y otros peces [4] provocada por *Piscirickettsia salmonis*. Hasta ahora es una de las enfermedades que más amenaza la sostenibilidad de la industria salmoneera en Chile, produciendo pérdidas de 19 MM US\$ al año solo considerando costos directos de mortalidad pero sin considerar costos indirectos como son el tratamiento, disminución de rendimiento y otros costos relacionados con la enfermedad [3].

Como antecedente, *P. salmonis* es una bacteria gram-negativa, facultativa intracelular [5, 6], pleomórfica aunque predominantemente cocoide con un diámetro entre 0,1 a 1,5 μm [7, 8] sin movilidad ni cápsula. El primer reporte de *P. salmonis* fue una epidemia ocurrida en 1989 en la Región de Los Lagos, y afectó un cultivo de salmón pacífico (Coho). El brote fue descrito posteriormente en cultivos en varios países, afectando principalmente a cultivos en fase de engorde. Las especies más afectadas en orden de susceptibilidad son: salmón del Pacífico o Coho (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón del Atlántico (*Salmo salar*), aunque también afecta a otras especies salmonídeas de menor impacto [9].

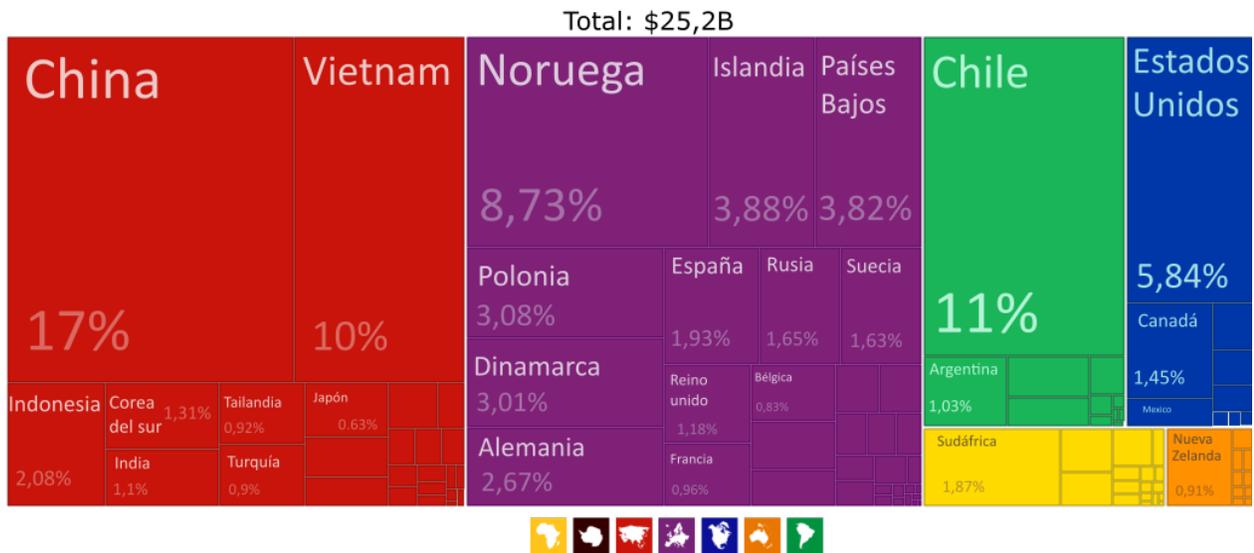
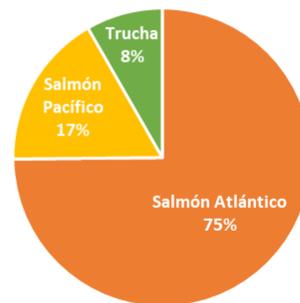
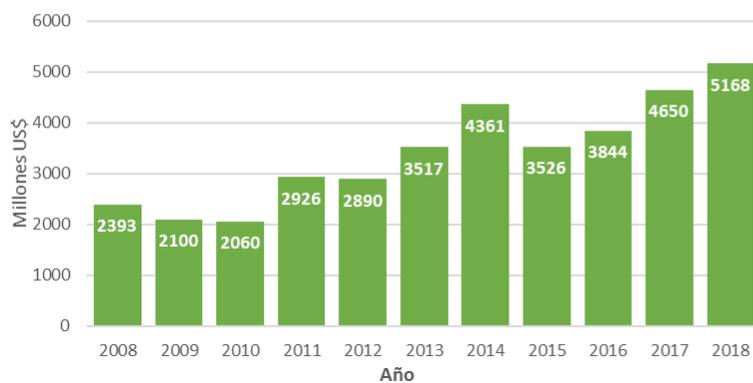


Figura 1.1: Representación gráfica de países que exportan filetes de pescado (2018) - OEC [1].

A partir de este punto, se realizaron investigaciones para aislar y caracterizar a *P. salmonis* y así comenzar a trabajar en una solución para este problema. Hasta la fecha el desarrollo para el control y tratamiento de esta enfermedad no ha tenido mucho éxito y depende en la utilización de altas dosis de antibióticos. En un principio se consideraba que *P. salmonis* no se podía cultivar sin una célula huésped pero existen varios ejemplos de crecimiento en agar o medios de cultivo donde fue posible crecimiento in vitro [6]. Actualmente, se cuenta con 24 licencias de vacunas aceptadas por el Servicio Agrícola y Ganadero [10] que protegen al pez durante 5 a 6 meses, esto debido a que *P. salmonis* se comporta de manera más agresiva una vez infectado el huésped [11].

Exportaciones Chilenas de salmón y trucha
Millones US\$ FOB Chile



Año 2018 - Total 5196 US\$

Figura 1.2: Evolución de exportaciones Chilenas de salmón y trucha en los últimos 10 años (Izquierda). Exportaciones Chilenas de Salmón y Trucha distribuidas por especie (Derecha) [2].

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Descripción del proyecto

Para esta memoria de título se trabajó en conjunto con la empresa VacciVet de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde actualmente se produce una vacuna para *P. salmonis*. Sin embargo, la producción de ésta se realiza en medios de cultivos no optimizados para este microorganismo.

Por lo tanto, para este proyecto se buscó optimizar un medio de cultivo acorde a los requerimientos celulares de *P. salmonis*, midiendo la concentración de diferentes metabolitos en el sobrenadante del medio de cultivo a lo largo del desarrollo celular.

1.2.2. Justificación

Actualmente VacciVet utiliza 3 medios de cultivo para *P. salmonis* : *Grace's insect media*, *L15 Media*, *SFX*; *Grace's insect media*, es un medio especializado para líneas celulares de insecto de composición definida, libre de proteína, suero bovino fetal (FBS), hemolinfa de insecto o extracto de levadura [12] [13]. *L15 Media* es un medio diseñado para el crecimiento celular en ambientes sin equilibrios de CO_2 , está libre de glucosa, proteínas, lípidos o factores de crecimiento [14] [15]. Finalmente el medio *SFX* está diseñado para el crecimiento celular de múltiples líneas celulares de insectos y producción de proteínas recombinantes, es un medio libre de proteínas de composición reservada, este último medio es el que obtiene mejores resultados de producción además de ser el más costoso de los 3 [16].

Se identifican 2 problemas:

1. El costo del medio cultivo *SFX* eleva los costos de producción, no obstante, es el que mejores resultados genera.
2. Se desconoce la composición de este tercer medio.

Si se conociera la composición de *SFX* se podría disminuir costos de producción al asemejar alguno de los otros medios ya conocidos con algún tipo de suplementación. El problema es que hacer un análisis exhaustivo de cada uno de los componentes requiere tiempo, equipamiento y puede llegar a ser poco costo/eficiente. Por otro lado, si se conociera el requerimiento celular de *P. salmonis*, se podría suplementar cualquier medio de composición conocida con los metabolitos y concentraciones necesarias, disminuyendo así los costos operacionales y de producción.

El proyecto se resume en la optimización de medio de cultivo para *P. salmonis* mediante el estudio de su requerimiento celular. Para ello, VacciVet proporcionará muestras de sobrenadante de los diferentes medios de cultivo obtenido a lo largo del crecimiento de *P. salmonis*, además orotgará la densidad optica OD600 nm para obtener las concentraciones de biomasa para cada uno de los tiempos. Dichos datos son necesarios para el análisis de metabolitos en el sobrenadante de los cultivos a lo largo del tiempo para finalmente poder identificar cuáles

son los componentes esenciales en el desarrollo de este MO.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

El trabajo tiene como objetivo general proponer una composición de medio de cultivo acorde a los requerimientos celulares de *P. salmonis*.

1.3.2. Objetivos específicos

Específicamente se busca:

- Identificar los requerimientos celulares de *P. salmonis*.
- Diseñar medios de cultivo ideales según los requerimientos.
- Identificar suplementos necesarios para asemejarse al medio de cultivo ideal. A partir de medio de cultivo de composición conocida.

1.4. Resultados esperados

Se espera obtener la caracterización del crecimiento celular en los distintos medios de cultivo, y con ello, la velocidad de consumo de ciertas fuentes de carbono y aminoácidos.

Conocer la composición de aminoácidos y fuentes de carbono del medio SFX.

Finalmente, proponer medios de cultivo que logren satisfacer los requerimientos celulares de *P. salmonis*, y con ello poder suplementar medios ya utilizados alcanzando mejor rendimiento que el medio actual.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Diseño de medio

2.1.1. Medios de cultivo estequiométricos

Los cultivos celulares dependen de nutrientes para generar energía, biomasa y productos. Por lo tanto, suplementar adecuadamente un medio de cultivo es crucial para que el crecimiento celular sea óptimo y se minimicen las posibles pérdidas de producción. Para poder diseñar un medio de cultivo utilizando principios estequiométricos y conocimientos cinéticos, es necesario conocer y entender algunos conceptos que se presentan a continuación.

El peso celular

El componente más abundante en la masa celular es el agua, que varía en un rango desde el 90 % en algunas plantas, 80 % - 85 % en células animales y 70 % en bacterias. Debido a esta variación y a que los porcentajes dependerán de cuánta agua adquiera cada célula durante su crecimiento, es que en materia de balance, solo se habla de **peso seco**. En otras palabras, de ahora en adelante, cuando se hable de peso se estará hablando de peso seco.

En general la biomasa seca en bacterias, levaduras y células animales está en el orden de 10^{-12} , 10^{-11} y 5×10^{-10} gramos por célula [17].

Bacteria	10^{-12} g/célula
Levadura	10^{-11} g/célula
Promedio célula animal	$3-6 \times 10^{-10}$ g/célula

Tabla 2.1: Peso seco usual en células

Balance de la materia en el crecimiento celular

El balance de la materia siempre se mantiene y el medio celular no es una excepción. Toda la materia que entra, que sale y la que se acumula estará siempre balanceada. Los nutrientes más comunes y más abundantes en el medio celular son glucosa y glutamina, que funcionan como fuentes de energía. Otros componentes como lípidos, sus precursores, las vitaminas y sales, forman parte de las células y contribuyen en menor medida a la generación de energía.

Para generar energía la glucosa se convierte en lactato, CO_2 y H_2O a través de la glicólisis, el ciclo TCA y la vía de pentosas fosfato. Por otro lado la glutamina es deaminada, liberando NH_3 antes de ser utilizada en metabolizar energía. Es por esta razón que es común ver la acumulación de ciertos metabolitos como lactato, NH_3 , CO_2 y H_2O . En algunos casos, los grupo amino al metabolizar glutamina son exportados como aminoácidos no esenciales tales como alanina, asparagina, prolina y a veces como NH_3 . Finalmente, la energía metabolizada es utilizada en la creación de nueva biomasa (síntesis de ADN, ARN, proteínas, etc), mantener el balance osmótico de la célula, mantener el potencial de membrana y la formación de producto.

Para balancear las fórmulas estequiométricas se utiliza carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, ignorando cualquier otro elemento. Estas fórmulas permiten describir proporciones de ciertos elementos, pudiendo asignar arbitrariamente los números estequiométricos que les otorgarán un "peso aparente" en la fórmula [17].

Como se muestra en Figura 2.1, solo se consideran los elementos C,H,N,O en la ecuación estequiométrica, es por eso que solo se considera glucosa, glutamina y otros aminoácidos como promedio de peso. Por otro lado, en productos se encuentra la nueva biomasa y los productos exportados.

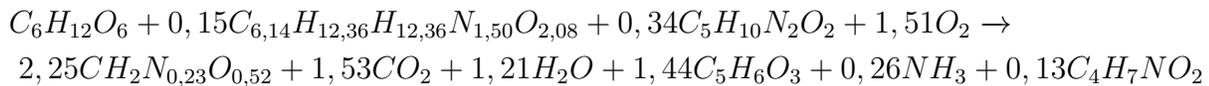


Figura 2.1: Fórmula ejemplo de crecimiento celular utilizada al hacer MFA. Los términos incluyen: Glucosa + Peso promedio de aminoácido + Glutamina + Oxígeno \rightarrow Biomasa + Dióxido de carbono + Agua + Lactato + Alanina [17].

Debido a que no se tiene la fórmula empírica de biomasa de *P. salmonis*, se realizó una búsqueda utilizando la base de datos de *Leibniz Institute DSM* la cual compara lo genomas de diferentes microorganismos en busca de similitudes entre ellos y los ordena en un árbol filogenético. Se logra identificar a *Nitricola lacisaponensis* y *Pseudomonas*, como se muestra en la Figura 2.2, ambas bacterias gram-negativas [18–25]. Por otro lado, existen estudios donde se compara el modelos metabólicos de *P. salmonis* con diferentes bacterias patógenas tales como *Klebsilla pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Francisella tularensis* [26]. Se identifica en intersección entre ambas aproximaciones

(acercamiento filogenético y comparación de modelos metabólicos) a *Pseudomonas* la cual posee su fórmula empírica reportada como $CH_2N_{0,23}O_{0,52}$ [27] incluida en la Figura 2.1.

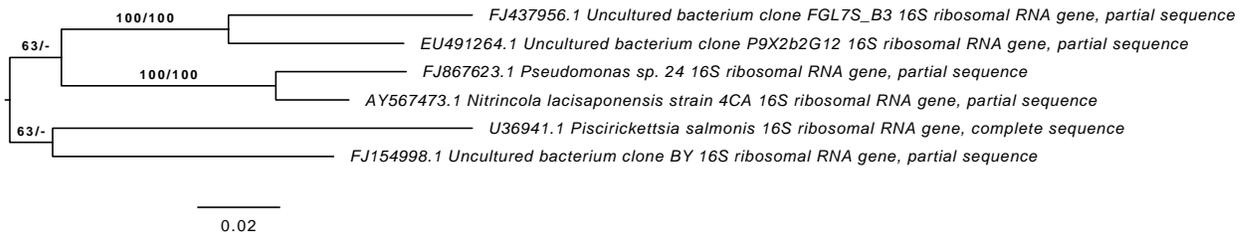


Figura 2.2: Resultado de la búsqueda filogenética de *P. salmonis* [18–25].

Crecimiento celular

El crecimiento celular está descrito por la curva de crecimiento y la curva de consumo de nutrientes. La curva de crecimiento celular se encuentra dividida en diferentes etapas [17,27]:

- Fase de adaptación (Latencia o Lag phase)
- Crecimiento exponencial
- Fase estacionaria
- Fase de muerte celular

La fase de adaptación suele durar horas, pero puede experimentar hasta 1 a 2 días de muy lento crecimiento [26], el que podría ser causado por una concentración de inoculación muy pequeña o que pase por medios de composiciones muy diferentes entre si [17,27].

La fase de crecimiento exponencial se caracteriza por presentar comportamiento lineal al momento de hacer una curva semi-logarítmica en el tiempo, este periodo suele ser corto en extensión y es difícil de apreciar el momento de transición entre la fase de adaptación/exponencial o exponencial/estacionaria [17,27].

La fase exponencial está marcada por una razón de crecimiento constante o un tiempo de duplicación de biomasa (t_d). Pasada esta etapa, la razón de crecimiento celular disminuye alcanzando la fase estacionaria, esta transición puede estar explicada por agotamiento de nutrientes o acumulación de metabolitos inhibidores de crecimiento. La razón de ser estacionario se debe al equilibrio entre el crecimiento celular y las muertes de éstas, en otras palabras, el constante crecimiento celular y un incremento de la muerte celular [17,27].

Cuando la razón de muerte celular supera el crecimiento celular se alcanza la última fase, explicada por la inhibición de crecimiento por acumulación de metabolitos tóxicos o por el agotamiento de los nutrientes [17,27].

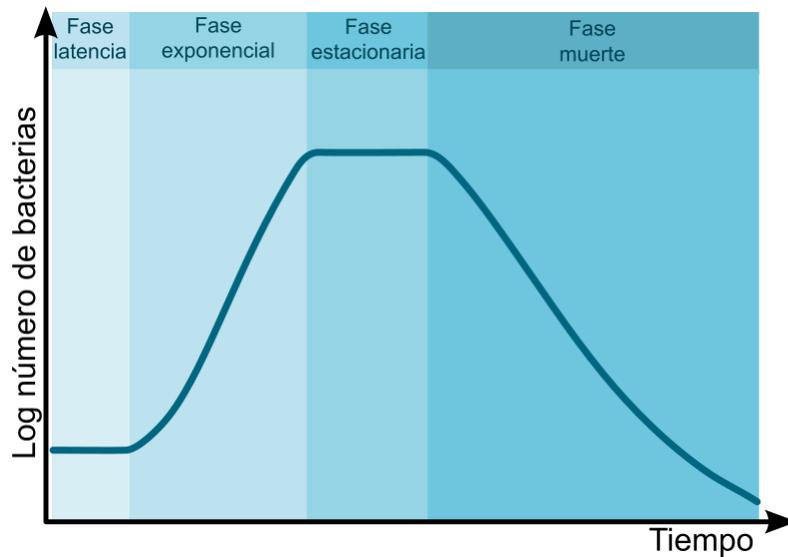


Figura 2.3: Curva semi-logarítmica de crecimiento celular donde se muestran sus 4 fases de crecimiento [27].

2.1.2. Caracterización cuantitativa del crecimiento celular

Como se mencionó anteriormente, el crecimiento celular se puede describir por la curva de crecimiento y la curva de consumo de nutrientes. De estos se puede obtener diferentes clases de cuantificadores [17, 27]:

- Perfiles de concentración (celular, nutrientes, metabolitos y productos).
- Parámetros cinéticos (razones específicas de crecimiento, consumo de nutrientes y formación de productos).
- Razones estequiométricas.

El primer punto se refiere a las cantidades por unidad de volumen de cultivo y también dependerá si se está observando los cambios de concentración celular, nutrientes o producto. Un cambio rápido de concentración puede significar tener mayor cantidad de células o tener células más activas [17, 27].

Razón de Crecimiento (G) Cambio de la concentración por unidad de tiempo, número de células/L-hr ó g de células/L-hr.

x: Variable de concentración celular

$$G = \frac{dx}{dt} \quad (2.1)$$

El segundo punto son las razones específicas, las que se refieren a los cambios por unidad de tiempo normalizados. Describen qué tan activa está cada unidad celular produciendo más

biomasa (razón específica de crecimiento), consumo de glucosa (razón específica de consumo de glucosa) o producción de lactato (razón específica de producción de lactato). Con la razón específica de crecimiento se puede obtener el tiempo de duplicado celular como se muestra en la ecuación [17, 27].

Razón de crecimiento específica (μ) Número de células/célula-hr, g célula/g célula-hr o 1/hr.

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \mu x \\ \mu &= \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}\end{aligned}\tag{2.2}$$

Tiempo de duplicación tiempo, día, hr, etc.

$$\begin{aligned}\ln \frac{x_2}{x_1} &= \mu(t_2 - t_1) \\ t_d &= \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}\end{aligned}\tag{2.3}$$

Razón específica de consumo de nutrientes g nutrientes/ g células-hr.

s: concentración de sustrato o nutriente

$$q_s = \frac{-1}{x} \frac{ds}{dt}\tag{2.4}$$

Razón específica de formación de producto

p: concentración de producto

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt}\tag{2.5}$$

El tercer punto se refiere a las razones estequiométricas y coeficientes de rendimiento, que sirven para evaluar qué tan eficiente es la conversión de material o, en otras palabras, cuántos de los nutrientes son destinados a crear nuevas células o productos. Un ejemplo de esto es la razón estequiométrica de lactato/glucosa, la cual es un poderoso indicador para saber si se está prefiriendo una vía glicolítica u oxidativa. Si existe más glucosa pasando de glicólisis a lactato, la razón será cercana a 2 mol lactato/mol glucosa; por otra parte, si la razón es cercana a cero indica que la mayoría de la glucosa pasa por el ciclo TCA [17, 27].

Razón estequiométrica de lactato glucosa

$$\alpha = \frac{\Delta L}{\Delta G} \frac{dL}{dG} \quad (2.6)$$

2.1.3. Diseño de medio por medio de nutrientes consumidos

Para prolongar en mayor medida la fase exponencial del cultivo se debe intentar abastecer el medio de cultivo con los nutrientes que estén escaseando. En condiciones de crecimiento estable, las tasas de consumo específicas de varios nutrientes son relativamente constantes y de igual manera lo son las proporciones de consumo o la producción de metabolitos. Estas proporciones de velocidad se llaman razones estequiométricas. Si se agregan nutrientes en las proporciones estequiométricas adecuadas para que coincidan con sus tasas de consumo, evitará que el crecimiento celular se detenga de manera temprana por agotamiento de nutrientes [17].

Las razones estequiométricas se pueden calcular utilizando los datos de cultivo de interés en las condiciones o fase que se desee prolongar. Para calcularlas, se elige un componente como nutriente de referencia, donde las opciones más comunes son glucosa, glutamina, oxígeno y lactato, ya que se consumen o producen en grandes cantidades y son relativamente fáciles de medir [17].

La idea de alimentación estequiométrica es que si todos los nutrientes se consumen en proporción y se conoce la cantidad consumida por el nutriente de referencia se puede calcular la cantidad consumida para todos los demás nutrientes [17].

Por otro lado, las células no consumen todos los nutrientes en la misma proporción bajo diferentes condiciones o en las diferentes etapas de crecimiento, ya que las razones estequiométricas no son necesariamente lineales, es por ello que se debe considerar las diferentes etapas del crecimiento celular al momento de calcular los medios de cultivo. Idealmente si se intenta prolongar la fase exponencial del medio de cultivo, es necesario calcular las razones estequiométricas en dicha fase [17].

Una vez determinada la composición teórica del medio, esta debe ser evaluada, los resultados obtenidos analizados y el medio reajustado hasta llegar a un medio óptimo. El medio óptimo puede resultar como un suplemento a partir de un medio base o la creación de un medio de cultivo desde cero, diseñado específicamente para el microorganismo [17].

2.2. Análisis de Flujo Metabólico - MFA

MFA es el conjunto de balance de materia en un sistema metabólico biológico bajo el supuesto de estado estacionario. La idea general consiste en tener entradas y salidas para tratar de resolver un sistema de ecuaciones que responda a las reacciones metabólicas que ocurren en el microorganismo [17, 28] tal como se muestra en el ecuación 2.7.

$$Ax = r, \quad (2.7)$$

donde A son los coeficientes estequiométricos de las matriz de reacciones, x es el vector desconocido de flujos y r corresponde al vector de razones de consumo y producción. El consumo y producción de nutrientes y metabolitos son incorporados en r (calculados según los perfiles de consumo/producción que se buscan caracterizar), algunas producciones de metabolitos son consideradas cero, debido a la hipótesis de pseudo estado estacionario [17,28]. Como la matriz A generalmente no es cuadrada, se estima que x se puede escribir como:

$$x = (A^T \Psi^{-1} A)^{-1} A^T \Psi^{-1} r, \quad (2.8)$$

Donde Ψ corresponde a la matriz de varianza-covarianza asociada al vector r . Una vez que se estimó el vector de flujo metabólico, la sensibilidad de los flujos metabólicos a las mediciones se estimaron a partir de:

$$\frac{\partial x}{\partial r} = (A^T \Phi^{-1} A)^{-1} A^T \quad (2.9)$$

Lo que se desea obtener finalmente es \mathbf{x} , el vector de flujos para cada uno de los metabolitos. Como uno incorpora \mathbf{A} , la matriz de reacciones metabólicas, además de \mathbf{r} , las razones consumo/producción de los metabolitos, es posible despejar los flujos x , con este valor y luego de un estudio de sensibilidad de los flujos de x , como se muestra en la ecuación 2.9 y con la matriz estequiométrica, se puede volver a despejar las tasas de consumo/producción corregidas para cada uno de los metabolitos.

Por lo tanto, una vez obtenidos los resultados de MFA, se obtienen las razones específicas de consumo o producción. Finalmente, se debe verificar que el balance estequiométrico de C,N sean consistentes para considerar que los resultados tengan sentido [17,28].

2.2.1. Definir ecuaciones estequiométricas

Para la construcción de la matriz estequiométrica es necesario definir cuáles son las ecuaciones que se considerarán dentro del modelo de estudio. En la Figura 4.1 se observa la vía simplificada considerando solo carbohidratos y aminoácidos [17,28].

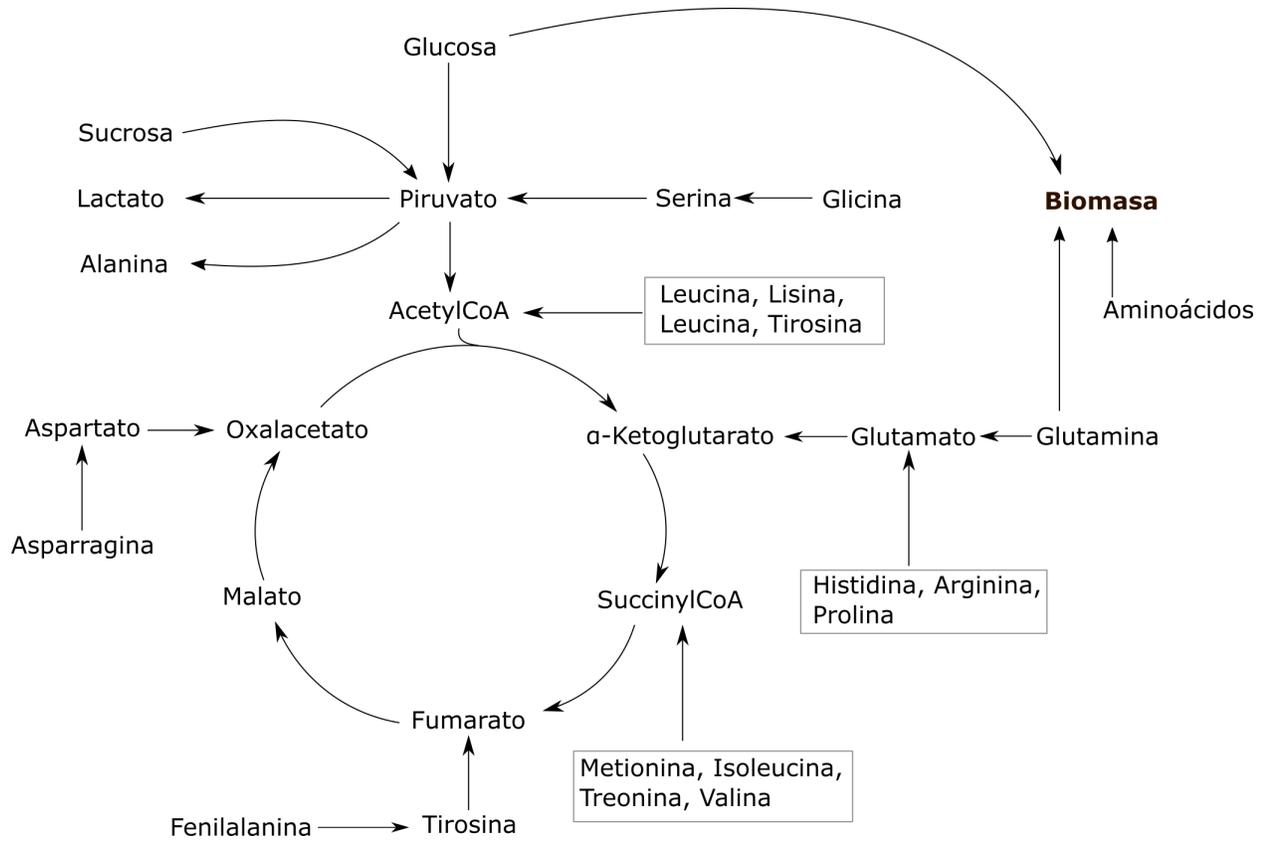


Figura 2.4: Modelo simplificado de vía metabólica central y vía de metabolismo de aminoácidos

En las siguientes tablas se presentan las ecuaciones a considerar en el modelo:

Reactivos	Productos
GLC	$\rightarrow 2PYR$
PYR	$\rightarrow LAC$
PYR	$\rightarrow AcCoA + CO_2$
$AcCoA + OAA$	$\rightarrow SucCoA + CO_2$
αKG	$\rightarrow SucCoA + CO_2$
$SucCoA$	$\rightarrow FUM$
FUM	$\rightarrow MAL$
MAL	$\rightarrow OAA$
GLN	$\rightarrow GLU + NH_3$
GLU	$\rightarrow \alpha KG + NH_3$
MAL	$\rightarrow PYR + CO_2$

Tabla 2.2: Ecuaciones consideradas en el modelo de la vía metabólica central [17].

Reactivos	Producto
0,021 Glc	
0,013 Ala	
0,000 Cys	
0,010 Ser	
0,016 Gly	
0,010 Lys	
0,013 Leu	
0,038 Gln	
0,003 His	
0,008 Pro	
0,007 Arg	\rightarrow Biomasa
0,001 Glu	
0,000 Asn	
0,026 Asp	
0,008 Ile	
0,003 Met	
0,008 Thr	
0,010 Val	
0,004 Tyr	
0,005 Phe	

Tabla 2.3: Ecuación para la formación de biomasa [17]

Reactivos	Productos
$PYR + GLU$	$\rightarrow ALA + \alpha KG$
SER	$\rightarrow PYR + NH_3$
$2GLY$	$\rightarrow SER + CO_2 + NH_3$
CYS	$\rightarrow PYR + NH_3$
$ASP + \alpha KG$	$\rightarrow OAA + GLU$
ASN	$\rightarrow ASP + NH_3$
HIS	$\rightarrow GLU + 2NH_3 + CO_2$
$ARG + \alpha KG$	$\rightarrow 2GLU + 2NH_3 + CO_2$
PRO	$\rightarrow GLU$
$ILE + \alpha KG$	$\rightarrow SucCoA + AcCoA + GLU$
$VAL + \alpha KG$	$\rightarrow GLU + CO_2 + SucCoA$
$MET + SER + \alpha KG$	$\rightarrow CYS + SucCoA + GLU$
THR	$\rightarrow SucCoA + NH_3$
PHE	$\rightarrow TRY$
$TYR + \alpha KG$	$\rightarrow GLU + FUM + 2AcCoA + CO_2$
$LYS + 2\alpha KG$	$\rightarrow 2GLU + 2CO_2 + 2AcCoA$
$LEU + \alpha KG$	$\rightarrow GLU + 3AcCoA$

Tabla 2.4: Ecuaciones consideradas en el metabolismo de aminoácidos [17].

2.2.2. Balance de carbono y nitrógeno

Existen dos momentos cruciales donde es necesario realizar un balance de carbono y nitrógeno dentro del modelo. La primera vez es al momento de obtener \mathbf{r} , se debe verificar que la cantidad de carbono/nitrógeno producido será igual a los consumidos, con un margen de tolerancia definido para este caso en un 20% para que al momento de ser introducidos a la matriz, el estudio de sensibilidad arroje valores razonables. La segunda vez, será para verificar los valores obtenidos después del MFA [17, 28].

Obteniendo los resultados del MFA es posible realizar el método de diseño por medio de nutriente consumidos, para así poder diseñar o modificar el medio empleado para el cultivo [17, 28].

Capítulo 3

Metodología

Considerando los objetivos y alcances declaradas para este trabajo de título, la metodología se compone de diferentes métodos de análisis de medios de cultivo, el primero de ellos es una recopilación bibliográfica hasta el día de hoy sobre medios de cultivo utilizados para *P. salmonis*. El siguiente consiste en el análisis de concentraciones de diferentes metabolitos (aminoácidos y fuentes de carbono) para los diferentes medios de cultivo en distintos tiempos de crecimiento celular.

3.1. Recopilación bibliográfica y comparación de medios de cultivos reportados

Para el desarrollo de este trabajo de título fue necesario realizar una recopilación bibliográfica sobre medios de cultivos utilizados para el crecimiento de *P. salmonis* desde que se logra aislar hasta el día de hoy. Además se realizó una comparación de medios de cultivo de composición conocida, comparando en primer lugar los resultados obtenidos en cuanto a concentración máxima de biomasa y un análisis de su composición dividido en: **sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, azúcares o fuentes de carbono, y otros componentes.**

3.2. Caracterización de crecimiento celular

Para la caracterización del medio de cultivo fue necesario obtener datos de la absorbancia del medio en distintos tiempos del crecimiento celular y poder relacionarlo con la concentración de biomasa en cada una de las muestras. Obteniendo esta curva de calibración, fue posible relacionar la absorbancia y la biomasa de cada medio. Con esta información, se calculan la velocidad máxima de crecimiento y las tasas específicas de consumo/producción, ambas definiciones se encuentran explicadas con mayor detalles en el capítulo anterior.

Velocidad Máxima de Crecimiento: este parámetro indica qué tan rápido fue el creci-

miento celular en la fase exponencial del cultivo. Esta tasa de cambio se calcula con un gráfico semi logarítmico, como la derivada de la curva de concentración obtenida durante esta etapa. Este valor servirá para comparar en los distintos medios de cultivo.

Tasas Específicas de Consumo/Producción: se calculan las tasas específicas de consumo y producción extra celular de metabolitos de interés.

3.3. Análisis de medio de cultivo

Se midió la concentración de diferentes metabolitos en el sobrenadante de cultivo a lo largo del crecimiento celular. Para ello se utiliza el equipo HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizando métodos de cromatografía de interacción hidrofóbica para medir concentraciones de aminoácidos y el equipo Y15 con ensayos de espectrofotometría tras cadena de reacción enzimática para medir glucosa, sacarosa, amonio y ácido láctico y así, poder obtener los datos de perfiles de concentraciones para cada uno de los metabolitos.

3.3.1. Concentración de aminoácidos

Para la medición de aminoácidos se utilizó el equipo HPLC Shimadzu Japan, que se encuentra en el CeBiB y una columna C18 de 4.6 X 150 mm de la marca PerkinElmer, se utilizó el método de cromatografía de fase reversa con interacción hidrofóbica para realizar la cromatografía de los medios de cultivo. La metodología utilizada se observa en la Figura 3.1. El protocolo completo de medición de aminoácidos se encuentra adjunto en el Apéndice A



Figura 3.1: Metodología para Concentración de de aminoácidos en los diferentes medios. La derivatización de las muestras se realiza con el kit de marca Waters, para dejar las muestras a disposición para el equipo.

3.3.2. Concentración de fuentes de carbono

Se mide la concentración de glucosa y sacarosa utilizando un kits de espectrofotometría enzimática medidas por el equipo Y15 de que se encuentra en el área de cultivo de células animales del CeBiB. Ver Apéndice B-E

Concentración de glutamato y glutamina

Se utilizó el kit Sigma-Aldrich "Glutamine/Glutamate Determination kit" que requiere un espectrofotómetro de con capacidad de lectura a 340nm también disponibles en el CeBiB. La metodología completa se encuentra en Apéndice F

3.3.3. Otras concentraciones de metabolitos relevantes

Se mide concentraciones de ácido láctico con kit de espectrofotometría enzimática con el equipo Y15 que se encuentra en el área de cultivo de células animales del CeBiB, para poder obtener razones estequiométricas relevante como lo es $\Delta L/\Delta G$, explicada en el capítulo anterior.

3.4. Análisis de Flujo Metabólico - MFA

Para el análisis de Flujo metabólico se utilizó un algoritmo implementado en Excel mostrado en la Figura 3.2, donde los pasos claves consistieron en la obtención de las razones específicas de consumo/producción, obtenidas con los datos de las metodologías anteriores, y la construcción de la matriz estequiométrica donde se deben incluir las reacciones del metabolismo central simplificadas, formación de biomasa y metabolismo de aminoácidos.



Figura 3.2: Metodología para Análisis de Flujo Metabólico

3.5. Diseño por medio de nutrientes consumidos

Se calcularon las razones estequiométricas en base a los datos experimentales, utilizando la glutamina como nutriente de referencia para el resto de los aminoácidos y la glucosa como referencia para glutamina y sacarosa. Se formuló el medio de cultivo considerando el 50 % del incremento sugerido para el caso de los aminoácidos que deben aumentarse y los que deben mantenerse o están alimentados en exceso no fueron modificados.

Capítulo 4

Medios de cultivo

Desde que se logró caracterizar a *P. salmonis*, se ha intentado diseñar un medio de cultivo que se ajuste a sus requerimientos celulares, existiendo diversos estudios que buscan dar con una respuesta a esta problemática. A continuación se presenta una reseña histórica con sus principales hallazgos y comparación de medios de cultivo presentes en la literatura.

4.1. Contexto histórico

En 1993 cuando recién se caracterizó *P. salmonis* se describía como una bacteria inmóvil, que solo podría crecer en líneas celulares [29]. Hasta ese momento no se conocía muy bien los mecanismos de infección de *P. salmonis* pero se especulaba que era por infección directa (basándose las simulaciones de infección hechas en condiciones de laboratorio). Para probar que esto podía ocurrir en condiciones naturales se debió demostrar que *P. salmonis* podía sobrevivir al menos en un rango de tiempo de manera extracelular. En 1994 se logra demostrar que podía sobrevivir durante 21 días en medio celular MEM con 10 % de Suero Bovino Fetal y en condiciones de agua con alta salinidad (3 % - 2 %) [30].

Diez años después, en el 2004, se probó que *P. salmonis* no solo podía crecer en línea celular de peces, sino también en línea celular de insecto obteniéndose rendimientos 100 veces mejores a temperaturas cercanas a los 24 °C [31].

En los primeros 20 años desde la aparición de *P. salmonis* solo se había podido cultivar en tejido celular, además al ser muy sensible a antibióticos era necesario crecerla en medio de cultivo libre de ellos, en otras palabras, volvía el medio de cultivo un posible foco de contaminación, por lo que crecer el microorganismo era muy costoso. Durante el año 2008 se logra aislar la sepa NVI 5692 en agar sangre [32] además de probar la dependencia de *P. salmonis* a la cisteína. De manera paralela el mismo año se logra aislar la sepa LF-89, ALT-4-91 y NOR-92 en agar sangre reforzando la hipótesis de dependencia de la cisteína. Además se demuestra no ser necesario el Suero Fetal Bovino que hasta entonces se consideraba crítico para el crecimiento de *P. salmonis*. Estos estudios fueron los primeros en reforzar la capacidad intracelular facultativa de *P. salmonis* [5].

En el año 2012 la Universidad Austral crea un medio de cultivo líquido libre de sangre siendo esta reemplazada por sales férricas con alto contenido de cisteína (respaldado por los estudios anteriores), además de Suero Bovino Fetal, extracto de levadura, peptona y otros componentes. Se concluye que en medio líquido *P. salmonis* crece más rápido que en medio sólido [33] además de poder reemplazar la sangre por sales férricas.

El siguiente año surge un estudio que busca definir las condiciones óptimas para un medio de cultivo líquido libre de sangre, el cual propone una composición novedosa utilizando distintas proporciones de extracto de levadura y peptona. Se estudia la temperatura y pH óptimo entre rangos de 17 °C y 29 °C para la temperatura y 6,6 y 7,1 para el pH. Se demuestra una mayor tasa de crecimiento celular entre 23 °C y 27 °C a pH de 6,6 [34].

Por lo tanto, hasta mediados del 2017 con la información que se tenía disponible, diferentes estudios tratado de diseñar un medio de cultivo que se ajuste a los requerimientos de *P. salmonis* [35], por otro lado, ese mismo año se comienzan a realizar publicaciones sobre análisis metabólico a escala genómica para entender su metabolismo completo, recopilando toda la información y secuenciación que se tiene del MO. [26]

4.2. Comparación de medios de cultivos en la literatura

Se comparan los resultados obtenidos en cuanto a concentración máxima de biomasa y se realiza un análisis sobre su composición dividida en 5 grupos: **sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, azúcares o fuentes de carbono y otros componentes.**

Para facilitar la lectura de las siguientes tablas se presenta un sistema de barras de colores donde el nivel de llenado de celda representa gráficamente la normalización de los datos con respecto al valor más alto de la fila. Esto permite identificar rápidamente el valor de mayor magnitud.

	Yáñez 2012	Novel Liquid Medium 2013		WO 2016/082050		(Cortéz et al. 2017)	
	AUSTRAL-SRS	Yeast - Pep. (8-8 g/L)	Yeast - Pep. (4-8 g/L)	MD1	MD2	BM1	BM3
Concentración de biomasa Máx. (OD 600 nm)	1,8	2	1,7	2,25	5,5	1,26	1,22
Dry Cell Weight (DCW) [mg/L]	-	800	700	700	1650	-	-
Nº células/mL	-	-	-	2.70E+09	7.20E+09	-	-

Tabla 4.1: Comparación de concentración de biomasa máxima, peso seco celular y número de células por ml de muestra en diferentes medios de cultivos [26, 33, 34, 36].

Las primeras características comparables entre los diferentes medios son las concentraciones de biomasa máxima (OD 600 nm), el peso seco celular [mg/L] y Número de células /mL, que se han obtenido según bibliografía, pudiendo identificar cuál de los medios ha tenido mejor resultados (Tabla 4.1).

De la Tabla 4.1 se observa que el medio con mejores resultados reportados en cuanto a concentración de biomasa, peso seco y número de células es el MD2 del trabajo WO 2016/082050, seguidos por el MD1 de la misma publicación, es por ello que de ahora en adelante, se resalta con un sombreado de color gris para no perder la referencia en los siguientes análisis.

4.2.1. Sales inorgánicas

Las sales inorgánicas son importantes en los medios de cultivo porque satisfacen necesidades fisicoquímicas para los microorganismos que crecerán en ellos. En particular porque algunos componentes son requeridos para mantener el pH ajustado o a los niveles que requiere el MO, como es el caso del bicarbonato de sodio, que será determinado por la concentración de CO₂ en fase gaseosa.

Las sales tales como Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ y HCO₃⁻ son los principales componentes que contribuyen con la osmolaridad del medio [37]. Cationes como Ca²⁺ actúan como intermediarios en señales de transducción. Na⁺, K⁺ y Cl⁻ regulan el potencial de membrana y SO₄²⁻, PO₄³⁻ y HCO₃⁻ tienen el rol de ser aniones requeridos en precursores nutricionales de macromoléculas, así como reguladores de carga intracelular [37].

En la Tabla 4.2 se observan los componentes que son fuentes de los diferentes aniones y cationes ya mencionados.

Se puede observar que las distintas fuentes de calcio y magnesio poseen concentraciones 2 magnitudes mayores en los medios BM1, BM3 en contraste a las concentraciones descritas en los demás medios.

En cuanto a las fuentes de hierro, se encuentra disponibles en todos los medios, este componente es requerido por *P. salmonis* dado que es una bacteria que causa anemia [38] y se utiliza en reemplazo de agar sangre [5, 32, 33].

Las fuentes de potasio mantienen la misma magnitud entre los diferentes medios.

Las fuentes de sodio poseen la misma magnitud en cada uno de los medios, pero llama la atención la alta concentración de cloruro de sodio para cada uno de ellos exceptuando los medios BM1 y BM3.

	Yáñez 2012	Novel Liquid Medium 2013		WO 2016/082050		(Cortéz et al, 2017)	
	AUSTRAL-SRS	Yeast - Pep. (8-8 g/L)	Yeast - Pep. (4-8 g/L)	MD1	MD2	BM1	BM3
Sales inorgánicas							
CaCl ₂	0,2461	-	-	-	-	1,0	1,0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	-	0,08	0,08	0,08	0,08	-	-
Ferric Citrate	0,0126	-	-	0,032	0,032	-	-
Fe(NO ₃) ₃ * H ₂ O	0,005	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ * 7H ₂ O	-	0,02	0,02	-	-	-	-
FeSO ₄	-	-	-	-	-	0,01	0,01
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,7412	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ * 7H ₂ O	-	0,1	0,1	0,1	0,1	1,35	1,35
MgSO ₄	0,4168	-	-	-	-	-	-
KBr	0,0101	-	-	-	-	-	-
KCl	0,1091	-	-	0,004	0,004	2,24	2,24
K ₂ HPO ₄	-	6,3	6,3	6,3	6,3	-	-
NaCl	7,1235	9,0	9,0	9,0	9,0	-	-
NaF	0,0003	-	-	-	-	-	-
NaHCO ₃	0,2401	-	-	-	-	0,35	0,35
NaHPO ₄	-	-	-	0,023	0,023	-	-
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0,014	-	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	0,001	-	-	-	-	0,8769	0,8769
Na ₂ SO ₃	0,2	-	-	-	-	-	-
Sodium Silicate	0,0005	-	-	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	0,0002	-	-	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	0,0028	-	-	-	-	-	-
SrCl ₂	0,0043	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.2: Comparaciones de sales inorgánicas en diferentes medios de cultivo. Las concentraciones están en g/L [26, 33, 34, 36].

4.2.2. Aminoácidos

Los aminoácidos esenciales además de cisteína, arginina, glutamina y tirosina son requeridos para los cultivos celulares, a pesar de que los requerimientos por dichos aminoácidos variarán de célula a célula. Otros aminoácidos no esenciales también son agregados para compensar la inhabilidad de producirlos para algún tipo particular de célula, para reducir el estrés de producirlos o porque quizás se han producido, pero se degradan en el medio. La concentración disponible de aminoácidos generalmente controla la máxima concentración celular alcanzable [37], este balance puede influenciar la viabilidad celular y su velocidad de crecimiento. Generalmente se requiere glutamina para la mayoría de las células a pesar de que existen células que utilicen glutamato. Existe antecedentes que indican que la glutamina es utilizada como fuente de energía y carbono para la célula [37, 39]. Esto se explica dado que la glutamina puede ingresar al ciclo de Krebs por medio de la oxidación de glutamato gracias a glutaminasa. La desaminación de la glutamina produce ion amonio (Ver Figura 4.1), el cual puede inhibir el crecimiento celular [17], esto se podría solucionar utilizando dipéptidos los cuales minimizan la producción de ion amonio y son más estables en el medio [37].

En la Tabla 4.3 se comparan los diferentes aminoácidos y sus concentraciones para cada uno de los diferentes medios.

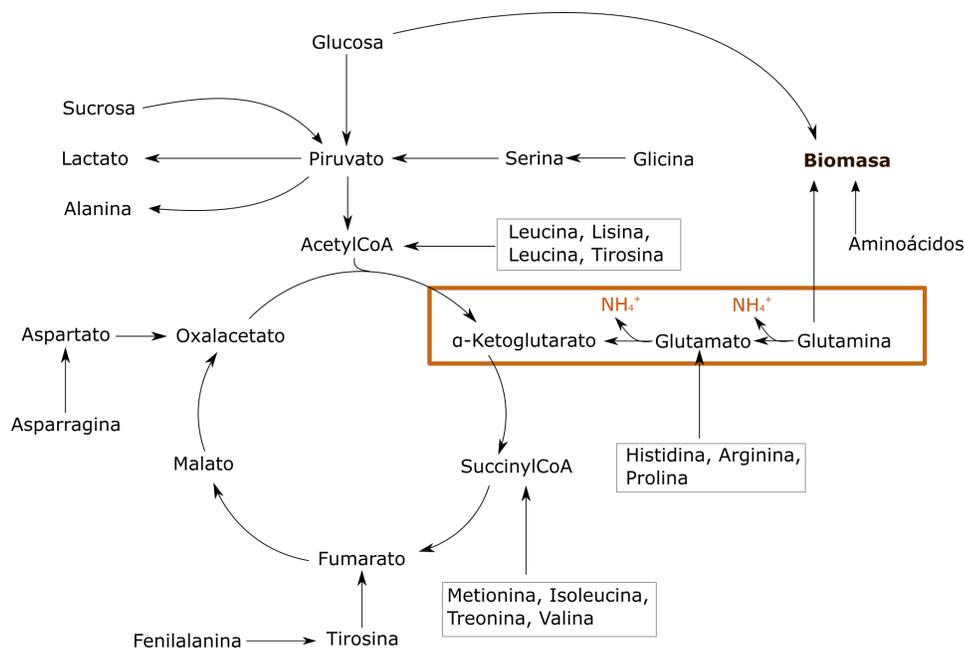


Figura 4.1: Etapa donde el glutamato ingresa al ciclo de Krebs.

	Yáñez 2012	Novel Liquid Medium 2013		WO 2016 /082050		(Cortéz et al, 2017)	
	AUSTRAL-SRS	Yeast - Pep. (8-8 g/L)	Yeast - Pep. (4-8 g/L)	MD1	MD2	BM1	BM3
Amino Acidos							
L-Alanine	0,0009	-	-	-	-	0,225	0,225
L-Arginine	0,0126	-	-	0,645	1,185	0,7	0,7
L-Asparagine	-	-	-	-	-	0,35	0,35
L-Asparagine*H2O	0,0013	-	-	-	-	-	-
L-Aspartic acid	0,0013	-	-	-	-	0,35	0,35
L-Cystine	-	-	-	1,01	0,336	1	1
L-Cystine*2HCl	1,7031	-	-	-	-	-	-
L- Glutamic acid	0,0015	-	-	0,645	1,925	0,6	0,6
L- Glutamine	-	-	-	-	-	0,6	0,6
Glycine	0,0008	-	-	-	-	0,65	0,65
L- Histidine	-	-	-	0,56	0,14	2,5	2,5
L- Isoleucine	0,0052	-	-	0,483	0,121	0,05	0,05
L-Leucine	0,0052	-	-	0,483	0,121	0,075	0,075
L-Lysine	0,0073	-	-	0,541	0,271	0,625	0,625
L- Methionine	0,0015	-	-	0,659	0,165	0,05	0,05
L- Phenylalanine	0,0032	-	-	0,405	0,101	0,15	0,15
L- Proline	0,0012	-	-	-	-	0,35	0,35
L- Serine	0,0011	-	-	-	-	1,1	1,1
L- Threonine	0,0048	-	-	0,657	1,732	0,175	0,175
L- Tryptophan	0,001	-	-	-	-	0,1	0,1
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	0,07202	0,07202
L- Tyrosine*2Na*2H2O	0,0052	-	-	-	-	-	-
L- Valine	0,0046	-	-	0,517	0,129	0,1	0,1

Tabla 4.3: Composición de aminoácidos en cada uno de los medios, las concentraciones se encuentran en g/L [26, 33, 34, 36].

Lo primero que destaca en el medio que obtuvo mejor resultados de biomasa (sombreado en gris), es la gran cantidad de arginina, glutamato y treonina en comparación al resto de los demás medios. Lo segundo destacable es que en el medio MD1 (segundo lugar en los mejores resultados de producción de biomasa) iguala la concentración de glutamato con el resto de los medios, pero supera en 1 magnitud a los otros medios en isoleucina, leucina y metionina, mientras que la fenilalanina, valina y treonina presentan una concentración 4 veces mayor que la de los otros medios.

4.2.3. Vitaminas

La actividad biológica de las vitaminas varía, incluso cuando se encuentran clasificadas como nutrientes comunes. Su rol biológico es diverso, pero comparten los rasgos en común de ser esenciales para la vitalidad de las células y solo se necesitan en mínimas concentraciones en comparación con la glucosa y los aminoácidos. Algunas vitaminas son cofactores involucrados en reacciones bioquímicas requeridas por la célula como biotina, tiamina, riboflavina, etc. Otras son requeridas solo por algunas células diferenciadas como ocurre con la vitamina D, vitamina K, vitamina A y vitamina C [17].

Generalmente los medios de cultivo poseen vitaminas solubles en agua como el grupo B, colina, ácido fólico, inositol y nicotinamida. Otros requerimientos son derivados de suero. Biotina está presente en la mayoría de los medios complejos incluyendo los medios libres de suero. En estos mismo tipos de medio es posible encontrar concentraciones mayores de colina y nicotinamida [37]. Al igual que en el caso de los aminoácidos, el requerimiento de vitaminas ha sido estudiado empíricamente por otros autores [37]. En la Tabla 4.4 se observa una complementariedad entre las vitaminas utilizadas en MD1 y MD2 con las utilizadas en BM1 y BM20. En la práctica no existe alguna diferencia entre tiamina y monofosfato de tiamina, metabólicamente hablando ambas son absorbidas como B1, pero el monofosfato de tiamina es más estable, permaneciendo almacenado más de 6 meses sin degradarse [40].

	Yáñez 2012	Novel Liquid Medium 2013		WO 2016/082050		(Cortéz et al, 2017)	
	AUSTRAL-SRS	Yeast - Pep. (8-8 g/L)	Yeast - Pep. (4-8 g/L)	MD1	MD2	BM1	BM3
Vitamins							
p-Aminobenzoic acid	-	-	-	-	-	0.00002	0.00002
D-Biotin	-	-	-	-	-	0.00002	0.00002
Choline Chloride	0.0001	-	-	0.002	0.002	0.0002	0.0002
Folic Acid	0.0001	-	-	0.002	0.002	0.00002	0.00002
Myo-Inositol	0.0002	-	-	0.004	0.004	0.00002	0.00002
Niacin	-	-	-	-	-	0.00002	0.00002
Niacinamide (Nicotinamide)	0.0001	-	-	0.002	0.002	-	-
D-Pantothenic acid*1/2 Ca	0.0001	-	-	0.002	0.002	0.00002	0.00002
Pyridoxal*HCl	0.0001	-	-	0.002	0.002	-	-
Pyridoxine*HCl	-	-	-	-	-	0.00002	0.00002
Riboflavin	-	-	-	0.0002	0.0002	0.00002	0.00002
Thiamine	-	-	-	-	-	0.00002	0.00002
Thiamine monosphosphate*HCl	0.0001	-	-	0.002	0.002	-	-

Tabla 4.4: Composición de vitaminas en cada uno de los medios, las concentraciones se encuentran en g/L [26, 33, 34, 36].

4.2.4. Azúcares

La glucosa se incluye en casi todos los medios como fuente de energía. Es metabolizada principalmente por glicólisis para formar piruvato, el cual se convertirá en lactato o acetoacetato y entrará al ciclo de Krebs siendo oxidado para formar CO₂ y agua. La acumulación de ácido láctico implicaría un mal funcionamiento del ciclo de Krebs [37].

En la Tabla 4.5 se muestra la composición de azúcares para los diferentes medios. Se observa que los medios BM1 y BM3 contienen altas concentraciones de glucosa, en cambio, la fuente de carbono de MD1 y MD2 podría ser glutamina/glutamato como se observa en la Table 4.3.

	Yáñez 2012	Novel Liquid Medium 2013		WO 2016/082050		(Cortéz et al, 2017)	
	AUSTRAL-SRS	Yeast - Pep. (8-8 g/L)	Yeast - Pep. (4-8 g/L)	MD1	MD2	BM1	BM3
	Sugar						
D(-) Fructose	-	-	-	-	-	-	-
D(+) Glucose	15,6	-	-	-	-	25	25
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.5: Composición de azúcares en cada uno de los medios, las concentraciones se encuentran en g/L [26, 33, 34, 36].

4.2.5. Otros componentes

Existen otro tipo de componentes que se pueden encontrar en un medio de cultivo complejo, tales como los componentes intermedios de ciclo de Krebs, indicadores de pH, además de proteínas, péptidos y lípidos. Generalmente se encuentran en medios libres de suero para ayudar o mantener ciertas células especializadas.

	Yáñez 2012	Novel Liquid Medium 2013		WO 2016/082050		(Cortéz et al, 2017)	
	AUSTRAL-SRS	Yeast - Pep. (8-8 g/L)	Yeast - Pep. (4-8 g/L)	MD1	MD2	BM1	BM3
		Other					
Casein	7.5	-	-	-	-	-	-
Fumaric acid	-	-	-	-	-	0.1	-
α -Ketoglutaric acid	-	-	-	-	-	0.37	-
L(-) Malic acid	-	-	-	-	-	1.34	-
Succinic acid	-	-	-	-	-	0.1	-
Yeast extract	0.3256	8	4	-	-	-	-
Peptone from meat	8.1281	8	8	-	-	-	-
Soy peptone	5	-	-	-	-	-	-
FBS (ml)	100	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.6: Composición de otros componentes en cada uno de los medios, las concentraciones se encuentran en g/L [26, 33, 34, 36].

En la Tabla 4.6 se muestran los otros componentes de cada uno de los medios. Se observa además que el medio BM1, a diferencia del resto, posee intermediarios para el ciclo de Krebs, mientras que los primeros medios solo varían su proporción de extracto de levadura y peptona.

En cuanto a los resultados obtenidos por AUSTRAL-SRS (1,8 OD 600nm) y los resultados obtenidos por Novel Liquid Medium 2013 (2 y 1,7 OD 600nm), son muy similares en concentración de biomasa y composición. Se diferencian principalmente en la presencia y concentración de peptona de soya y que AUSTRAL-SRS pose 1 magnitud menor de extracto de levadura con respecto a Novel Liquid Medium 2013. Aun así, el rendimiento de las diferentes razones entre extracto de levadura y peptona no son comparables, porque AUSTRAL-SRS utiliza FBS al 10% el cual puede variar dependiendo del origen y su composición no es definida [37, 41, 42].

Capítulo 5

Resultados y discusiones

A continuación se presentan los diferentes resultados para cada uno de los medios con sus respectivas discusiones. Esto incluye caracterización de la curva de crecimiento, perfiles de consumo/producción de fuentes de carbono y aminoácidos, razón estequiométrica previa al análisis de flujo metabólico (MFA), resultados del MFA y la composición propuesta para el medio.

5.1. Curva de crecimiento de cada medio

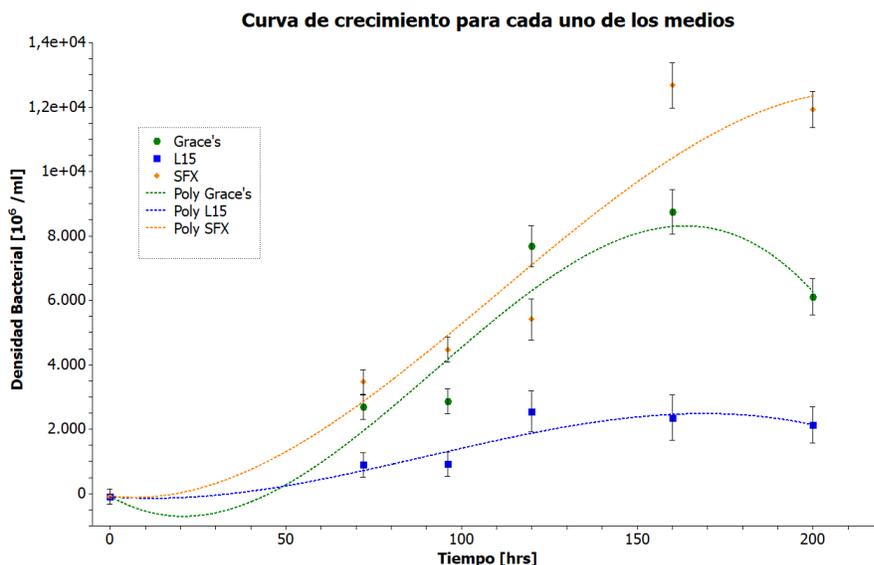


Figura 5.1: Curva de crecimiento para cada uno de los medios utilizados.

Al comparar las 3 curvas de crecimiento de los medios de cultivo en la Figura 5.1 se destaca que en el medio SFX se obtiene una densidad celular mayor respecto a los otros medios, siendo 1,4 y 4,9 veces mayor que en los medios Grace's y L15 respectivamente. A continuación se

analizará la concentración inicial de los diferentes medios de cultivo y se discutirá las posibles causas de estas diferencias.

5.2. Concentración inicial de los medios de cultivo

A partir de las mediciones realizadas con el equipo HPLC e Y15 se obtiene la concentración en mM de aminoácidos y azúcares iniciales para el medio de cultivo SFX para así poder compararla con la composición ya conocida de los medios Grace's y L15.

		Grace's [mM]	L15 [mM]	SFX [mM]
Azúcares	Glc	3,89	0,06	42,67
	Suc	78,01	0,06	2,94
Aminoácidos	Glu	4,08	0,00	1,82
	Asp	2,63	0,00	1,75
	Ser	10,47	1,90	1,12
	Gln	4,11	2,05	2,15
	Gly	8,66	2,66	0,81
	His	16,11	1,61	0,67
	Thr	1,47	2,52	0,72
	Arg	4,02	2,87	0,93
	Asn	2,65	1,89	2,68
	Ala	2,53	2,58	1,18
	Pro	3,04	0,00	1,31
	Cys	0,18	0,99	0,38
	Tyr	0,28	1,66	0,56
	Val	0,85	0,85	0,81
	Met	0,34	0,54	0,93
	Lys	4,28	0,62	0,84
	Ile	0,38	0,99	0,83
	Leu	0,57	0,99	0,55
	Phe	0,91	0,79	0,94
Trp	0,49	0,10	-	

Figura 5.2: Tabla comparativa de concentraciones iniciales de aminoácidos para los diferentes medios de cultivo. El medio Grace's y L15 son de composición conocida. La composición inicial de SFX se obtiene a partir de los resultados de HPLC e Y15 y las concentraciones de los medios anteriores. **Nota:****El dato de concentración de Triptófano no fue posible de obtener con el HPLC.

De los resultados en la Figura 5.2 se destaca la elevada concentración de glucosa en el medio SFX, siendo 10 veces mayor que el medio Grace's y 700 veces mayor que el medio L15. Por otro lado, la concentración de sacarosa resulta ser mayor en el medio Grace's alcanzando a ser 1300 veces mayor que la concentración detectada en L15 y 26 veces mayor que la concentración en SFX. Ambos metabolitos son importantes de observar porque se pueden considerar como futuras fuentes de carbono para *P. salmonis*, considerando que Grace's y SFX obtiene mejores resultados en densidad celular máxima alcanzada con respecto al L15.

Hasta el momento las bajas concentraciones de glucosa y sacarosa en L15 sugieren que *P. salmonis* puede estar usando otra fuente de carbono como podría ser glutamina. Si se comparan las concentraciones de glutamina en los 3 medios, se destaca que Grace's posee el doble de concentración que los otros dos, siendo nuevamente L15 el candidato con concentraciones más bajas, pero presentando valores en el mismo orden de magnitud que los otros medios.

En cuanto a los aminoácidos presentes en el medio Grace's las concentraciones varían entre 0,18 - 16,1 [mM], llegando a su valor más alto con histidina (precursor de glutamato) y serina (precursor de piruvato). Para el medio L15 sus concentraciones van de 0 - 2,87 [mM] alcanzando su valor más alto en alanina, con la ausencia de glutamato, aspartato y prolina, todos ellos aminoácidos candidatos para entrar al ciclo del TCA. Por otro lado, las concentraciones del medio SFX van desde 0,38 - 2,68 [mM] alcanzando su valor más alto en asparragina que es un precursor del aspartato para el ingreso al ciclo TCA.

Por lo tanto, entre los medios de cultivo, el medio con menores concentraciones y menor cantidad de aminoácidos presentes en la etapa inicial es L15.

A partir de este momento la discusión se realizará para cada uno de los medios por separado para poder analizar en detalle cada una de sus características.

5.3. Medio Grace's

5.3.1. Caracterización de curva de crecimiento en Medio Grace's

Una vez obtenida las curvas de crecimiento es importante identificar ciertos indicadores que permitan realizar un análisis más profundo con el fin de comparar detalladamente las curvas de crecimiento y sus medios de cultivos respectivos. Para ello es necesario obtener valores como la máxima densidad alcanzada, la razón de crecimiento específica, el tiempo de duplicación y la razón estequiométrica entre lactato y glucosa, entre otros.

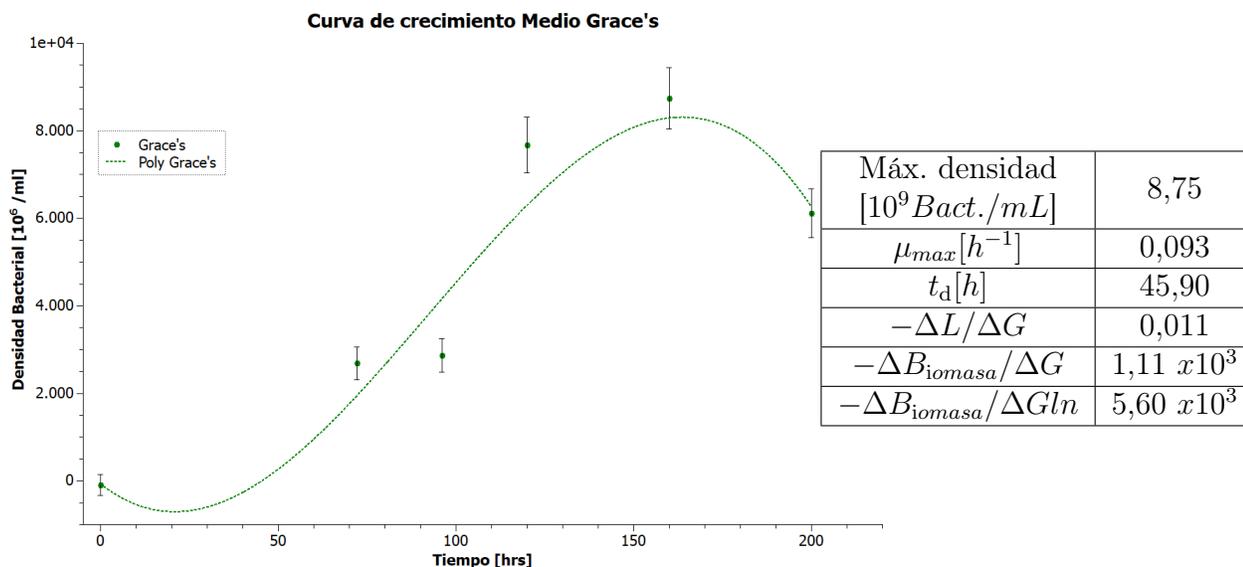


Figura 5.3: Curva de crecimiento y parámetros asociados al medio Grace's.

La curva de crecimiento de la Figura 5.3 muestra que al rededor de las 160 horas se alcanza una densidad máxima de 8,75 [$10^9 \text{ Bact.}/\text{mL}$], se identifica la etapa de crecimiento exponencial entre las 90 y 140 hrs con un μ_{max} de 0,093 [h^{-1}] y un tiempo de duplicación de 45,90 [h]. Se identifica que la razón estequiométrica $\Delta L/\Delta G$ es cercana a 0, esto indicaría que el medio favorece en mayor medida el paso de glucosa a través del ciclo TCA que para la producción de lactato. Otro indicador relevante sería la cantidad de biomasa producida por cantidad de glucosa o glutamina consumida; al mirar los valores obtenidos se infiere que existe una mayor producción de biomasa por cantidad de glucosa consumida en comparación al glutamato, siendo 5 veces mayor el consumo de glucosa para este mismo fin, en otras palabras, se utiliza 5 veces más glucosa que glutamato para la producción de biomasa, esto se ve reflejado en la Figura 5.5, donde se puede apreciar el agotamiento de glucosa que da paso al consumo de glutamina.

Por otro lado, los estados metabólicos corresponden a datos experimentales en la zona de crecimiento exponencial a tasa constante, zona en la cual el supuesto de estado estacionario en que se basa el análisis por MFA sería aplicable. Es por esta razón que identificar la etapa de crecimiento exponencial es clave para identificar dichos datos. Para el medio Grace's se definen los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs, los que se muestran a continuación en la Figura 5.4.

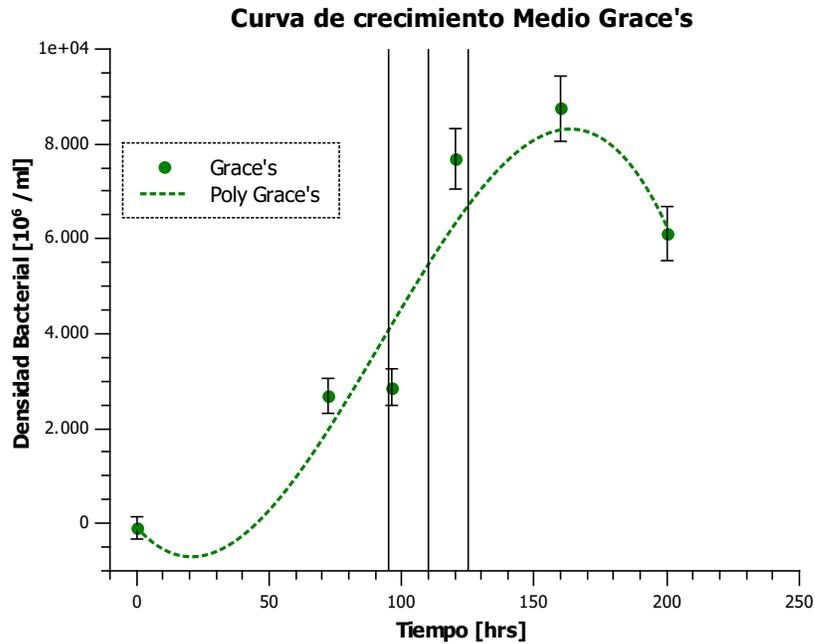


Figura 5.4: Zonas de estados metabólicos en curva de crecimiento Grace's.

5.3.2. Curvas cinéticas

Para explicar la elección de los estados metabólicos se debe observar la curva de crecimiento en la Figura 5.4 y el perfil de concentración de glucosa en la Figura 5.5. Se observa que en las primeras 70 horas ocurre una disminución drástica en la concentración de glucosa alcanzando su agotamiento en este periodo, mientras en paralelo comienza a disminuir considerablemente la glutamina. Por otra parte, la etapa exponencial del cultivo ($\mu > 0$) comienza al rededor de las 95 hrs, es por ello que el primer punto de estado metabólico se ubica en este punto crítico, donde la glucosa está agotada y se comienza a consumir glutamina. En el segundo estado metabólico existe producción de glucosa, quizás en un intento de aumentar su concentración para posterior consumo y se presencia un cambio en la pendiente de consumo de glutamina. Finalmente el último estado metabólico escogido es cuando se comienza a consumir la glucosa previamente sintetizada y al mismo tiempo existe una producción de glutamina.

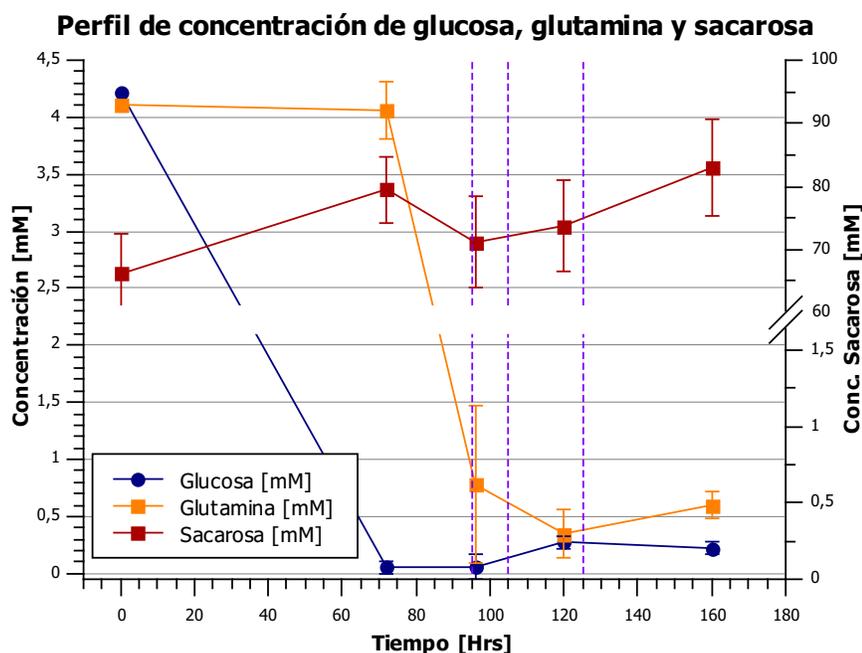


Figura 5.5: Perfil de concentración de glucosa, glutamina y sacarosa para medio Grace's. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs.

Durante todo este periodo se observa una concentración relativamente constante de sacarosa, por lo que se descarta bajo esas condiciones su utilización como fuente de carbono. Se sabe que algunos microorganismos utilizan azúcares complejos para evitar el estrés osmótico o altas concentraciones de sal [43], dejando a la sacarosa como última prioridad como fuente de carbono.

En cuanto a la producción de amonio y lactato graficadas en la Figura 5.6), pareciera ser constante en los diferentes estados metabólicos, se destacan las bajas contracciones producidas en lactato, no aumentando a lo largo de la curva de crecimiento, lo cual puede indicar la preferencia del metabolismo de *P. salmonis* por entrar al TCA en comparación a otros microorganismos y explica los bajos valores de $\Delta L/\Delta G$ obtenidos para este medio.

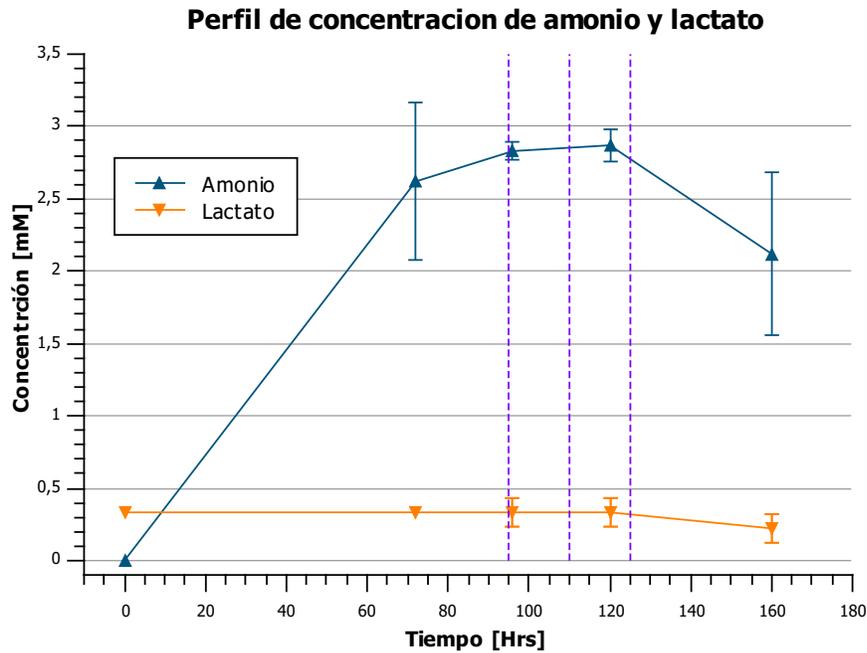


Figura 5.6: Perfil de concentración de amonio y lactato. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs.

En cuanto a los perfiles de aminoácidos esenciales en las Figuras 5.7 y 5.8 se puede observar que existe producción de arginina, valina y treonina previo al primer estado metabólico, situación que se revierte una vez pasado este punto. La misma situación ocurre con los aminoácidos no esenciales en las Figuras 5.9 y 5.10 con histidina, glicina, glutamato, asparragina y prolina.

Glicina es un precursor de serina, la cual entrará al TCA como piruvato. Histidina, arginina y prolina son precursores de glutamato, mientras que la asparragina es precursora de aspartato para entrar al TCA como oxalacetato. En otras palabras, pareciera que mientras se consume y se agota la glucosa, *P. salmonis* se prepara para consumir glutamina y glutamato como fuentes de carbono ya que se observa el consumo de ambos nutrientes incluso llegando al agotamiento de la glutamina. En cuanto a los otros aminoácidos que se agotan o llegan a concentraciones cercanas a cero, se identifican leucina, cisteína, tirosina y metionina, todos precursores de succinil-Coa.

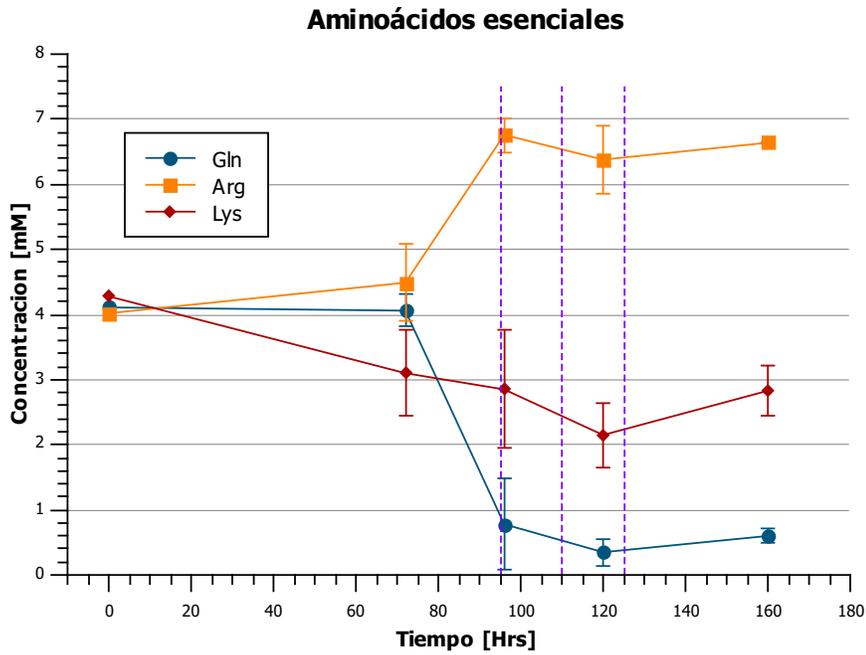


Figura 5.7: Perfil de aminoácidos esenciales glutamina, arginina y lisina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs.

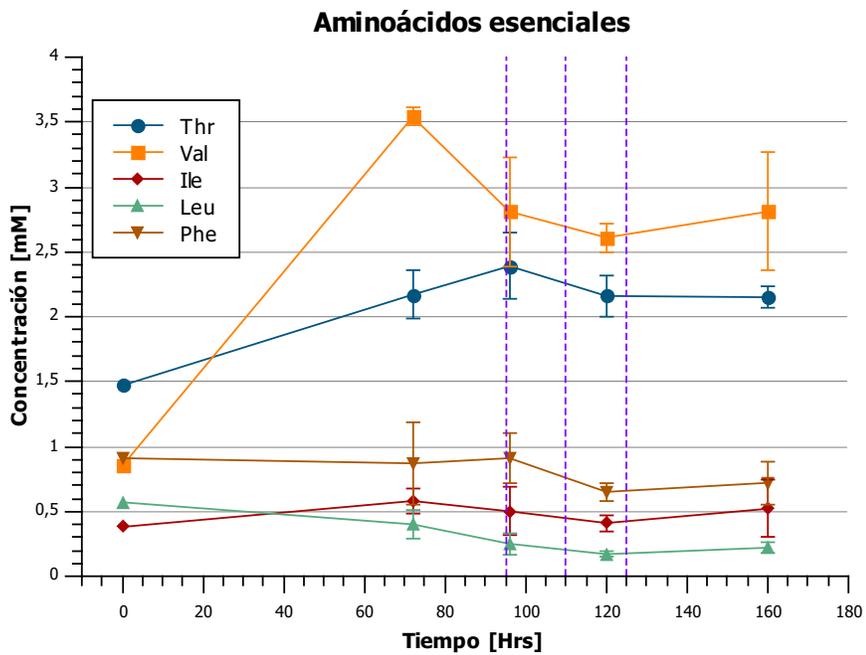


Figura 5.8: Perfil de aminoácidos esenciales treonina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs.

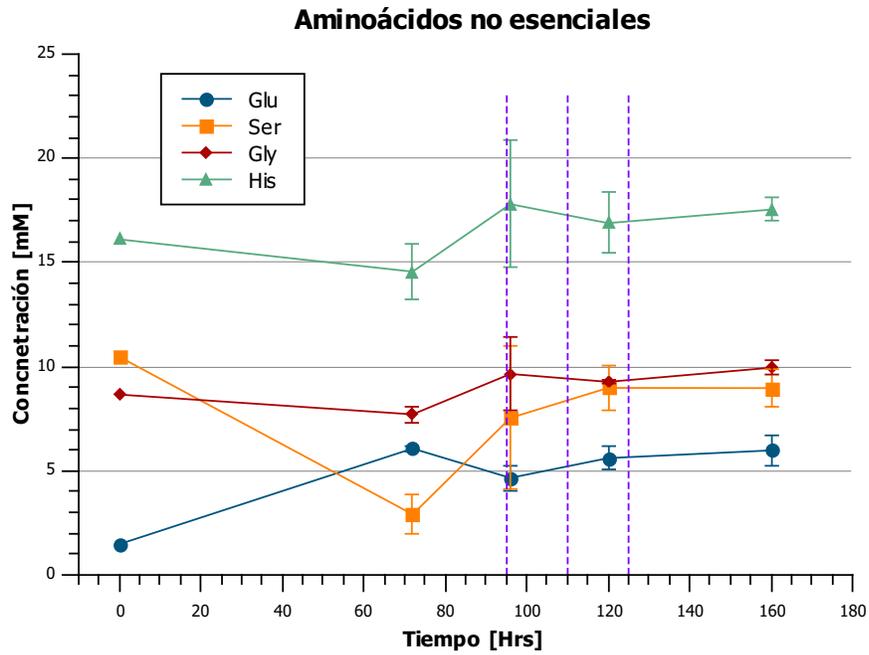


Figura 5.9: Perfil de aminoácidos no esenciales glutamato, serina, glicina e histidina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs.

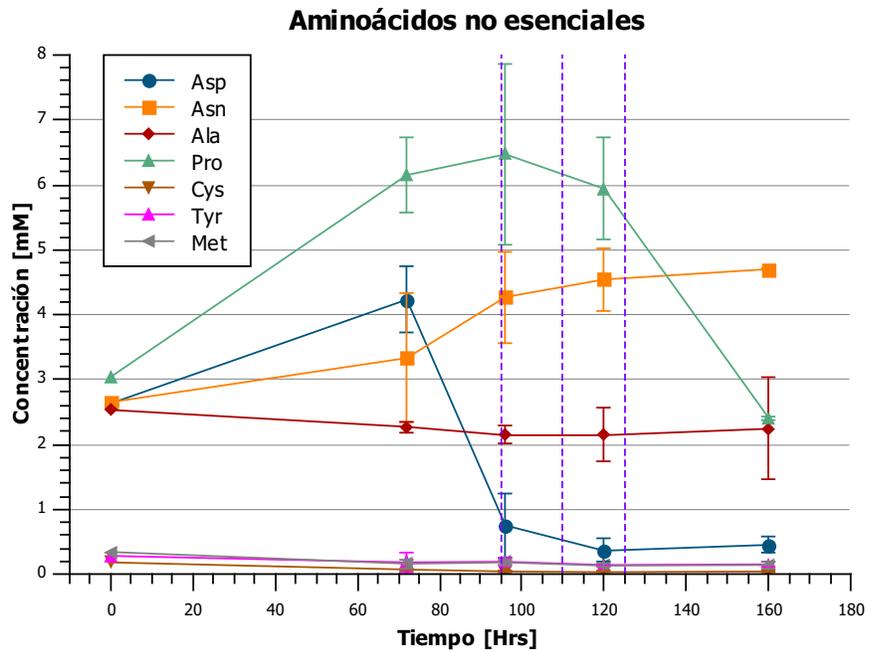


Figura 5.10: Perfil de aminoácidos no esenciales aspartato, asparragina, alanina, prolina, cisteína, tirosina y metionina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 95, 110 y 125 hrs.

5.3.3. Razón estequiométrica según datos medidos

A partir de la determinación de los perfiles de aminoácidos se calcularon las tasas específicas de producción/consumo de cada uno de ellos por mol de glutamina (aminoácido de referencia). Dado que la Glutamina se consume a lo largo de todo el crecimiento celular, las razones que sean positivas (con respecto a la glutamina) indican consumo del aminoácido. Como se muestra en la Tabla 5.1, los aminoácidos consumidos cuya razón de consumo es mayor a la composición en el medio son: aspartato, valina y prolina. Por otro lado, la razón de glutamina/glucosa en el medio es de 1,06 y su razón de consumo es 2,44. Es decir, en el medio existen 1,06 mol de glutamina por cada mol de glucosa, pero se consumen 2,44 moles de glutamina por cada mol de glucosa consumido, lo que indica que existe una deficiencia de glutamina por lo que al igual que los aminoácidos mencionados anteriormente, deberán ser adicionados al medio de cultivo.

Razón estequiométrica de Glucosa			
	En el medio	Razón de consumo	R cuadrado
Glutamina	1,06	2,44	0,97
Sacarosa	20,06	-0,34	0,91
Razón estequiométrica de Glutamina			
	En el medio	Razón de consumo	R cuadrado
Alanina	0,62	-0,09	0,91
Arginina	0,98	-0,63	0,99
Asparragina	0,65	-0,50	1,00
Aspartato	0,64	0,91	0,92
Glutamato	0,99	-0,42	0,94
Glicine	2,11	-0,53	0,85
Histidina	3,92	-0,62	0,88
Isoleucina	0,09	0,03	0,91
Leucina	0,14	0,07	0,88
Lisina	1,04	0,15	0,91
Metionina	0,08	0,02	0,97
Fenilalanina	0,22	0,07	0,95
Serina	2,55	-3,16	0,95
Treonina	0,36	0,17	0,84
Tirosina	0,07	0,02	0,98
Valina	0,21	0,63	0,91
Prolina	0,74	1,42	0,97
Cisteina	0,04	0,01	0,95

Tabla 5.1: Razón estequiométrica, según datos obtenidos. La primera parte de la tabla muestra la razón presente en el medio y la razón de consumo entre glutamina y sacarosa, con respecto a glucosa. La segunda mitad de la tabla muestra la razón presente en el medio y la razón de consumo entre los demás aminoácidos con respecto a glutamina. La razón de consumo se calcula como la pendiente entre la curva acumulada del nutriente de interés y el nutriente de referencia.

El R^2 indica qué tan cercano es la aproximación de la pendiente realizada con respecto a los puntos tratados, es por ello que entre más alto sea el valor, más aproximada será la razón que se estudia. Entre los aminoácidos tratados el valor más bajo de R^2 es alcanzado por treonina, con un 0,84, lo que no interfiere con los aminoácidos que se deben agregar en el medio.

5.3.4. Composición propuesta basada en medio Grace's utilizando datos obtenidos

De esta forma se puede obtener la primera formulación para el medio Grace's, previo al momento de hacer el análisis de flujo metabólico. La formulación completa se hizo considerando un 50 % de la fracción de modificación deseada, es decir, al calcular la nueva proporción glutamina/glucosa que debería tener el medio solo se consideró la mitad de esta. Este criterio se utiliza para realizar las próximas iteraciones sin tener que sobre-suplementar el medio y realizar un excesivo gasto de recursos.

En resumen, según los datos medidos, se debe adicionar glucosa, aspartato, glutamina, prolina y valina, ya que, a grandes rasgos, parecieran ser nutrientes primordiales que se agotan a lo largo del tiempo. La composición propuesta se muestra a continuación en la Tabla 5.2.

		Composición [mmol]	Agregar [mmol]	Composición propuesta [mmol]
Azúcares	Glc	3,89	6,28	10,17
	Suc	78,01	-	78,01
Aminoácidos	Glu	4,08	-	4,08
	Asp	2,63	1,41	4,04
	Ser	10,47	-	10,47
	Gln	4,11	2,54	6,65
	Gly	8,66	-	8,66
	His	16,11	-	16,11
	Thr	1,47	-	1,47
	Arg	4,02	-	4,02
	Asn	2,65	-	2,65
	Ala	2,53	-	2,53
	Pro	3,04	3,03	6,07
	Cys	0,18	-	0,18
	Tyr	0,28	-	0,28
	Val	0,85	6,68	7,54
	Met	0,34	-	0,34
	Lys	4,28	-	4,28
	Ile	0,38	-	0,38
Leu	0,57	-	0,57	
Phe	0,91	-	0,91	

Tabla 5.2: Composición propuesta para el medio Grace's según datos obtenidos, se especifica cuantos mmol agregar por litro de preparación.

En primer lugar, se puede observar que cuando la barra es positiva indica que la reacción ocurre hacia el lado correspondiente de la reacción, esto significa que la reacción Glucosa \rightarrow Biomasa ocurre en esa dirección y que a medida que aumenta el tiempo de cultivo, más rápida será la transformación de glucosa a biomasa. Por otro lado, la reacción Glucosa \rightarrow Piruvato ocurre hacia el otro sentido, esto indica que a lo largo del cultivo, la utilización de glucosa sería en mayor medida para producir mayor cantidad de biomasa, en vez de entrar al TCA.

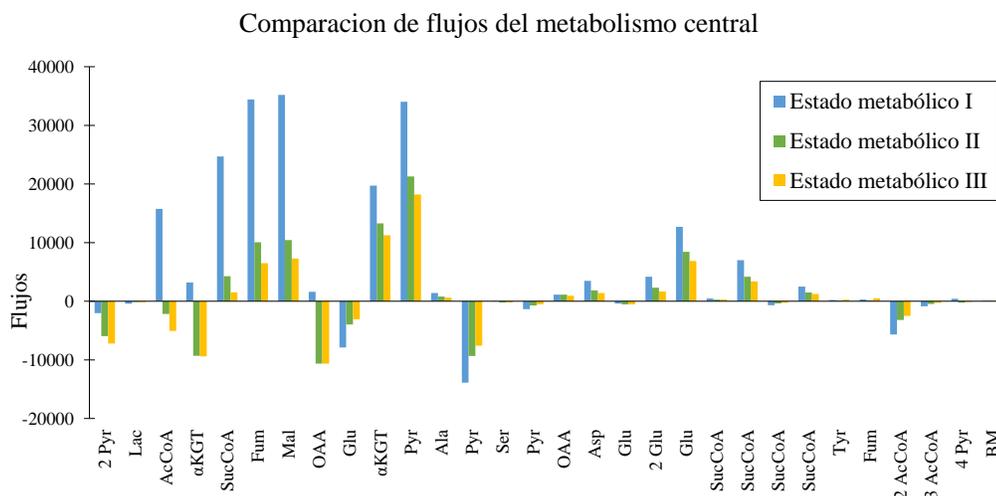


Figura 5.12: Comparación de flujos del metabolismo central comparando los tres estados metabólicos a las 95, 110 y 125 hrs.

Si se observan los gráficos glu-akg, aa-glu, gln-glu y gln-bm, ubicados cerca del nodo glutamina \leftarrow glutamato, se puede observar que parte del glutamato se obtiene de aminoácidos como histidina, arginina y prolina, el cual termina entrando al ciclo TCA, pero por otro lado, también se transforma en glutamina y parte de esta glutamina terminará aportando en la creación de biomasa (nuevamente entre mayor sea el tiempo de cultivo mayores serán las velocidades). Pero, al comparar en la figura 5.12 se puede observar que el valor absoluto de glutamina es la mitad que el valor de αKGT , por lo tanto, si bien el glutamato puede terminar siendo precursor de glutamina y alfa-ketoglutarato, se preferirá esta última para la prevalencia metabólica de *P. salmonis*. Si se observan los flujos que son negativos dentro de la mismo ciclo TCA es posible encontrar este tipo de flujos según las redes metabólicas descritas para *P. salmonis* [44–46], en cuanto a reacciones fuera del TCA como gln-glu, glc-pyr y suc-pyr también se encuentran registradas como reversibles para *P. salmonis*, por otro lado pyr-acc, pyr-lac, ser-pyr se encuentran descritas como reversibles para otros MO, pero no se ha encontrado registros para *P. salmonis* [44–46], estos resultados se podrían discutir dado que la fórmula elemental utilizada en la matriz de reacciones no corresponde exactamente a *P. salmonis* así como la ecuación para la formación de biomasa presentada en la Tabla 2.3.

Otro análisis interesante es que en el primer estado metabólico el piruvato generado, ya sea a partir de glucosa, sacarosa o serina, logra entrar al TCA, a diferencia de los otros estados

metabólicos donde el flujo cambia de sentido.

Dentro del mismo TCA se puede observar que entre mayor sea el tiempo de cultivo, se da más prioridad a la mantención metabólica, es por ello que en esta etapa ocurre el agotamiento de nutrientes.

5.3.6. Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA

En la Tabla 5.3 se puede observar la razón entre las velocidades obtenidas con los datos y las velocidades estimadas con el MFA, con ello se puede observar qué tan alejadas se encuentran las aproximaciones realizadas. Se destaca que las velocidades más críticas son tirosina y sacarosa donde la magnitud estimada es 7 u 8 veces menor que la calculada con los datos. Esto se puede deber a que dentro de la matriz de reacciones eran menos sensibles a los cambios, pudiendo generar un intervalo de holgura mayor al momento de estimar los datos, permitiendo acomodarlos para llegar aun balance de carbono y nitrógeno que cierre en un 100 %.

Razón de velocidad de consumo medidas y velocidad estimada con MFA			
	Estado metabólico I	Estado metabólico II	Estado metabólico III
GLC	1,34	1,06	1,06
ALA	0,83	0,86	0,88
CYS	0,64	0,70	0,73
SER	0,98	0,99	0,99
GLY	-2,30	0,60	0,62
LYS	0,91	0,93	0,94
LEU	1,12	1,12	1,53
GLN	0,92	0,93	0,93
HIS	-1,77	0,08	0,17
PRO	1,00	1,00	0,99
ARG	1,40	1,33	1,44
GLU	1,00	1,00	0,99
ASN	1,21	1,18	1,21
ASP	0,95	0,93	1,00
ILE	0,78	0,80	0,55
MET	0,81	0,85	1,00
THR	1,05	1,04	1,00
VAL	1,00	1,00	0,98
TYR	-3,31	-7,52	-0,73
PHE	-1,14	-0,78	-0,24
LAC	0,17	-0,44	-0,57
CO2	1,00	1,00	1,01
NH3	0,94	0,95	0,94
BIOMASS	0,62	0,83	0,96
SUCROSE	-2,31	3,71	8,19

Tabla 5.3: Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA. Las velocidades para metabolitos intermedios como PYR, AcCoA, aKG, OAA, MAL y FUM son iguales a cero indicando pseudo estado estacionario.

5.3.7. Composición propuesta basado en el medio Grace's utilizando MFA

Finalmente, de igual forma que en la tabla 5.2, se obtiene una nueva formulación para el medio Grace's, donde se deberá agregar glucosa, glutamina, cisteína y metionina.

		Composición [mmol]	Agregar [mmol]	Composición propuesta [mmol]
Azúcares	Glc	3,89	3,03	6,92
	Suc	78,01	-	78,01
Aminoácidos	Glu	4,08	-	4,08
	Asp	2,63	-	2,63
	Ser	10,47	-	10,47
	Gln	4,11	5,27	9,37
	Gly	8,66	-	8,66
	His	16,11	-	16,11
	Thr	1,47	-	1,47
	Arg	4,02	-	4,02
	Asn	2,65	-	2,65
	Ala	2,53	-	2,53
	Pro	3,04	-	3,04
	Cys	0,18	4,74	4,92
	Tyr	0,28	-	0,28
	Val	0,85	-	0,85
	Met	0,34	0,30	0,63
	Lys	4,28	-	4,28
	Ile	0,38	-	0,38
	Leu	0,57	-	0,57
Phe	0,91	-	0,91	

Tabla 5.4: Composición propuesta según MFA, se especifica cuantos mmol agregar por litro de preparación

5.4. Medio L15

5.4.1. Caracterización de curva de crecimiento en Medio L15

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento es importante identificar ciertos indicadores que permitan realizar un análisis más profundo con el fin de comparar detalladamente las curvas de crecimiento y sus medios de cultivos respectivos. Para ello es necesario obtener valores como la máxima densidad alcanzada, la razón de crecimiento específica, el tiempo de duplicación y la razón estequiométrica entre lactato y glucosa, entre otros.

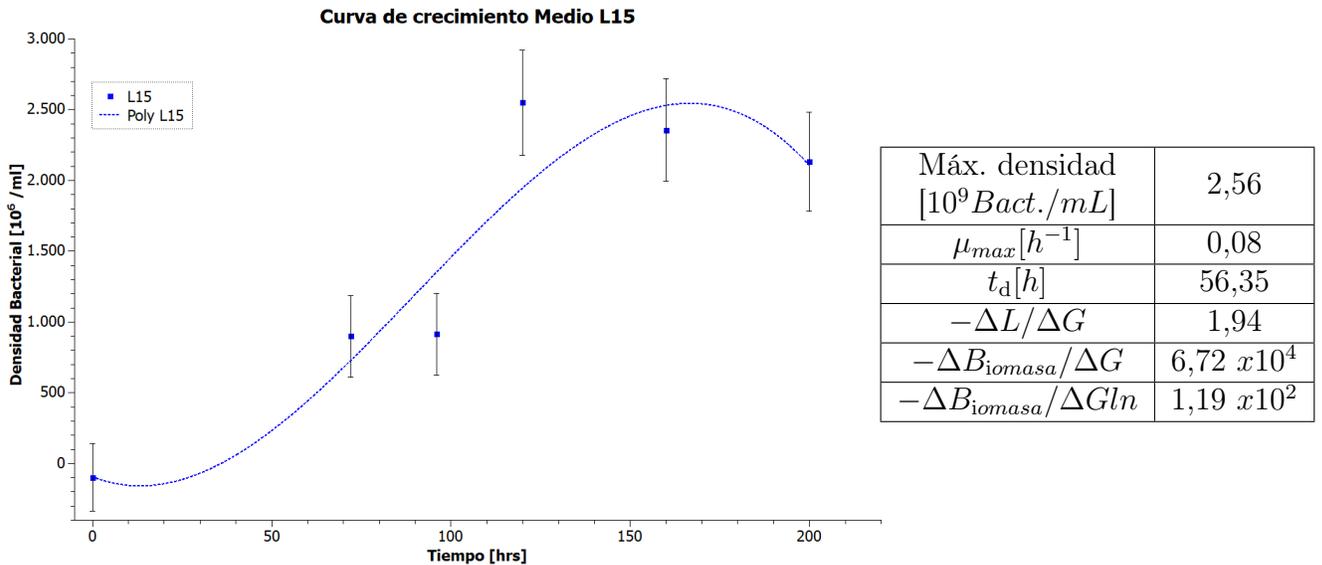


Figura 5.13: Curva de Crecimiento y parámetros asociados al medio L15.

En la curva de crecimiento de la la Figura 5.13 se muestra que al rededor de las 150 hrs se alcanza una densidad máxima de $2,56 [10^9 \text{ Bact.}/\text{mL}]$ y se identifica la etapa de crecimiento exponencial entre las 90 y las 150 hrs con un μ_{max} de $0,08 [h^{-1}]$ y un tiempo de duplicación de $56,35 [h]$. Se identifica que la razón estequiométrica $\Delta L/\Delta G$ es cercana a 2, lo cual indica que este medio favorece la fermentación láctica, es decir, por cada glucosa que ingresa al medio, se estaría produciendo al rededor de 2 lactatos. Otro indicador relevante sería la cantidad de biomasa producida por la cantidad de glucosa o glutamina consumida; al mirar los valores obtenidos se infiere que existe una mayor producción de biomasa por cantidad de glutamina consumida siendo 2 órdenes de magnitud mayor el consumo de glutamina, en otras palabras se utiliza 2 órdenes de magnitud más glutamina que glucosa para la producción de biomasa, esto tiene sentido y se ve reflejado en la Figura 5.15, donde se puede apreciar el consumo de glutamina mientras la concentración de glucosa se mantiene constante. También se podría explicar por las bajas concentraciones de glucosa que difieren en un orden de magnitud con las concentraciones de glutamina.

Por otro lado, los estados metabólicos corresponden a datos experimentales en la zona de crecimiento exponencial a tasa constante, zona en la cual el supuesto de estado estacionario en que se basa el análisis por MFA sería aplicable. Es por esta razón que identificar la etapa

de crecimiento exponencial es clave para identificar dichos datos. Para el medio L15 se definen los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs. Los que se muestran a continuación en la Figura 5.14.

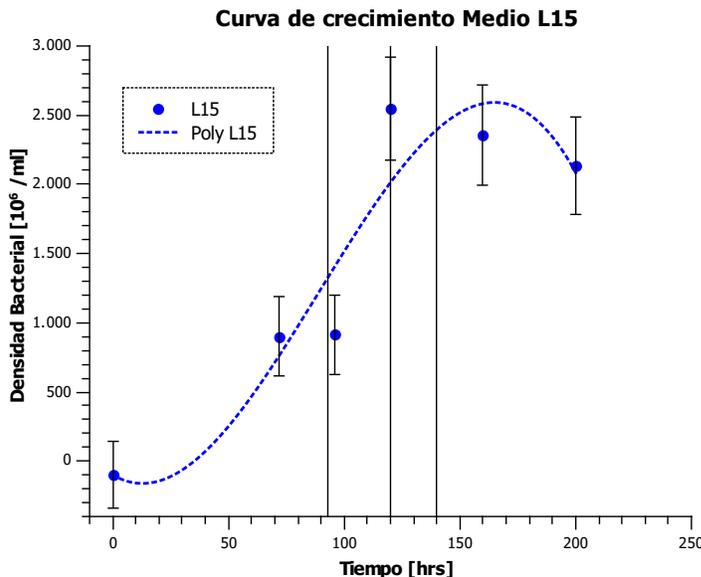


Figura 5.14: Zonas de estados metabólicos en curva de crecimiento L15.

5.4.2. Curvas cinéticas

Para explicar la elección de los estados metabólicos (que hasta ahora parecieran ser elegidos de manera arbitraria) se debe observar la curva de crecimiento en la Figura 5.14 y el perfil de concentración de glutamina en la Figura 5.15. Se observa que en las primeras 70 horas ocurre una acumulación de glutamina, mientras que la glucosa y sacarosa se encuentran constantes en este periodo. En la etapa exponencial del cultivo ($\mu > 0$) comienza al rededor de las 90 hrs y es en este punto donde se observa consumo de glutamina, es por ello que el primer estado metabólico se encuentra en las 93 hrs (asegurando que el punto se encuentra en etapa exponencial). El segundo estado metabólico se encuentra en el cambio de pendiente del consumo de glutamina, previo al punto de inflexión, ubicado a las 120 hrs. Finalmente el último estado metabólico se encuentra en las 140 hrs, donde se observa un cambio en la pendiente de consumo de glutamina, volviendo a producirse. Durante todo el crecimiento celular no se observa una perturbación en la concentración de glucosa y sacarosa, es por esta razón que los estados metabólicos fueron escogidos en función de las pendientes del perfil de glutamina.

En cuanto a la producción de amonio y lactato en la Figura 5.16, se puede observar una acumulación del primero y un nivel constante del segundo, las cuales se mantienen sin mayores cambios en los periodos de interés, pudiendo nuevamente indicar la preferencia del metabolismo de la utilización del TCA como fuente de energía, explicando así los bajos valores de $\Delta L/\Delta G$.

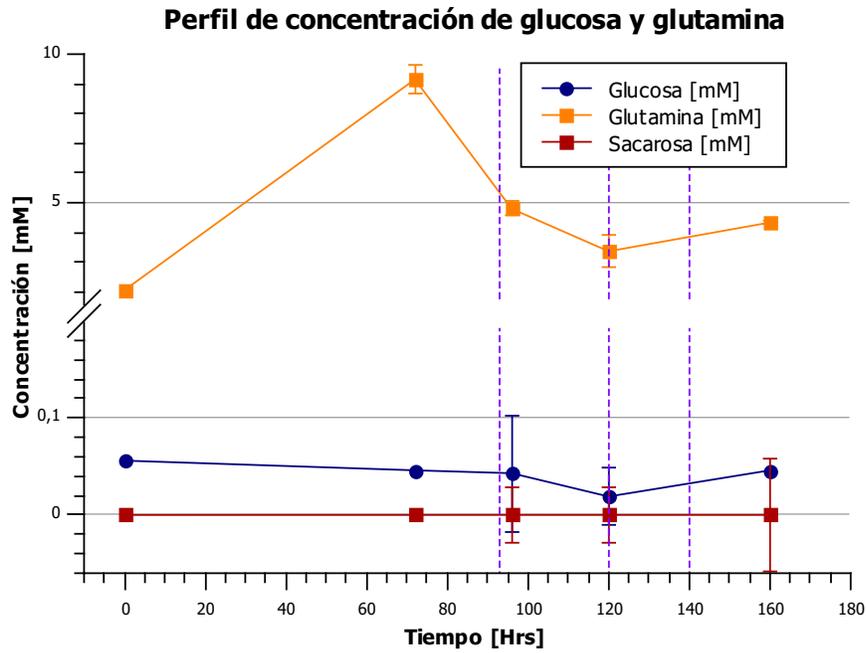


Figura 5.15: Perfil de concentración de glucosa, glutamina y sacarosa para medio L15. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs.

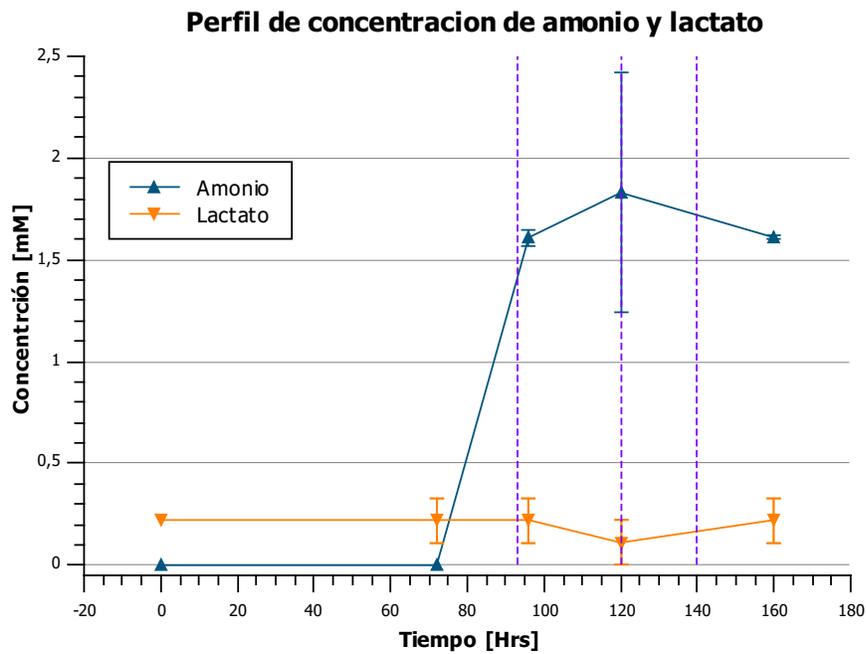


Figura 5.16: Perfil de concentración de amonio y lactato. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs.

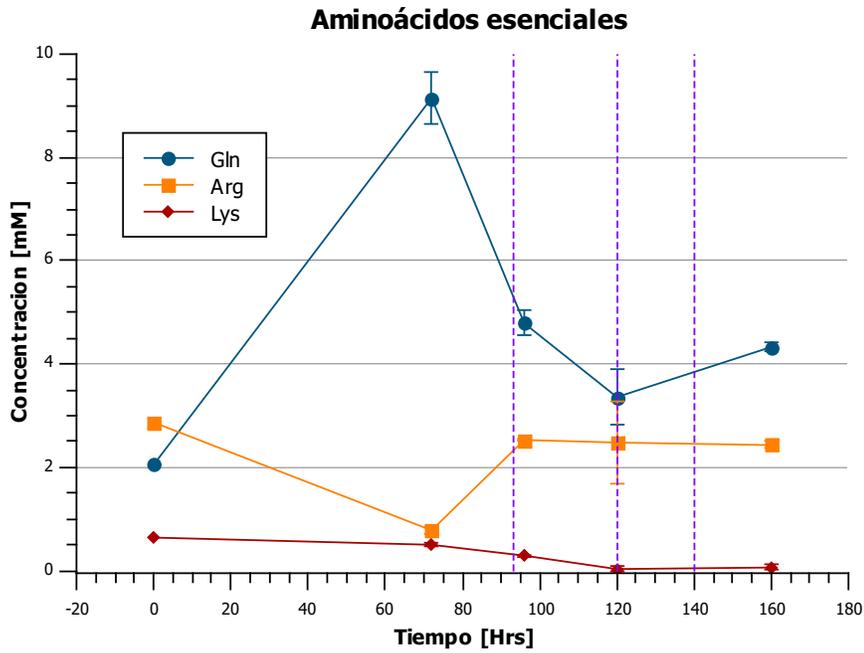


Figura 5.17: Perfil de aminoácidos esenciales glutamina, arginina y lisina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs.

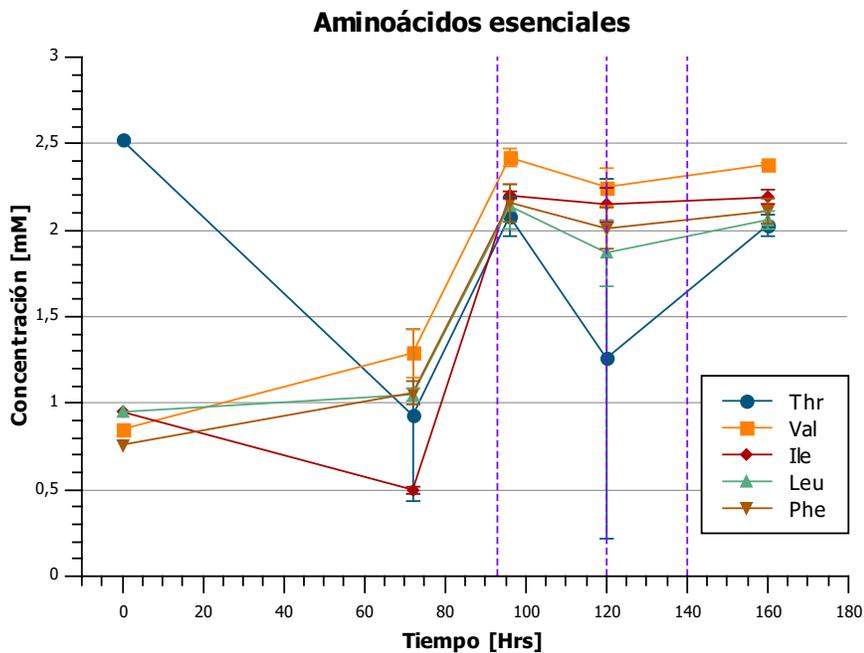


Figura 5.18: Perfil de aminoácidos esenciales treonina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs.

Lo que corresponder a los aminoácidos esenciales, se puede observar una acumulación de glutamina en la Figura 5.17 y de valina, isoleucina, leucina y fenilalanina en la Figura 5.18. Una vez pasadas las 93 horas, comienzan a consumirse en diferentes pendientes. Para el caso de arginina pareciera haber un incremento de concentración la cual se mantiene constante pasadas las 93 hrs de cultivo, por otro lado, lisina pareciera ser el primer aminoácido en agotarse. Continuando con los aminoácidos no esenciales en las Figuras 5.19 y 5.20 se puede observar una situación similar a la descrita anteriormente donde se acumula glutamato, aspartato y metionina previo al primer estado metabólico, mientras que, en cuanto a glicina, serina, histidina, alanina y tirosina, se observa un consumo abrupto en las primeras horas de cultivo seguidos por una acumulación previa a las 93 hrs donde pareciera existir un cambio en el estado metabólico ya que luego de este punto, las concentraciones de cada uno de los aminoácidos mencionados se mantienen relativamente constantes. Se destaca el caso de asparragina y cisteina donde existe un consumo constante a lo largo del cultivo siendo junto con lisina candidatos a nutrientes limitantes.

Los aminoácidos que se agotan o llegan a concentraciones menores a 1 [mM] a lo largo del cultivo son, lisina, glutamato, aspartato, asparragina, cisteina. Lisina es precursor de acetil-Coa en el inicio del ciclo TCA. De igual forma la cisteina es precursora de piruvato que terminará entrando al TCA como acetil-Coa. Aspartato y asparragina por otro lado se incorporan como Oxalacetato y glutamato como alfa-ketoglutarato (αKGT).

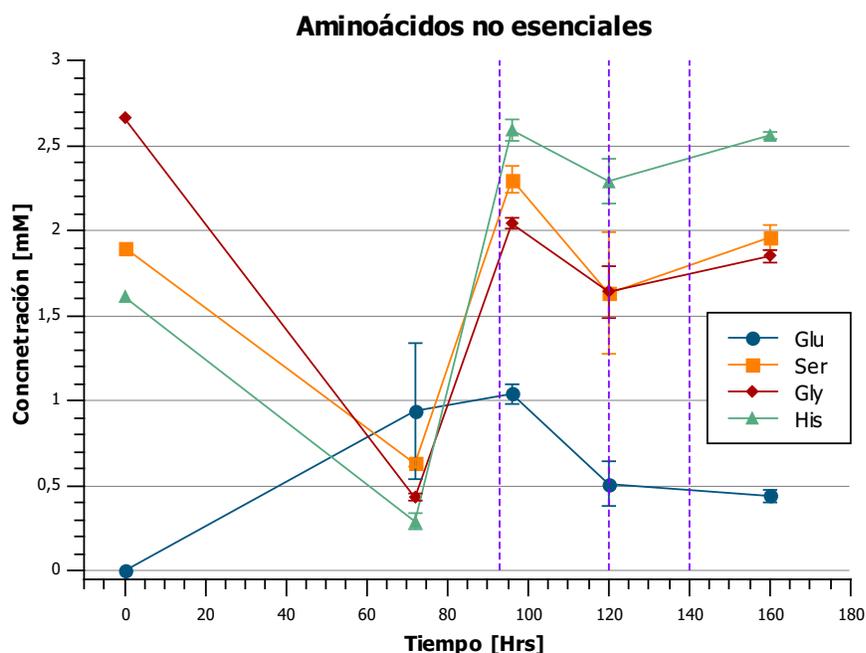


Figura 5.19: Perfil de aminoácidos no esenciales glutamato, serina, glicina e histidina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs.

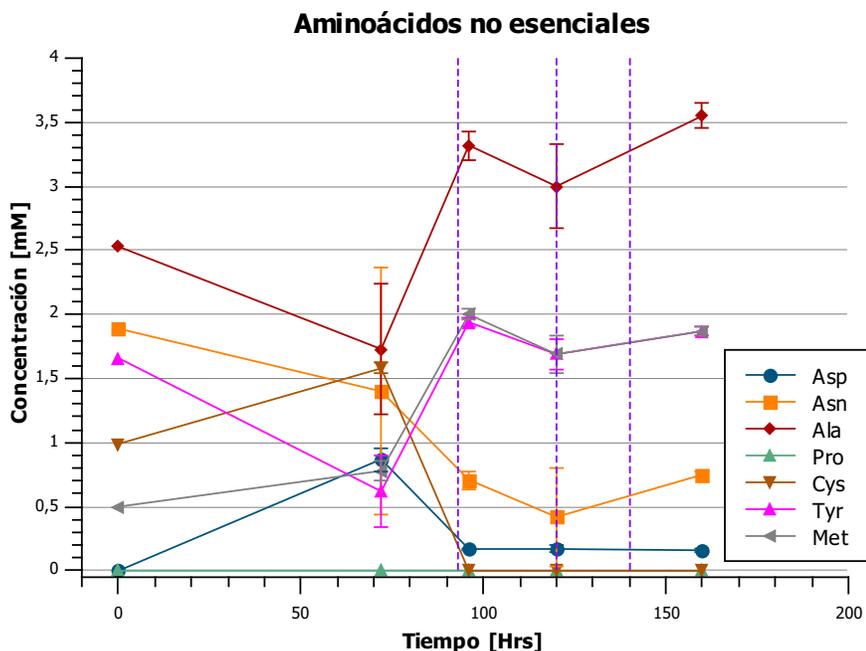


Figura 5.20: Perfil de aminoácidos no esenciales aspartato, asparragina, alanina, prolina, cisteína, tirosina y metionina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 93, 120 y 140 hrs.

5.4.3. Radios estequiométricos según datos medidos

Calculadas las curvas acumuladas para cada uno de los aminoácidos se puede calcular cuál es la razón de consumo de cada uno de ellos por mol de glutamina (aminoácido de referencia). Dado que Glutamina se consume a lo largo de los puntos de interés del crecimiento celular, las razones que sean positivas (con respecto a la glutamina) indican consumo de los otros aminoácidos. En la Tabla 5.5 se observa que los aminoácidos consumidos cuya razón de consumo es mayor a su razón en el medio son: aspartato y glutamato. Por otro lado la razón glutamina/glucosa en el medio es de 36,95 y su razón de consumo es de 43,87. Esto se debe a la baja concentración de glucosa en el medio y significa que por cada mol de glucosa presente en el medio hay 37 moles de glutamina, y que por cada mol consumido de glucosa existen otros 44 moles de glutamina que son consumidos. Para la sacarosa hay 1,05 moles de sacarosa por cada mol de glucosa presente, de los cuales se consumen solo 0,41 mol de sacarosa por cada mol de glucosa consumido. En otras palabras, existe una deficiencia de glutamato y aspartato, la cual se debe corregir. Debido a que el cultivo se hace a bajas concentraciones de glucosa en la primera fase de crecimiento (fase lag), pudo haber ocurrido una adaptación de *P. salmonis* permitiendo que pudiera crecer bajo estas condiciones, a diferencia de lo que se observa en el medio Grace's donde el microorganismo agotó la glucosa. Es por eso que se considerará aumentar la cantidad de glucosa en el medio aún cuando no se evidencia que se agota en los perfiles de consumo.

Razón estequiométrica de Glucosa			
	En el medio	Razón de consumo	R cuadrado
Glutamina	36,95	43,87	0,83
Sacarosa	1,05	0,41	0,97
Razón estequiométrica de Glutamina			
	En el medio	Razón de consumo	R cuadrado
Alanina	1,23	-0,25	0,82
Arginina	1,40	-0,30	0,94
Asparragina	0,92	0,16	0,97
Aspartato	0,00	0,12	0,94
Glutamato	0,00	0,20	0,89
Glicine	1,30	-0,28	0,86
Histidina	0,78	-0,40	0,88
Isoleucina	0,46	-0,32	0,93
Leucina	0,46	-0,17	0,81
Lisina	0,31	0,08	0,86
Metionina	0,24	-0,19	0,80
Fenialalanina	0,37	-0,19	0,87
Serina	0,93	-0,46	1,00
Treonina	1,23	-0,57	1,00
Tirosina	0,81	-0,22	0,84
Valina	0,42	-0,19	0,87
Prolina	0,00	-	-
Cisteina	0,48	0,30	0,95

Tabla 5.5: Razón estequiométrica, según datos obtenidos. La primera parte de la tabla muestra la razón presente en el medio y la razón de consumo entre glutamina y sacarosa, con respecto a glucosa. La segunda mitad de la tabla muestra la razón presente en el medio y la razón de consumo entre los demás aminoácidos con respecto a glutamina. La razón de consumo se calcula como la pendiente entre las curva acumulada del nutriente de interés y el nutriente de referencia.

El R^2 indica qué tan cercana es la aproximación de la pendiente realizada con respecto a los puntos tratados, es por ello que entre más alto sea el valor más aproximada será la razón que se estudia. Entre los aminoácidos tratados el valor más bajo de R^2 es alcanzado por leucina y metionina con un al rededor de 0.80 lo que no interfiere con los aminoácidos que se agotan.

5.4.4. Composición propuesta basada en medio L15 utilizando datos obtenidos

De esta forma se puede obtener la primera formulación para el medio L15, previo al momento de hacer el análisis de flujo metabólico. La formulación completa se hizo considerando un 50% de la fracción de modificación deseada, es decir, al calcular la nueva proporción glutamina/glucosa que debe tener el medio solo se consideró la mitad de esta. Este criterio se utiliza para realizar las próximas iteraciones sin tener que sobre-suplementar el medio y

realizar un excesivo gasto de recursos.

En resumen, según los datos medidos, se debe adicionar glucosa, aspartato y glutamina, ya que, a grandes rasgos, parecieran ser nutrientes primordiales que se agotan a lo largo del tiempo. La composición propuesta se muestra a continuación en la Tabla 5.6.

		Composición [mmol]	Agregar [mmol]	Composición propuesta [mmol]
Azúcares	Glc	0,06	21,98	22,03
	Suc	0,06	-	0,06
Aminoácidos	Glu	0,00	0,41	0,41
	Asp	0,00	0,25	0,25
	Ser	1,90	-	1,90
	Gln	2,05	0,01	2,06
	Gly	2,66	-	2,66
	His	1,61	-	1,61
	Thr	2,52	-	2,52
	Arg	2,87	-	2,87
	Asn	1,89	-	1,89
	Ala	2,58	-	2,58
	Pro	0,00	-	0,00
	Cys	0,99	-	0,99
	Tyr	1,66	-	1,66
	Val	0,85	-	0,85
	Met	0,54	-	0,54
	Lys	0,62	-	0,62
	Ile	0,99	-	0,99
	Leu	0,99	-	0,99
Phe	0,79	-	0,79	

Tabla 5.6: Composición propuesta para el medio L15 según datos obtenidos, se especifica cuantos mmol agregar por litro de preparación.

5.4.5. Flujos metabólicos en el metabolismo central

Los resultados previos corresponden a una composición propuesta previa a la realización del MFA, donde se obtiene las razones estequiométricas de consumo para los aminoácidos según los puntos medidos, estos valores se podrán utilizar como base para identificar qué tal cercana o lejanas son los resultados obtenidos por MFA, cumpliendo una función de validación. A continuación se mostrarán los resultados obtenidos para el MFA en la Figura 5.21. Donde cada barra de color verde, azul y amarillo se representan los flujos metabólicos para las 93, 120 y 140 hrs del crecimiento celular respectivamente.

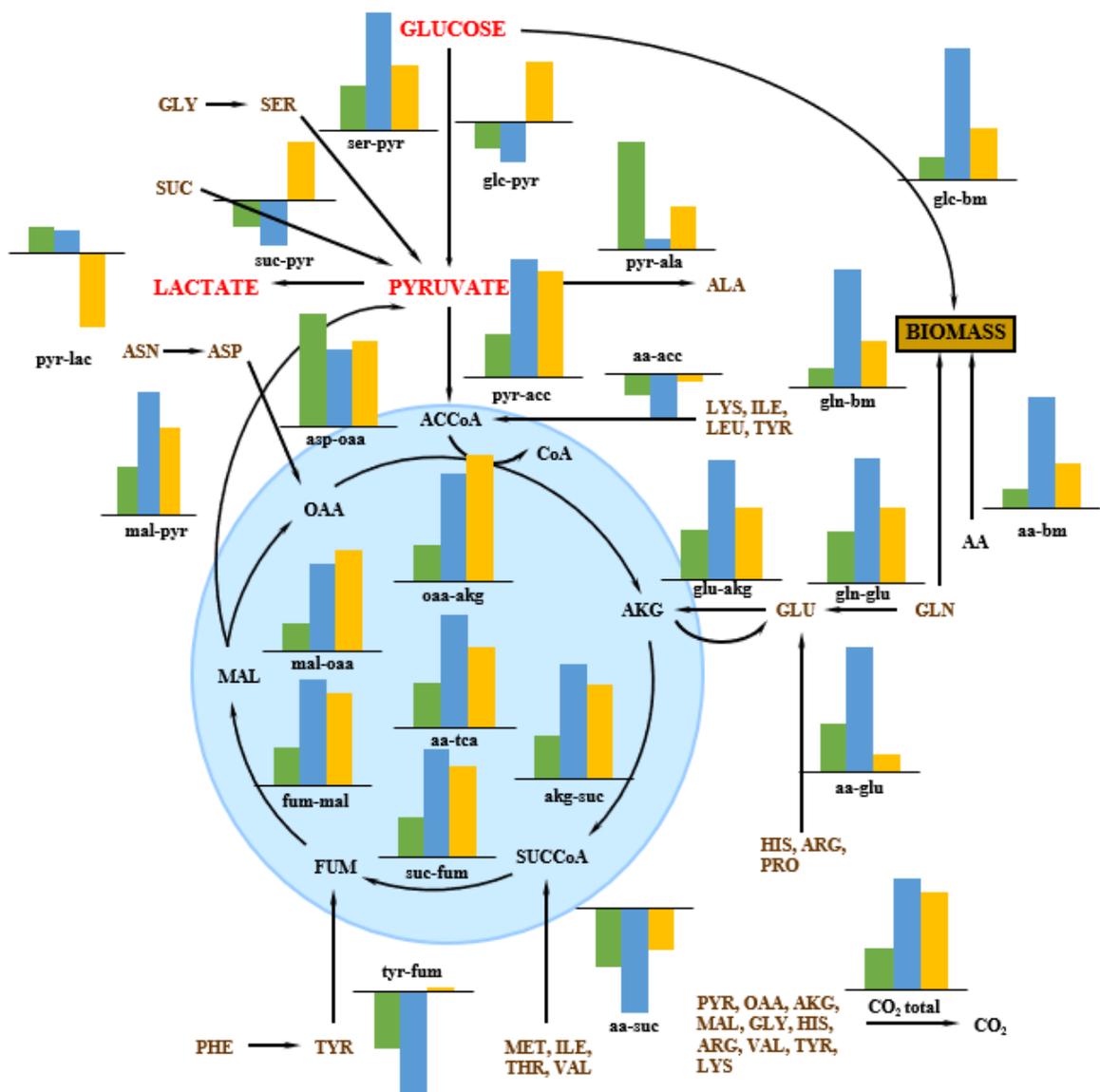


Figura 5.21: Representación gráfica de los flujos en el metabolismo central donde se pueden comparar los diferentes estados metabólicos expuestos en 93, 120 y 140 hrs.

En primer lugar, se puede observar que cuando la barra es positiva indica que la reacción

ocurre hacia el lado correspondiente de la reacción, esto significa que la reacción Glucosa \rightarrow Biomasa ocurre en esa dirección y que a medida que aumenta el tiempo de cultivo llegará un momento donde esa reacción es mas rápida y luego comienzo a disminuir. Por otro lado, la reacción Glucosa \rightarrow Piruvato ocurre hacia el otro sentido, esto indica que a lo largo del cultivo, la utilización de glucosa sería en mayor medida para producir mayor cantidad de biomasa, en vez de entrar al TCA.

La entrada al TCA ocurre por aminoácidos como asparragina/aspartato, piruvato y a través de glutamina/glutamato hacia alfa-ketoglutarato. Se observa además que ocurre una entrada a partir de piruvato, el cual a su vez produce lactato en las primeras 2 etapas metabólicas y alanina. Este piruvato lejos de estar producido por glucosa (debido a las bajas concentraciones de glucosa en este medio) se estaría formando por glicina y serina, aminoácidos que fueron reportados anteriormente con un consumo abrupto en las primeras etapas del estado metabólico ocurriendo un cambio en el estado metabólico final. Dentro de los flujos negativos se encuentran tyr-fum, aa-suc y aa-acc ,los cuales no se encuentran descritos como reversibles para *P. salmonis* pero si para otros MO [44–46], esto resultados se podrían explicar dado que la fórmula elemental utilizada en la matriz de reacciones no corresponde exactamente a *P. salmonis* así como la ecuación para la formación de biomasa presentada en la Tabla 2.3

5.4.6. Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA

En la Tabla 5.7 se puede observar la razón entre las velocidades obtenidas con los datos y las velocidades estimadas con el MFA, con ello se puede observar qué tan alejadas se encuentran las aproximaciones realizadas. Se destaca que las velocidades más críticas son alanina ,lisina y tirosina, todas para el estado metabólico II, aun así, no alcanza a ser una diferencia mayor a un orden de magnitud. Esto se puede deber a que dentro de la matriz de reacciones eran menos sensibles a los cambios, pudiendo generar un intervalo de holgura mayor al momento de estimar los datos, permitiendo acomodarlos para llegar a un balance de carbono y nitrógeno que cierre en un 100 %. Esto podría explicar por qué el flujo de alanina observado en la Figura 5.21 para el estado metabólico II es tan diferente al I y III.

Razón de velocidad de consumo medidas y velocidad estimada con MFA

	Estado metabólico I	Estado metabólico II	Estado metabólico III
GLC	0,02	-0,13	0,10
ALA	0,83	-9,07	0,21
CYS	1,10	1,78	1,21
SER	1,25	1,34	1,19
GLY	1,01	1,07	1,11
LYS	1,39	9,53	1,74
LEU	0,80	0,74	1,26
GLN	1,00	1,01	1,01
HIS	0,94	-1,39	-0,03
PRO	0,00	0,00	0,00
ARG	0,92	1,36	3,08
GLU	0,87	0,86	1,07
ASN	1,01	1,22	1,36
ASP	0,77	0,76	1,01
ILE	0,80	0,68	1,32
MET	0,91	0,85	1,00
THR	1,11	1,14	1,00
VAL	0,89	0,84	1,07
TYR	-0,76	6,59	0,46
PHE	0,76	0,73	1,59
LAC	0,09	-0,81	0,31
CO2	1,00	1,00	1,00
NH3	1,00	1,00	0,99
BIOMASS	0,01	0,30	0,93
SUCROSE	0,00	-0,01	0,01

Tabla 5.7: Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA. Las velocidades para metabolitos intermedios como PYR, AcCoA, aKG, OAA, MAL y FUM son iguales a cero indicando pseudo estado estacionario.

5.4.7. Composición propuesta basada en el medio L15 utilizando MFA

Finalmente, de igual forma que en la tabla 5.6, se obtiene una nueva formulación para el medio L15, donde se deberá agregar glucosa, sacarosa, glutamato y glutamina.

		Composición [mmol]	Agregar [mmol]	Composición propuesta [mmol]
Azúcares	Glc	0,06	9,22	9,28
	Suc	0,06	3,98	4,03
Aminoácidos	Glu	0,00	1,00	1,00
	Asp	0,00	-	0,00
	Ser	1,90	-	1,90
	Gln	2,05	0,58	2,64
	Gly	2,66	-	2,66
	His	1,61	-	1,61
	Thr	2,52	-	2,52
	Arg	2,87	-	2,87
	Asn	1,89	-	1,89
	Ala	2,58	-	2,58
	Pro	0,00	-	0,00
	Cys	0,99	-	0,99
	Tyr	1,66	-	1,66
	Val	0,85	-	0,85
	Met	0,54	-	0,54
	Lys	0,62	-	0,62
	Ile	0,99	-	0,99
	Leu	0,99	-	0,99
Phe	0,79	-	0,79	

Tabla 5.8: Composición propuesta según MFA, se especifica cuantos mmol agregar por litro de preparación

5.5. Medio SFX

5.5.1. Caracterización de curva de crecimiento en Medio SFX

Al igual que los medios anteriores, una vez obtenida las curvas de crecimiento es importante identificar ciertos indicadores que permitan realizar un análisis más profundo con el fin de comparar detalladamente las curvas de crecimiento y sus medios de cultivos respectivos. Para ello es necesario obtener valores como la máxima densidad alcanzada, la razón de crecimiento específica, el tiempo de duplicación y la razón estequiométrica entre lactato y glucosa.

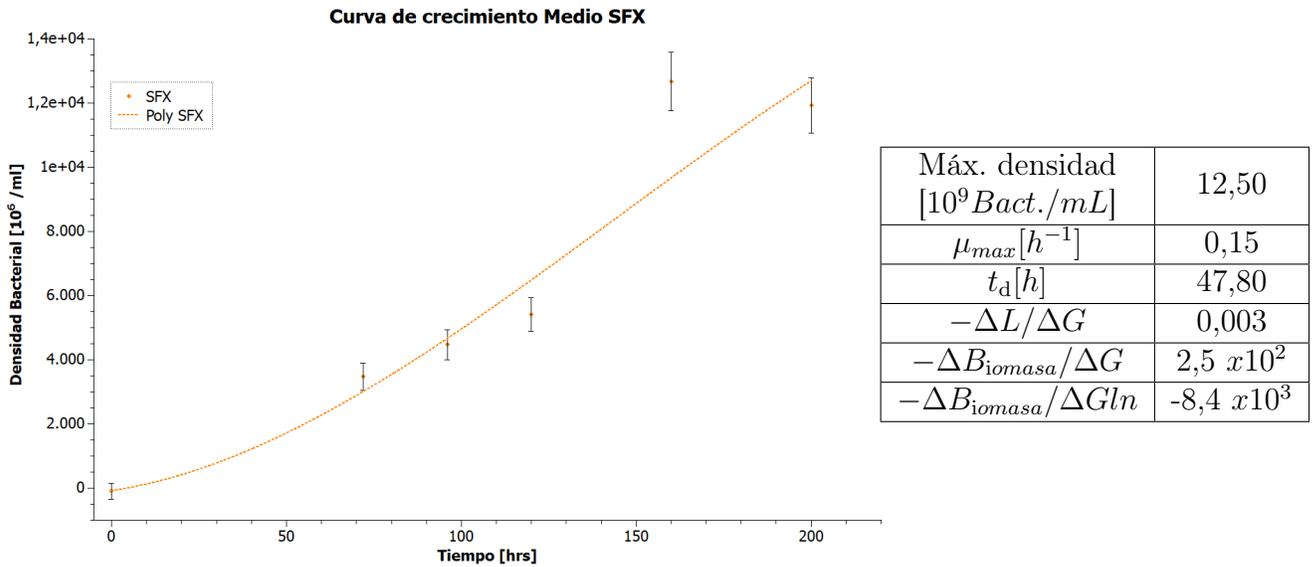


Figura 5.22: Curva de Crecimiento y parámetros asociados al medio SFX.

En la curva de crecimiento de la Figura 5.22 no es posible identificar a simple vista el comienzo o término de la fase exponencial, para ello es mejor comparar los valores de μ , siendo estos positivos a partir de las 94 hrs, llegando a su valor máximo de $0,15 [h^{-1}]$ al rededor de las 140 hrs. La densidad máxima alcanzada por este medio es de $12,50 [10^9 \text{ Bact./mL}]$, alcanzado a las 160 hrs de cultivo, siendo 1,4 y 4,9 veces mayor que en los medios Grace's y L15 respectivamente. Posee un tiempo de duplicaciones de $47,80 [h]$ y una razón estequiométrica $\Delta L/\Delta G$ cercana a 0, indicando que el medio favorece en mayor medida el paso de glucosa a través del ciclo TCA. Otro indicador relevante sería la cantidad de biomasa producida por la cantidad de glucosa o glutamina consumida; al mirar los valores obtenidos se infiere que existe una mayor producción de biomasa por cantidad de glucosa, es más, al ser el valor $-\Delta B/\Delta G \ln$ es negativo, lo que indica que existe producción de este nutriente en vez de un consumo. Esto también se ve reflejado en la Figura 5.24, donde se aprecia un consumo sostenido de glucosa y una producción sostenida de glutamina.

Por otro lado, los estados metabólicos corresponden a datos experimentales en la zona de crecimiento exponencial a tasa constante, zona en la cual el supuesto de estado estacionario en que se basa el análisis por MFA sería aplicable. Es por esta razón que identificar la etapa de crecimiento exponencial es clave para identificar dichos datos. Para el medio SFX se definen

los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs, los que se muestran a continuación en la Figura 5.23.

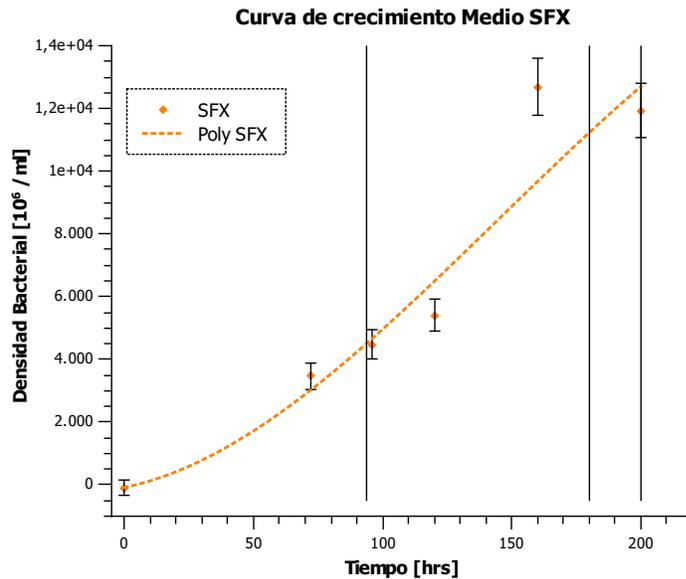


Figura 5.23: Zonas de estados metabólicos en curva de crecimiento SFX.

5.5.2. Curvas cinéticas

La elección de los estados metabólicos fue hecha dado que los datos de la curva de crecimiento no muestran claramente una zona de decaimiento, más bien pareciera una zona exponencial prolongada por lo que se intenta averiguar qué ocurre en dicho intervalo de tiempo. Si se observa el perfil de glucosa, glutamina y sacarosa en la Figura 5.24 se puede observar un consumo constante de glucosa, sin alcanzar el agotamiento de esta. Por otro lado se ve un aumento progresivo en la producción de glutamina y una concentración constante para sacarosa.

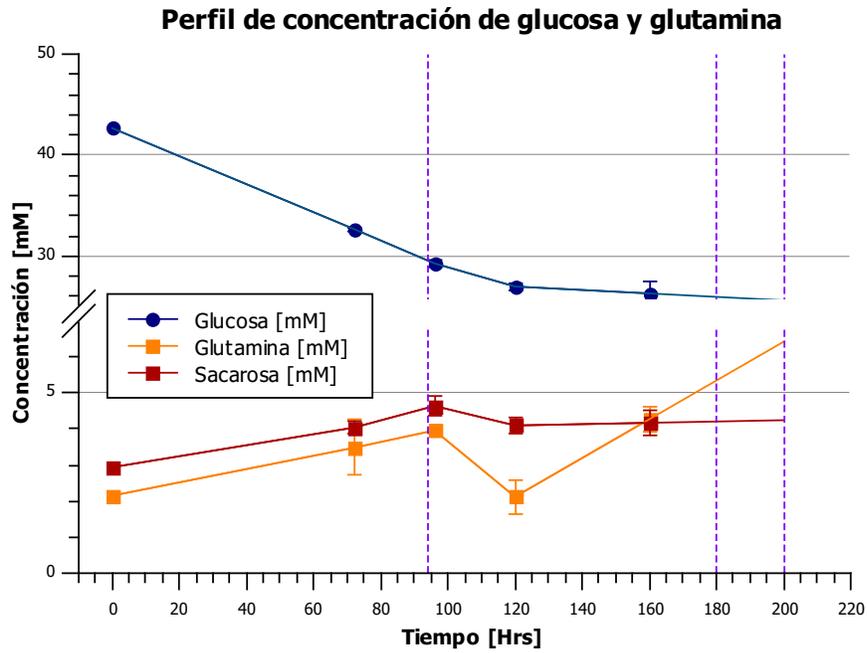


Figura 5.24: Perfil de concentración de glucosa, glutamina y sacarosa para medio SFX. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs.

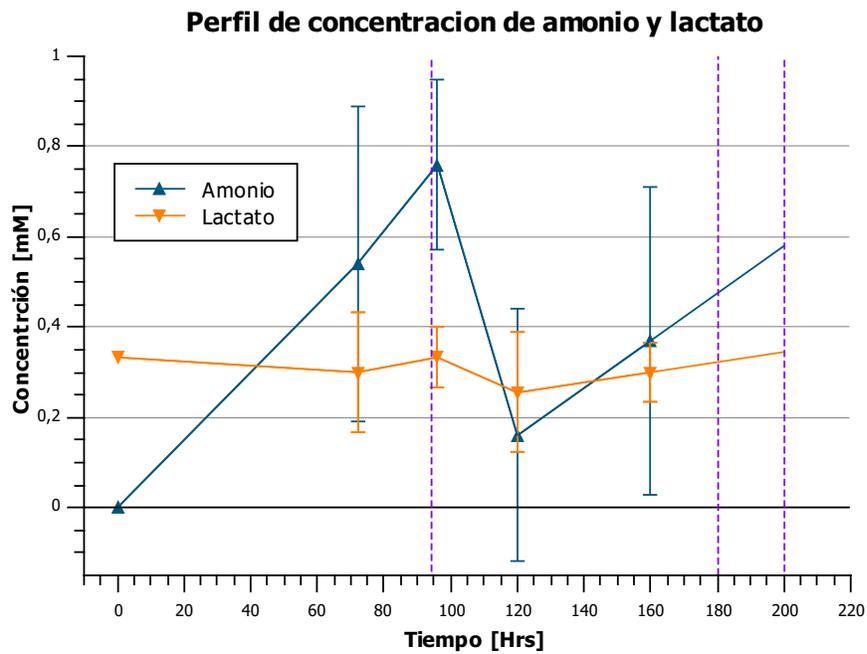


Figura 5.25: Perfil de concentración de amonio y lactato. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs.

De la Figura 5.25 se observa una fluctuación importante de las concentraciones de amonio y una concentración constante de lactato, pero a diferencia de los otros medios de cultivo la desviación estándar es muy grande por lo que los datos no son concluyentes, solo se sabe que para amonio se mantiene una concentración entre 0 y 1 [mM].

En la Figura 5.26 se observa un aumento de concentración de glutamina constante en el tiempo, el cual pasa por un punto cercano a las 120 hrs donde se comienza a consumir y luego continúa aumentando su concentración constantemente. En cambio, las concentraciones se mantienen constantes para arginina y lisina, jamás superando los 1[mM].

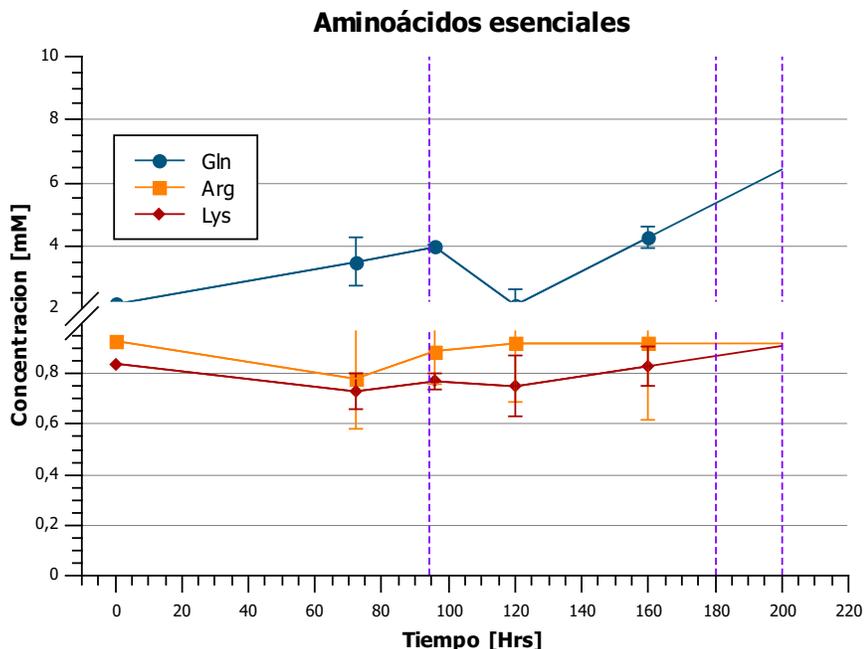


Figura 5.26: Perfil de aminoácidos esenciales como glutamina, arginina y lisina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs.

En cuanto a los demás aminoácidos esenciales en la Figura 5.27, se observa que todos mantienen una producción a lo largo del cultivo. Por otro lado, al estudiar los aminoácidos no esenciales en las Figuras 5.28 y 5.29 se observa que las concentraciones se mantienen relativamente constantes excepto para la asparragina, donde previo a las 94 horas existe una acumulación de esta en el medio, y desde este punto en adelante se observa un decaimiento de su concentración.

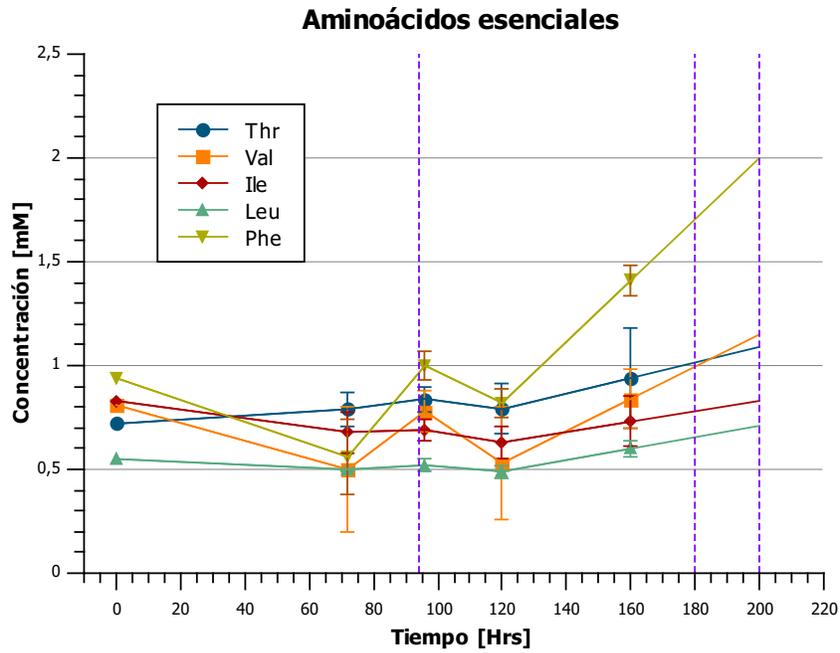


Figura 5.27: Perfil de aminoácidos esenciales treonina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs.

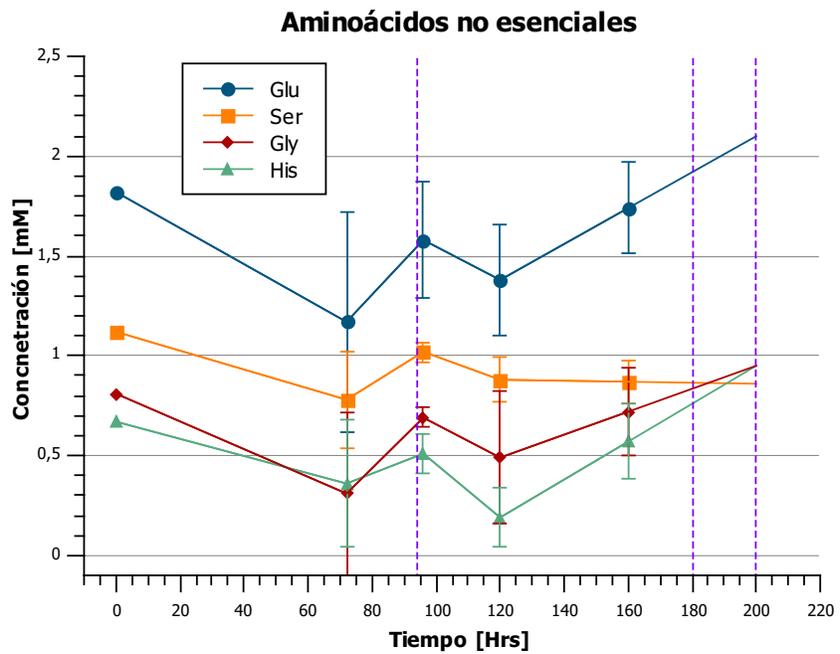


Figura 5.28: Perfil de aminoácidos no esenciales glutamato, serina, glicina e histidina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs.

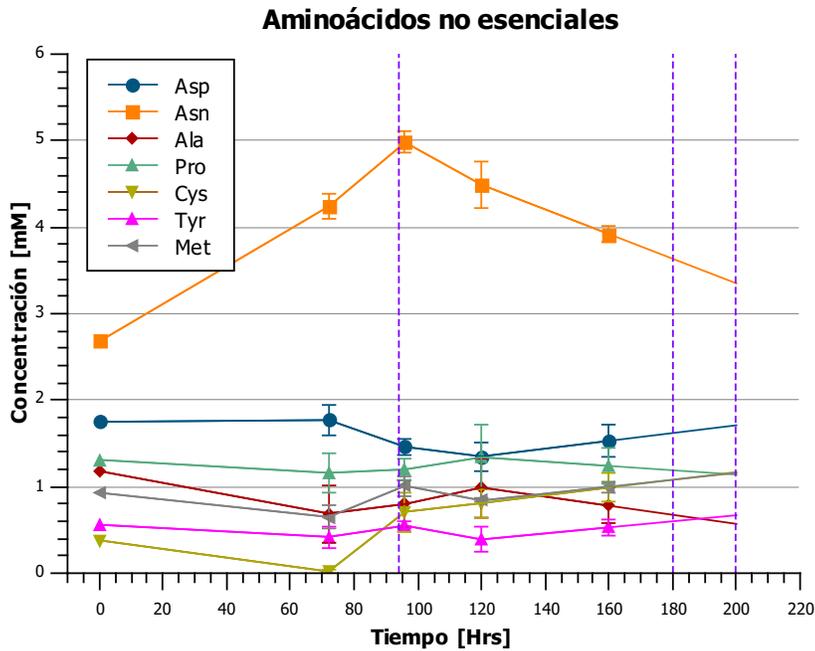


Figura 5.29: Perfil de aminoácidos no esenciales aspartato, asparragina, alanina, prolina, cisteína, tirosina y metionina. Las líneas moradas que cruzan el gráfico indican los estados metabólicos en 94, 180 y 200 hrs.

No se observa que ningún aminoácido ni fuente de carbono llegue al punto de agotamiento exceptuando la cisteína que luego de su agotamiento comienza una nueva acumulación. Para poder entender mejor lo que ocurre en este medio se analizarán las razones estequiométricas.

5.5.3. Radios estequiométricos

A continuación se presentan los radios estequiométricos según los datos medidos, donde se eligió la glutamina como nutriente de referencia para los aminoácidos y glucosa como metabolito de referencia para la glutamina y la sacarosa.

Dado que la glutamina se mantiene en producción a lo largo del cultivo, sus curvas acumuladas dan valores negativos. En cambio, los aminoácidos que se encuentran en consumo presentan curvas acumuladas con valores positivos, es decir, las razones con respecto a glutamina que sean negativas indicarán el consumo de los aminoácidos. Por otro lado, como la glucosa se encuentra en consumo a lo largo del crecimiento celular, las razones que sean positivas con respecto a ella indica consumo.

Razón estequiométrica de Glucosa			
	En el medio	Razón de consumo	R cuadrado
Glutamina	0,05	-0,11	0,95
Sacarosa	0,07	-0,01	0,78
Razón estequiométrica de Glutamina			
	En el medio	Razón de consumo	R cuadrado
Alanina	0,55	0,29	0,85
Arginina	0,43	0,26	0,94
Asparragina	1,25	-2,65	0,89
Aspartato	0,81	-0,19	0,97
Glutamato	0,85	1,23	0,93
Glicine	0,38	0,81	0,93
Histidina	0,31	0,57	0,91
Isoleucina	0,39	0,23	0,89
Leucina	0,26	0,26	0,95
Lisina	0,39	0,25	0,93
Metionina	0,43	0,55	0,95
Fenialalanina	0,44	1,72	0,96
Serina	0,52	0,14	0,83
Treonina	0,33	0,27	0,98
Tirosina	0,26	0,21	0,92
Valina	0,26	0,66	0,94
Prolina	0,61	0,18	0,93
cisteina	0,18	1,57	0,97

Tabla 5.9: Razón estequiométrica, según datos obtenidos. La primera parte de la tabla muestra la razón presente en el medio y la razón de consumo entre glutamina y sacarosa, con respecto a glucosa. La segunda mitad de la tabla muestra la razón presente en el medio y la razón de consumo entre los demás aminoácidos con respecto a glutamina. La razón de consumo se calcula como la pendiente entre las curvas acumuladas del nutriente de interés y el nutriente de referencia.

Como se observa en la Tabla 5.9, ni glutamina ni sacarosa se consumen junto a glucosa. Por otro lado, los aminoácidos que se consumen con respecto a glutamina son asparragina y aspartato, pero solo la primera presenta valores donde la razón de consumo en valor absoluto es mayor que la razón presente en el medio, por lo tanto sería este el aminoácido que se debe suplementar.

El R^2 indica qué tan cercana es la aproximación de la pendiente realizada con respecto a los puntos tratados, es por ello que entre más alto sea el valor más aproximado será la razón que se estudia. Entre los aminoácidos tratados, el valor más bajo de R^2 es alcanzado por alanina con 0,85, lo que no interfiere con el análisis anterior.

5.5.4. Composición propuesta basada en medio SFX utilizando datos obtenidos

De esta forma se puede obtener la primera formulación para el medio SFX, previo al momento de hacer el análisis de flujo metabólico. La formulación completa se hizo considerando un 50% de la fracción de modificación deseada, es decir, al calcular la nueva proporción asparragina/glutamina que debe tener el medio solo se consideró la mitad de esta. Este criterio se utiliza para realizar las próximas iteraciones sin tener que sobre-suplementar el medio y realizar un excesivo gasto de recursos.

En resumen, según los datos medidos, se debe adicionar asparragina. La composición propuesta se muestra a continuación en la Tabla 5.10.

		Composición [mmol]	Agregar [mmol]	Composición propuesta [mmol]
Azúcares	Glc	42,67	-	42,67
	Suc	2,94	-	2,94
Aminoácidos	Glu	1,82	-	1,82
	Asp	1,75	-	1,75
	Ser	1,12	-	1,12
	Gln	2,15	-	2,15
	Gly	0,81	-	0,81
	His	0,67	-	0,67
	Thr	0,72	-	0,72
	Arg	0,93	-	0,93
	Asn	2,68	6,72	9,38
	Ala	1,18	-	1,18
	Pro	1,31	-	1,31
	Cys	0,38	-	0,38
	Tyr	0,56	-	0,56
	Val	0,81	-	0,81
	Met	0,93	-	0,93
	Lys	0,84	-	0,84
	Ile	0,83	-	0,83
	Leu	0,55	-	0,55
Phe	0,94	-	0,94	

Tabla 5.10: Composición propuesta para medio SFX según MFA, se especifica cuantos mmol agregar por litro de preparación

En primer lugar, se puede observar que cuando la barra es positiva indica que la reacción ocurre hacia el lado correspondiente de la reacción, esto significa que la reacción Glucosa \rightarrow Biomasa ocurre en dirección opuesta. Esto no indica que la biomasa está produciendo glucosa sino más bien que en el estado metabólico II y III la formación de biomasa no ocurre en mayor medida por la catálisis de glucosa. Solo en el estado metabólico I la glucosa se usa para ese propósito. Por otro lado, la reacción Glucosa \rightarrow Piruvato en el estado I y III ocurre en el sentido indicado, pero en el estado II prevalece el sentido opuesto.

La entradas al TCA corresponden principalmente de piruvato, glutamato, succinil-Coa, fumarato y, por otro lado, la mayor cantidad de aminoácidos utilizados para el ciclo mismo ocurre en el estado metabólico III, que además resulta ser el estado donde se produce la menor cantidad de biomasa, ya sea a partir de glucosa, glutamina o aminoácidos en general. Con respecto a los otros flujos negativos presentes en la Figura 5.5.6 se destaca pry-ala y gln-glu, donde este último tiene registros de ser reversible para *P. salmonis* [44–46] y pry-ala se encuentra descrita como reversibles para otros MO, pero no se ha encontrado registros para *P. salmonis* [44–46], esto resultados se podrían explicar dado que la fórmula elemental utilizada en la matriz de reacciones no corresponde exactamente a *P. salmonis* así como la ecuación para la formación de biomasa presentada en la Tabla 2.3.

Si se observan las velocidades de producción se destaca que la producción de biomasa es negativa tanto para el estado metabólico II como el III, por lo que el ajuste utilizado considera que el estado II y III se encuentra en el decaimiento celular, caso que no se había presentado en los demás medios. Por esta razón es que al momento de analizar los 3 medios en conjunto se optará por analizar el medio Grace's y L15 en estado metabólico III y SFX en estado metabólico I.

5.5.6. Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA

En la Tabla 5.11 se puede observar la razón entre las velocidades obtenidas con los datos y las velocidades estimadas con el MFA, con ello se puede ver qué tan alejadas se encuentran las aproximaciones realizadas. Las velocidades más críticas son de treonina y biomasa para el estado metabólico II, donde la velocidad estimada es una orden magnitud menor que la obtenida con los datos. Esto se puede deber a que dentro de la matriz de reacciones eran menos sensibles a los cambios, pudiendo generar un intervalo de holgura mayor al momento de estimar los datos, permitiendo acomodarlos para llegar a un balance de carbono y nitrógeno que cierre en un 100%. Además, el valor de biomasa en estado metabólico II y III es negativo en la Figura pero en la Tabla 5.11 se presenta como positivo, lo cual indicaría que el valor obtenido de biomasa para el estado metabólico III también es negativo. En otras palabras, desde que se considera el estado metabólico III a las 200 hrs, según el ajuste de la curva de crecimiento, el microorganismo ya estaría en fase de decaimiento.

Razón de velocidad de consumo medidas y velocidad estimada con MFA

	Estado metabólico I	Estado metabólico II	Estado metabólico III
GLC	1,00	1,01	1,01
ALA	0,91	0,94	0,95
CYS	0,66	0,89	0,89
SER	0,87	0,90	0,91
GLY	0,92	0,95	0,94
LYS	0,63	0,74	0,75
LEU	0,75	0,77	0,93
GLN	1,09	1,07	1,07
HIS	0,78	0,87	0,84
PRO	0,75	0,79	0,89
ARG	0,39	0,58	0,48
GLU	0,95	0,96	0,98
ASN	1,03	1,02	1,02
ASP	0,87	0,89	0,92
ILE	0,87	0,87	0,97
MET	0,83	0,88	0,92
THR	3,15	-20,57	2,95
VAL	0,90	0,92	0,96
TYR	0,85	0,80	1,06
PHE	0,94	0,93	1,02
LAC	3,48	0,46	0,28
CO2	1,00	1,00	1,00
NH3	1,07	1,03	1,06
BIOMASS	0,01	-11,99	0,52
SUCROSE	0,43	-0,51	-0,20

Tabla 5.11: Razón entre velocidades de consumo calculadas y velocidades estimadas con MFA. Las velocidades para metabolitos intermedios como PYR, AcCoA, aKG, OAA, MAL y FUM son iguales a cero indicando pseudo estado estacionario.

5.5.7. Composición propuesta basada en el medio SFX utilizando MFA

Finalmente, de igual forma que en la Tabla 5.10, se obtiene una nueva formulación para el medio SFX, donde se deberá agregar glutamina, glicina, histidina, asparragina, valina y fenilalanina.

		Composición [mmol]	Agregar [mmol]	Composición propuesta [mmol]
Azúcares	Glc	42,67	-	42,67
	Suc	2,94	-	2,94
Aminoácidos	Glu	1,82	-	1,82
	Asp	1,75	-	1,75
	Ser	1,12	-	1,12
	Gln	2,15	24,36	26,51
	Gly	0,81	7,47	8,28
	His	0,67	14,94	15,60
	Thr	0,72	-	0,72
	Arg	0,93	-	0,93
	Asn	2,68	24,22	26,90
	Ala	1,18	-	1,18
	Pro	1,31	-	1,31
	Cys	0,38	-	0,38
	Tyr	0,56	-	0,56
	Val	0,81	1,64	2,45
	Met	0,93	-	0,93
	Lys	0,84	-	0,84
	Ile	0,83	-	0,83
	Leu	0,55	-	0,55
Phe	0,94	3,27	4,21	

Tabla 5.12: Composición propuesta para medio SFX según MFA, se especifica cuantos mmol agregar por litro de preparación

5.6. Comparación de los tres medios con Análisis de Flujo Metabólico

Finalmente se compararán los tres análisis de flujo metabólico de cada uno de los medios. El estado metabólico que se eligió para cada uno de los medios debe cumplir dos criterios:

- El flujo de formación de biomasa debe ser positivo.
- Este valor debe ser el más alto de los 3 estados metabólicos estudiados para cada medio.

Como se pudo observar en los resultados anteriores, Grace's se analizará en el estado metabólico III que corresponde al momento donde ya hay un agotamiento de glucosa y se produce glutamina para suplir la falta de fuentes de carbono. L15 se analizará en el estado metabólico II que corresponde al escenario donde el MO ya se encuentra adaptado a la falta de glucosa en el medio y se está consumiendo glutamina como fuente de carbono. Por último para el caso de SFX se comparará el estado metabólico I donde se cumple los criterios anteriormente expuestos.

En la Figura 5.31 se comparan los valores absolutos para cada uno de los flujos. Se puede identificar que en el medio Grace's existe una utilización de glucosa y aminoácidos para la formación de biomasa más que para la formación de energía misma. La energía que mantiene estable al microorganismo proviene principalmente del glutamato hacia alfa-ketoglutarato (αKGT) y otros aminoácidos hacia succinil-Coa o fumarato, situación que no ocurre para L15 donde la entrada al TCA proviene principalmente de otros aminoácidos hacia acetyl-Coa. Por otro lado, para SFX la entrada principal hacia el TCA ocurre a partir del piruvato (proveniente de glucosa) y oxalacetato por aspartato (proveniente de asparagina).

En los 3 medios se aprecia producción de biomasa a partir de aminoácidos y a partir de glucosa, donde se pudo apreciar que L15 presentó las mayores velocidades de producción, mientras que SFX presentó los valores más pequeños. Este patrón se repite para la formación de biomasa a partir de glutamina y otros aminoácidos.

Esto se podía explicar ya que en el estado metabólico II para el medio L15 se encuentra adaptado a la falta de glucosa en el medio, situación que lo pondría en ventaja con respecto a Grace's donde esta adaptación debió empezar a trabajar una vez agotada la glucosa en el medio. Por el contrario, SFX es un medio donde la glucosa nunca llega a agotarse realmente, esto se puede ver reflejado en el comportamiento de los flujos metabólicos donde gran parte de ellos se encuentran optimizados para la entrada del TCA a partir de glucosa/piruvato hacia acetyl-Coa.

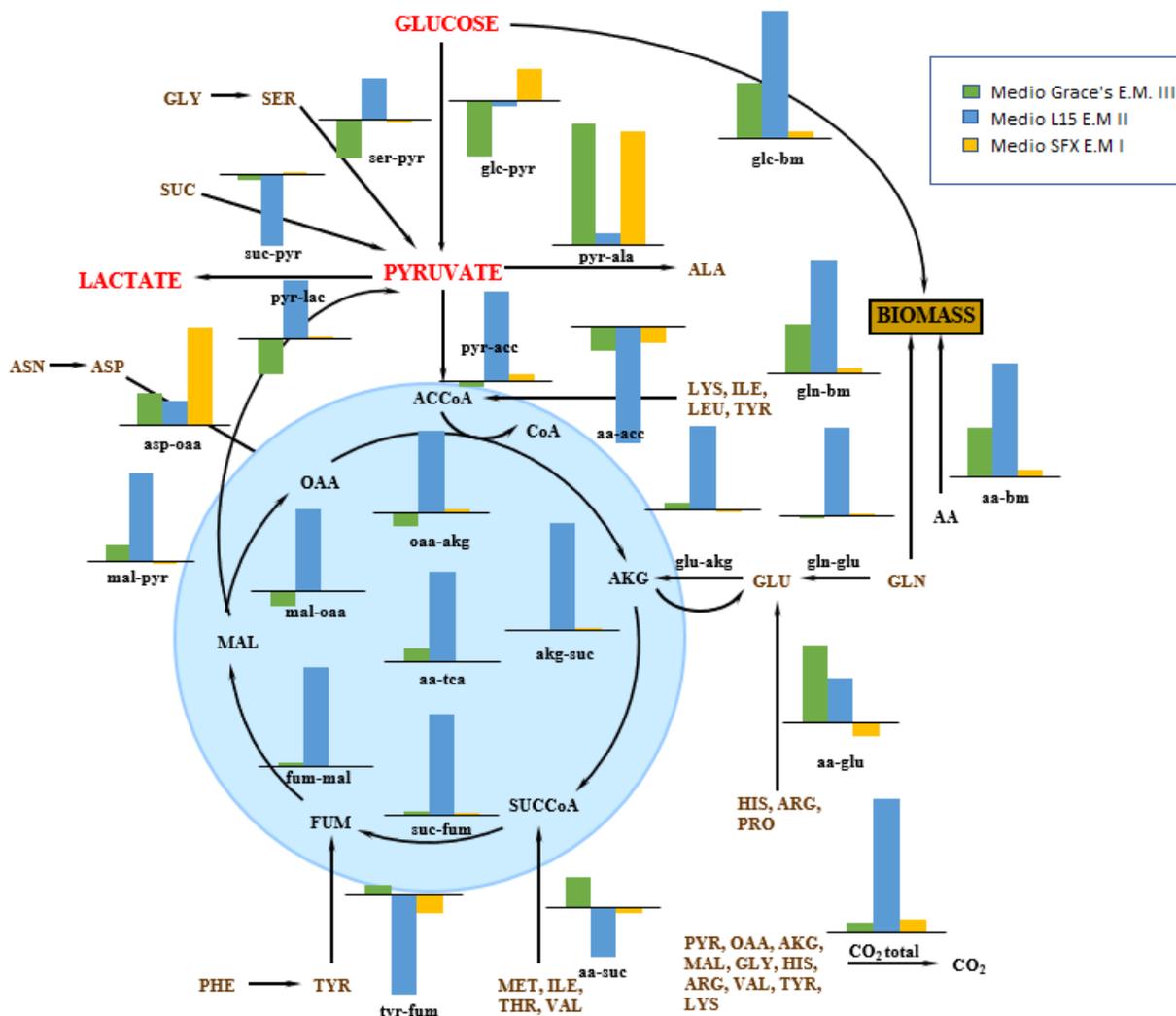


Figura 5.31: Representación gráfica de los flujos en el metabolismo central donde se pueden comparar los diferentes medios de cultivo.

5.6.1. Tabla comparativa de aminoácidos que se deben agregar según datos obtenidos y MFA

Se presentaron dos formas de formulación del medio de cultivo, una de ellas a partir de los datos obtenidos por las razones de consumo según nutrientes de referencia, y el segundo es utilizando el MFA. Para el primero de los casos lo único que es considerado son los nutrientes limitantes y cómo son consumidos a lo largo del cultivo, este método obvia todas las reacciones que puedan estar ocurriendo dentro del microorganismo y solo genera una aproximación de reformulación del medio, es por eso que esta metodología es utilizada generalmente para cultivos fed batch donde se trata de mantener al microorganismo fuera de un estado de estrés donde falten los nutrientes [17].

Agregar	Grace's		L15		SFX	
	Datos	MFA	Datos	MFA	Datos	MFA
	Glc, asp, gln, pro y val	Glc, gln, cys y met	Glc, glu, asp y gln	Glc, suc, glu y gln	Asn	Gln, gly, his, asn, val y phe

Tabla 5.13: Tabla comparativa según datos obtenidos y MFA

Comparando la Tabla 5.13 se puede apreciar que existe una estrecha relación entre ambos métodos, aun cuando el MFA considera las ecuaciones que ocurren dentro de las células y el método de los datos obtenidos no. Lo primero que llama la atención es que en ambos medios donde existe deficiencia de glucosa se sugiere aumentar la concentración, esto indicaría la dependencia de glucosa para el crecimiento celular, de igual manera en todos los medios sugiere un incremento de concentración en glutamato o glutamina, aminoácido clave para el metabolismo de este micrororganismos. En trabajos anteriores como el de Fuentealba et al. (2017) [35] se describe una independencia de glucosa para el crecimiento celular mientras que en el trabajo de Cortés et al. (2017) [26] se describe una independencia de la misma. Con las pruebas realizadas en este trabajo se puede comprobar que efectivamente ambas opciones son viables para el metabolismo de *P. salmonis*, pero en caso de existir glucosa en el medio se le priorizará con respecto a la utilización de glutamato o glutamina.

5.6.2. Tabla comparativa de la propuesta concentración de aminoácidos y azúcares para los medios de cultivo

Finalmente, y comparando las nuevas formulaciones obtenidas con MFA, se destaca que aumentaron las concentraciones de glucosa en los medios Grace's y L15, medios en los que la concentración se agotaba en el primer caso y era muy baja en el segundo. Se acorta por tanto la diferencia de 10 veces menor para Grace's a solo 6 veces menor y para el caso de L15 pasa de tener una concentración 700 veces menor a ser 4 veces menor respecto a SFX. En los 3 medios fue necesario aumentar la cantidad de glutamina o glutamato, ya que son aminoácidos primordiales a la hora de entrar el ciclo TCA o generar biomasa. Las mayoría de los aminoácidos que no se encontraban presentes en L15 fueron agregados manteniendo concentraciones muy similares entre los 3 medios.

Los 3 aminoácidos con mayor concentración en Grace's son histidina, serina y glutamina; para L15 son arginina, glicina y glutamina y finalmente para SFX son glutamina, arginina e histidina.

		Grace's [mM]	L15 [mM]	SFX [mM]
Azúcares	Glc	6.92	9.28	42.67
	Suc	78.01	4.03	2.94
Aminoácidos	Glu	4.08	1.00	1.82
	Asp	4.04	0.00	1.75
	Ser	10.47	1.90	1.12
	Gln	9.37	2.64	26.51
	Gly	8.66	2.66	8.28
	His	16.11	1.61	15.60
	Thr	1.47	2.52	0.72
	Arg	4.02	2.87	0.93
	Asn	2.65	1.89	26.90
	Ala	2.53	2.58	1.18
	Pro	6.07	0.00	1.31
	Cys	4.92	0.99	0.38
	Tyr	0.28	1.66	0.56
	Val	7.54	0.85	2.45
	Met	0.63	0.54	0.93
	Lys	4.28	0.62	0.84
	Ile	0.38	0.99	0.83
	Leu	0.57	0.99	0.55
Phe	0.91	0.79	4.21	
Trp	0.49	0.10	-	

Figura 5.32: Tabla comparativa de la nueva concentración de aminoácidos y azúcares para los medios de cultivo.

Por otro lado, el precio de cada uno de los medios varía dependiendo del proveedor y el formato en que se compran. Si bien existen diferentes formatos de presentación, en este trabajo se utilizó como criterio de comparación el formato de 10 litros en polvo. En la Tabla 5.14 se muestran los precios de cada uno de los medios. Se identifica que el medio más económico es el medio L15 siendo 5 veces más barato que el medio SFX, pero a su vez, es el medio que tiene menor rendimiento en la producción de biomasa, además de presentar un t_d de alrededor de

56 [h]. Pasa todo lo opuesto con SFX que es el medio más costoso superando 4 y 5 veces el precio de las otras opciones, pero es el medio que alcanza una mayor densidad de biomasa.

Medio de cultivo	Formato	Proveedor	Precio USD
Grace's	10 L de medio en polvo	Sigma aldrich	113.00
L15		Sigma aldrich	92.10
SFX		Thermo Fisher Scientific	506.50

Tabla 5.14: Tabla comparativa de precios para los diferentes medios. El precio de los medios corresponde al formato de 10 litros en polvo obtenidos en dólares para Grace's [47], L15 [48] y SFX [49].

Basándose solo en los precios, la diferencia entre Grace's y L15 no es mayor a 1,2 veces su precio, diferencia que podría llegar a ser despreciable si se compara la cantidad de azúcares que se debe agregar al medio L15 para poder ser suplementado. De hecho, si se observa las Tablas 5.4 y 5.8 se puede apreciar que el medio Grace's solo requiere aumentar 3,03 [mmol] su concentración de glucosa por litro preparado, mientras que el medio L15 requiere aumentar 9,22 y 3,98 [mmol] la cantidad de glucosa y sacarosa por litro preparado. Por otro lado, Grace's requiere suplementar 3 aminoácidos en comparación a los 2 aminoácidos que se deben agregar en L15. Es por esta razón que independiente de cual de los medios se decida suplementar la diferencia de precios podría ser despreciable y aun así ser costo/eficiente con respecto a los resultados obtenidos para SFX.

Conclusión

Se concluye este trabajo habiendo cumplido el objetivo principal de proponer una composición de medio de cultivo acorde a los requerimientos celulares de *P. salmonis*. Esta propuesta se logró estimando suplementos para cada uno de los medios de cultivo utilizados por VacciVet. Si bien la composición específica de cada medio propuesto se puede revisar en la sección de resultados, en esta sección se procederá a resumir y justificar los hallazgos más importantes:

- Para el medio Grace's se observó un agotamiento de glucosa, por lo que el microorganismo se vio en una situación de estrés donde debió recurrir a otras fuentes de carbono como fue glutamina. En cambio, para el medio L15 las concentraciones de glucosa son 70 veces menores a las de Grace's, por lo que el microorganismo en este medio comienza fijando el carbono a partir de otras fuentes como la glutamina o glutamato y agotando otros aminoácidos en el proceso. Finalmente, el medio SFX existe un consumo de glucosa que no llega a agotarse, pero los datos entregados solo llegan hasta las 200 hrs. por lo que no es claro si realmente se llega a terminar la fase exponencial.
- Se concluye que para *P. salmonis* la presencia o ausencia de glucosa limitará su rendimiento y formación de biomasa.
- Se aumentaron las concentraciones de glucosa para los medios Grace's y L15. Así, la diferencia de concentraciones entre SFX y Grace's, pasó a ser 6 veces menor en relación a las 10 veces iniciales. Por otro lado, al agregar concentraciones de glucosa en el medio L15, la diferencia de concentraciones entre SFX y este medio pasó a ser 4 veces menor en comparación a las 700 veces de diferencia que existía inicialmente. De esta manera se acotó la diferencia entre los tres medios.
- En los 3 medios de cultivo se encuentra presente la sacarosa, pero en ninguno de los casos estudiados fue utilizada como fuente de carbono, sino que muchas veces fue sintetizada por *P. salmonis*. Esto sugiere que la sacarosa cumple un rol distinto, como el de soportar el estrés osmótico o sales en el medio, sobre todo porque *P. salmonis* corresponde a un microorganismo marino que debe crecer en grandes concentraciones de sales [43].
- Con respecto al resto de los aminoácidos que deben ser adicionados, las cantidades varían según cual sea el medio analizado. Esto se debe principalmente a que ninguno de los medios tiene las mismas condiciones iniciales: Por un lado se encuentra Grace's

con agotamiento de glucosa; por otro lado, L15 con concentraciones de glucosa 70 veces menores a Grace's; y, finalmente, SFX con concentraciones mayores en un orden de magnitud con respecto a Grace's, pero al tener una cantidad limitada de puntos medidos no se alcanza a apreciar su agotamiento. Es por estas diferencias en las condiciones iniciales que cada uno de los medios se encuentra en un comienzo en distintos estados metabólicos.

- En cuanto al análisis de costo de adquisición de los medios, se eligen Grace's y L15 como medios base por ser las opciones más económicas y requerir pocos nutrientes adicionales para suplementar. Sin embargo, es importante la realización de más pruebas experimentales para evaluar el desempeño de los medios propuestos, con el objetivo de asegurar que estas ventajas económicas no impliquen una disminución importante del rendimiento de biomasa.
- Según dichos análisis, por la cantidad de elementos a suplementar y rendimiento obtenido se sugiere fuertemente la utilización y suplementación del medio Grace's.

Como proyección a futuro se debería considerar realizar iteraciones en esta metodología para perfeccionar las composiciones de cada medio y así acercarse a la formulación óptima para *P. salmonis*, ya que se debe considerar que la presencia o ausencia de un nutriente puede generar un cambio en los estados metabólicos. Por otro lado, como mejoras posibles se encuentra el aumentar la cantidad de puntos tomados al momento de realizar los cultivos, ya que con los puntos utilizados no es evidente si efectivamente en el medio SFX se llega a estado estacionario o si efectivamente estuvo en fase exponencial. El aumentar la cantidad de punto medidos podría mejorar los ajustes para cada una de las curvas.

En conclusión, al agotarse la glucosa, el metabolismo de *P. salmonis* es capaz de adaptarse al medio y fijar carbono a partir de glutamina y glutamato. Además, si no posee glucosa desde un comienzo, el MO logra crecer a este estado. En el caso de que haya presencia de glucosa y glutamina, siempre preferirá la primera como fuente de carbono principal, hasta que llegue al punto crítico de agotamiento. Esto explica la existencia de experimentos previos contradictorios que, por un lado, demostraban que no era necesaria la presencia de glucosa para el crecimiento de *P. salmonis* [33] [35], pero a su vez otros estudios realizados concluyeran que no es posible el cultivo del MO en ausencia de glucosa [26]. Este trabajo queda como legado o aporte que, dependiendo de la composición del medio, ambos escenarios son plausibles y no excluyentes.

Bibliografía

- [1] Countries that export fish fillets (2018). https://oec.world/en/visualize/tree_map/hs92/export/show/all/10304/2018/. [En línea ; accedido 06-apr-2019].
- [2] Exportaciones - salmón chile. <https://www.salmonchile.cl/exportaciones-salmonchile/>. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [3] Pablo Ibieta, Valentina Tapia, Claudia Venegas, Mary Hausdorf, and Harald Takle. Chilean salmon farming on the horizon of sustainability: Review of the development of a highly intensive production, the ISA crisis and implemented actions to reconstruct a more sustainable aquaculture industry. In *Aquaculture and the Environment - A Shared Destiny*. InTech, December 2011.
- [4] J. D. Cvitanich, O. Garate N., and C. E. Smith. The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in chilean salmonids and its confirmation by kochs postulate. *Journal of Fish Diseases*, 14(2):121–145, March 1991.
- [5] Michael J. Mauel, Cynthia Ware, and Pedro A. Smith. Culture of piscirickettsia salmonis on enriched blood agar. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(2):213–214, March 2008.
- [6] Kevin Maisey, Ruth Montero, and Myron Christodoulides. Vaccines for piscirickettsiosis (salmonid rickettsial septicaemia, SRS): the chile perspective. *Expert Review of Vaccines*, 16(3):215–228, October 2016.
- [7] S Bravo and M Campos. Coho salmon syndrome in chile. *Fish Health Section*, pages 277–280, May 1989.
- [8] J L Fryer and R P Hedrick. Piscirickettsia salmonis: a gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases*, 26(5):251–262, May 2003.
- [9] J.L. Fryer and C.N. Lannan. Rickettsial infections of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 6:3–13, 1996.
- [10] Servicio Agrícola Ganadero. Productos biológicos inmunológicos con registro uso en salmónidos. https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/lista_salmonidos_registro_provisional_11-3-2019.pdf, 3 2019. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [11] Julia I. Tandberg, Leidy X. Lagos, Petter Langlete, Eva Berger, Anne-Lise Rishovd,

- Norbert Roos, Deepa Varkey, Ian T. Paulsen, and Hanne C. Winther-Larsen. Comparative analysis of membrane vesicles from three *piscirickettsia salmonis* isolates reveals differences in vesicle characteristics. *PLOS ONE*, 11(10):e0165099, October 2016.
- [12] Thermo Fisher Scientific. Grace’s insect medium. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11595030>, 3 2019. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [13] Biological Industry. Grace’s insect medium. <https://www.bioind.com/worldwide/support/media-formulations/media-formulation-graces-insect/>, 3 2019. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [14] Thermo Fisher Scientific. Medio l-15 de leibovitz, sin rojo fenol. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/21083027#/21083027>, 3 2019. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [15] Biological Industry. Leibovitz l-15 medium. <https://www.bioind.com/worldwide/support/media-formulations/media-formulation-l15/>, 3 2019. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [16] Fisher Scientific. Hyclone™ sfx-insect™ cell culture media. <https://www.fishersci.fi/shop/products/hyclone-sfx-insect-cell-culture-media-7/10521813>, 3 2019. [En línea ; accedido 11-apr-2019].
- [17] Wei-Shou Hu. *Cell Culture Bioprocess Engineering*. 10 2015.
- [18] R. C. Edgar. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5):1792–1797, March 2004.
- [19] Pablo A. Goloboff, James S. Farris, and Kevin C. Nixon. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24(5):774–786, October 2008.
- [20] PABLO N. HESS and CLAUDIA A. DE MORAES RUSSO. An empirical test of the midpoint rooting method. *Biological Journal of the Linnean Society*, 92(4):669–674, December 2007.
- [21] Jan P Meier-Kolthoff, Alexander F Auch, Hans-Peter Klenk, and Markus Göker. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14(1):60, 2013.
- [22] Jan P. Meier-Kolthoff, Markus Göker, Cathrin Spröer, and Hans-Peter Klenk. When should a DDH experiment be mandatory in microbial taxonomy? *Archives of Microbiology*, 195(6):413–418, April 2013.
- [23] Jan P Meier-Kolthoff, Richard L Hahnke, Jörn Petersen, Carmen Scheuner, Victoria Michael, Anne Fiebig, Christine Rohde, Manfred Rohde, Berthold Fartmann, Lynne A Goodwin, Olga Chertkov, TBK Reddy, Amrita Pati, Natalia N Ivanova, Victor Markowitz, Nikos C Kyrpides, Tanja Woyke, Markus Göker, and Hans-Peter Klenk. Complete genome sequence of DSM 30083t, the type strain (u5/41t) of *escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. *Standards in Genomic Sciences*,

9(1):2, 2014.

- [24] Nicholas D. Pattengale, Masoud Alipour, Olaf R. P. Bininda-Emonds, Bernard M. E. Moret, and Alexandros Stamatakis. How many bootstrap replicates are necessary? In *Lecture Notes in Computer Science*, pages 184–200. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [25] Alexandros Stamatakis. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9):1312–1313, January 2014.
- [26] María P. Cortés, Sebastián N. Mendoza, Dante Travisany, Alexis Gaete, Anne Siegel, Verónica Cambiazo, and Alejandro Maass. Analysis of piscirickettsia salmonis metabolism using genome-scale reconstruction, modeling, and testing. *Frontiers in Microbiology*, 8, December 2017.
- [27] Pauline Doran. *Bioprocess engineering principles*. Academic Press, Waltham, MA, 2013.
- [28] Wei-Shou Hu, editor. *Cell Culture Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [29] C.N. Lannan and J.L. Fryer. Piscirickettsia salmonis, a major pathogen of salmonid fish in chile. *Fisheries Research*, 17(1-2):115–121, June 1993.
- [30] C.N. Lannan and J.L. Fryer. Extracellular survival of piscirickettsia salmonis1. *Journal of Fish Diseases*, 17(5):545–548, September 1994.
- [31] T. H. Birkbeck, A. A. Griffen, H. I. Reid, L. A. Laidler, and S. Wadsworth. Growth of piscirickettsia salmonis to high titers in insect tissue culture cells. *Infection and Immunity*, 72(6):3693–3694, May 2004.
- [32] Jarle Mikalsen, Olaf SkjÅrvik, Jannicke Wiik-Nielsen, Marit A. Wasmuth, and Duncan J. Colquhoun. Agar culture of Piscirickettsia salmonis, a serious pathogen of farmed salmonid and marine fish. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1):43–47, January 2008.
- [33] AJ Yañez, K Valenzuela, H Silva, J Retamales, A Romero, R Enriquez, J Figueroa, A Claude, J Gonzalez, R Avendaño-Herrera, and JG Carcamo. Broth medium for the successful culture of the fish pathogen piscirickettsia salmonis . *Diseases of Aquatic Organisms*, 97(3):197–205, January 2012.
- [34] Mirtha Henríquez, Ernesto González, Sergio H. Marshall, Vitalia Henríquez, Fernando A. Gómez, Irene Martínez, and Claudia Altamirano. A novel liquid medium for the efficient growth of the salmonid pathogen piscirickettsia salmonis and optimization of culture conditions. *PLoS ONE*, 8(9):e71830, September 2013.
- [35] Pablo Fuentealba, Camila Aros, Yesenia Latorre, Irene Martínez, Sergio Marshall, Pau Ferrer, Joan Albiol, and Claudia Altamirano. Genome-scale metabolic reconstruction for the insidious bacterium in aquaculture piscirickettsia salmonis. *Bioresource Technology*, 223:105–114, January 2017.
- [36] Claudia ALTAMIRANO, Irene MARTÍNEZ, Sergio MARSHALL, Vitalia HENRÍQUEZ, Fernando GÓMEZ, and Pablo FUENTEALBA. Culture medium allowing the growth

of the bacterium *piscirickettsia salmonis*, 2016.

- [37] R. I. Freshney. *Culture of Animal Cells*. 5 edition, 2005.
- [38] M. Rozas and R. Enríquez. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 37(3):163–188, November 2013.
- [39] A. Chrustie and M. Butler. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *J Biotechnol*, 1994.
- [40] B. Dusemund P. Galtier J. Gilbert D.M. Gott S. Grilli R. Guertler G.E.N. Kass J. Koenig C. Lambré J-C. Larsen J-C. Leblanc A. Mortensen D. Parent-Massin I. Pratt I. Rietjens I. Stankovic P. Tobback T. Verguieva R. Woutersen. F. Aguilar, U.R. Charrondiere. Benfotiamine, thiamine monophosphate chloride and thiamine pyrophosphate chloride, as sources of vitamin b1 added for nutritional purposes to food supplements. *The EFSA Journal*, 864:1–31, June 2008.
- [41] R Freshney. *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, 2016.
- [42] Ibiantech. Suero fetal bovino fbs y otros sueros. <https://www.ibiantech.com/suero-fetal-bovino-fbs/>, 3 2019. [En línea ; accedido 09-apr-2019].
- [43] John Edward Lunn. Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiology*, 128(4):1490–1500, April 2002.
- [44] M. Kanehisa. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1):27–30, January 2000.
- [45] Minoru Kanehisa. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science*, 28(11):1947–1951, September 2019.
- [46] Minoru Kanehisa, Miho Furumichi, Yoko Sato, Mari Ishiguro-Watanabe, and Mao Tanabe. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*, October 2020.
- [47] Sigma aldrich. Grace’s insect medium. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Grace%27s&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=US&focus=product>, 9 2020. [En línea ; accedido 09-sep-2020].
- [48] Sigma aldrich. L-15 medium (leibovitz). <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Grace%27s&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en®ion=US&focus=product>, 9 2020. [En línea ; accedido 09-sep-2020].
- [49] Thermo Fisher Science. Cytiva (formerly ge healthcare life sciences) sfx-insectTM cell culture media. <https://www.fishersci.com/shop/products/hyclone-sfx-insect-cell-culture-media-7/sh3035003?keyword=true>, 9 2020. [En línea ; accedido 09-sep-2020].

Apéndice A

Metodología de medición de aminoácidos mediante HPLC

METODOLOGÍA DE MEDICIÓN DE AMINOÁCIDOS MEDIANTE HPLC

A. Preparación de soluciones:

- Fase Móvil A:
 - Acetonitrilo (60% v/v)
 - Agua desionizada (40% v/v)
 - Fase Móvil B:
 - Acetato de sodio trihidratado (19,05 grs/L) o Acetato de sodio anhidrido (11,49 grs/L)
 - Trietilamina (2,37 mL/L)
 - EDTA (1 mg/L)
 - Ácido fosfórico (para ajuste de pH)
 - Agua desionizada
1. Para la fase móvil B, disolver el acetato, la trietilamina y el EDTA en agua desionizada equivalente al 80% del volumen final. Ajustar pH a 5,02 con H₃PO₄, y aforar al volumen final.
 2. Posteriormente, la fase móvil B se debe filtrar por un sistema a vacío, con una membrada PDVF de tamaño de poro de 0,22 µm.
 3. Ambas fases móviles se deben sonicar por 10 minutos.

B. Estabilización de la columna

1. Antes de conectar la columna, todo el sistema HPLC debe ser estabilizado con agua desionizada, siguiendo los procedimientos estandarizados para purgar el sistema y las bombas. (Este paso es muy importante, ya que el HPLC se guarda con metanol por defecto, el cual puede dañar la columna).
2. Diseñar el método de acuerdo con los parámetros mostrados a continuación (o cargar el método previamente utilizado):

Paso	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	0,5	1	0,1	99,9
1	8	1	1,7	98,3
2	17,5	1	8,4	91,6
3	2	1	15	85
4	20	1	40	60
5	4	1	0,1	99,9

Condiciones cromatográficas:

- Temperatura de trabajo de la columna: 37° C
- Fase Móvil (Elusión en gradiente):
 - Fase A: Acetonitrilo:Agua (60:40)
 - Fase B: Tampón Acetato pH 5,02
- Flujo de trabajo: 1 ml/min
- Detección: Fluorescencia

- Excitación: 250 nm
- Emisión: 395 nm
- Volumen de inyección: 20 μ L
- Presión: 2800 psi
- Tiempo de metodología: 52 min
- Tiempo de respuesta: 100 ms

3. Conectar la columna y hacer pasar un flujo de 0,2 mL/min de la Fase A durante 15 minutos.
4. Aumentar el flujo a 0,4 mL/min durante 5 minutos.

NOTA:

Si durante los pasos 3 y 4 se observan peaks significativos en el detector, se recomienda pasar al flujo de trabajo con Fase A por al menos una hora para limpiar la columna. Pasado este tiempo, volver al paso 3.

5. Cambiar el gradiente para tener 50% de la Fase A y 50% de Fase B. Aumentar el flujo luego de 5 minutos hasta llegar a 0,5 mL/min.

NOTA:

Si durante el paso 5 se observan peaks significativos en el detector, se recomienda nuevamente mantener el flujo de trabajo por al menos una hora, pero esta vez con 50:50 de cada fase. Pasado este tiempo, seguir al paso 6.

6. Finalmente, después de 5 minutos en el flujo de trabajo, se pasa al gradiente inicial del método, que este caso es Fase A/Fase B 0,1:99,9.

C. Reconstitución del reactivo para derivatización

1. Precalear un bloque a 55°C.
2. Golpear suavemente el vial 2A antes de abrirlo para asegurar que todo el reactivo se encuentre en el fondo del frasco.
3. Enjuagar una punta de micropipeta tomando y botando 1 mL de reactivo del vial 2B.
4. Pasar 1 mL de reactivo desde el vial 2B al vial 2A.
5. Tapar el vial 2A y agitar en vórtex.
6. Calentar en el bloque a 55°C, agitando en vórtex ocasionalmente, hasta que todo el polvo se disuelva. No calentar por más de 10 minutos.

NOTA:

El reactivo reconstituido tiene una duración de una semana para poder utilizarse.

D. Derivatización y medición de las muestras

1. Las muestras deben estar filtradas y diluidas antes de derivatizar. La dilución se debe realizar para que las muestras tengan una concentración entre 0.05 mM a 0.4 mM (por experiencia, para DMEM/F12, diluir 1 a 20).
2. Adicionar 10 μ L de muestra en un vial ámbar de 2 mL.
3. Añadir 10 μ L de reactivo AccQ*Fluor reconstituido y 80 μ L de tampón Borato. Tapar y agitar en el vortex.
4. Incubar a temperatura ambiente por un minuto.
5. Colocar el vial con la muestra en un baño de agua a 55 °C por 10 min. Enfriar y trasvasijar a un inserto de 150 μ L.

NOTA:

Las muestras derivatizadas tienen una duración de una semana para poder utilizarse.

6. Se recomienda intercalar a lo más 5 muestras con sus respectivos duplicados con una muestra de referencia (estándar de aminoácidos), una muestra de base (medio de cultivo) y una muestra de blanco (agua grado HPLC). Además, es necesario ingresar un par de muestras de aquellos aminoácidos no presentes en la referencia (glutamina).
7. Implementar un "Batch" en el equipo con toda la información sobre las muestras y dejarlo corriendo. La duración por cada muestra es de alrededor de 50 min.

E. Tratamiento de datos

1. Los datos son almacenados como un cromatograma. Guardar estos archivos en formatos compatibles con bloc de notas (.txt, .csv).
2. Cargar los archivos al programa *PeakFit* y utilizar la opción *AutoFit Peaks I: Residuals*. La configuración recomendada es:
 - Línea base lineal entre dos puntos con tolerancia del 3%.
 - Ajuste de LOESS con un suavizado al 1%.
 - Peak de cromatografía con forma de Gauss, con amplitud del 4%, suma de residuos y anchos variables.
3. Guardar los datos de ajuste como .txt y copiar los datos de Tiempo y Área en un archivo Excel.
4. En función del archivo de referencia (final de este protocolo) estimar los tiempos de elución de cada aminoácido de los peaks del estándar. A partir de los tiempos, estimar a qué aminoácido corresponde cada peak en cada muestra.
5. Mediante una proporción simple, relacionar el área de los peaks de cada concentración desconocida (muestras) con la concentración conocida del medio de cultivo inicial.

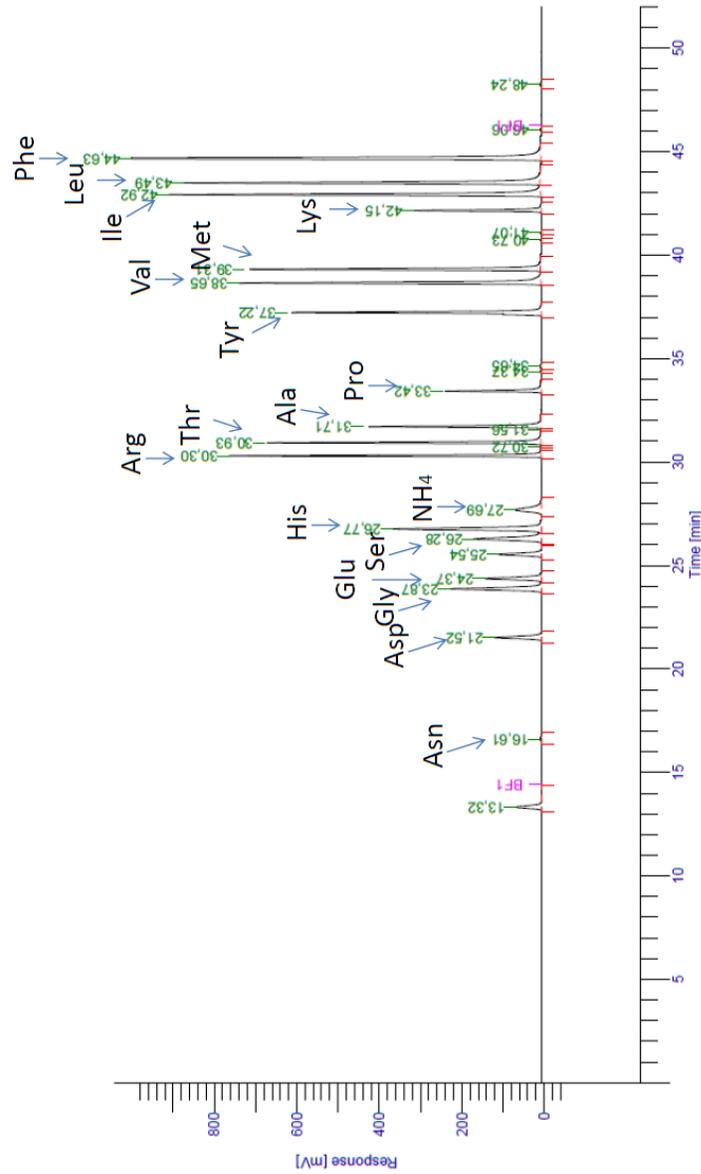


Figura 1: Referencias de tiempos de elución.

Apéndice B

Determinación de concentración de metabolitos

Determinación de concentración de azúcares, lactato, amonio.

Kits y equipo

Se utiliza el equipo Y15 que se encuentra en el Laboratorio de cultivo.

Los kits utilizados para la medición de azúcares, lactato y amonio son:

Nombre	Código	Mide	Método	Marca
D-Glucose/D-Fructose	12800 120 mL	Glucosa Fructosa	Hexoquinasa/ Fosfoglucosa Isomerasa	
Sucrose/D-Glucose/D-Fructose	12819 60m L	Sacarosa Glucosa Fructosa	β -Fructosidasa/ Hexoquinasa/ Fosfoglucosa Isomerasa	
Lactate	12802 2x50 mL	Ácido láctico	L-Lactato Dehidrogenasa	
Ammonia	12809 100 mL	Amoniaco	Glutamato Deshidrogenasa	

Metodología.

- Verificar en cada uno de los protocolos de los kits, el límite de detección en concentración de cada em caso de tener que diluir la muestra.

Metabolito	Límite inferior [g/L]	Límite de linealidad [g/L]
D-Glucosa	0,03	8,00
D-Glucosa/D-Fructosa	0,02	8,00
Sacarosa	0,08	4,00
Sacarosa/D-glucosa/D-Fructosa	0,07	8,00
Lactato	0,02	3,00
Amonio	0,003	0,2

- Preparar los estándares de cada uno de los kit que se van a medir según especifica su protocolo correspondiente.
- Revisar el contenedor de residuos no esté lleno.
- Encender el equipo y poner solución de lavado del equipo, realizando el procedimiento de encendido.
- Una vez finalizado cargar la solución móvil.
- Programar el equipo para la lectura de los metabolitos a medir para cada una de las muestras.
- Una vez finalizado se genera un archivo HTM que puede ser abierto pc Microsoft Excel con los resultados en g/L de cada uno de los metabolitos.

Análisis de datos

- Los resultados obtenidos se ven como en la imagen a continuación, donde cada una de las muestras presentará la técnica utilizada, para cada uno de los metabolitos designados.

Resultados de paciente

18-06-2019 15:40

Muestra	Tipo	Técnica	Conc.	Unidades	Rango Referencia	Fecha
#1	WIN	AMMONIA	11	mg/L		18-06-2019 12:30
#1	WIN	GLUCOSE	0	g/L		18-06-2019 12:30
#1	WIN	L-LACTIC ACID	0,51	g/L		18-06-2019 12:29
#1	WIN	SUCROSE	0,06	g/L		18-06-2019 12:31
#2	WIN	AMMONIA	148	mg/L		18-06-2019 12:36
#2	WIN	GLUCOSE	0	g/L		18-06-2019 12:58
#2	WIN	L-LACTIC ACID	0	g/L		18-06-2019 12:57
#2	WIN	SUCROSE	0,09	g/L		18-06-2019 12:58
#3	WIN	AMMONIA	138	mg/L		18-06-2019 12:59

Figura 1. Ejemplo de resultados obtenidos para las muestra 1 y 2.

- Se reagrupan los datos y junto con el peso molecular de cada uno de los metabolitos es posible obtener la concentración de [mM]. Ejemplo:

$$PM_{Glucosa} = 180 \frac{g}{mol}$$

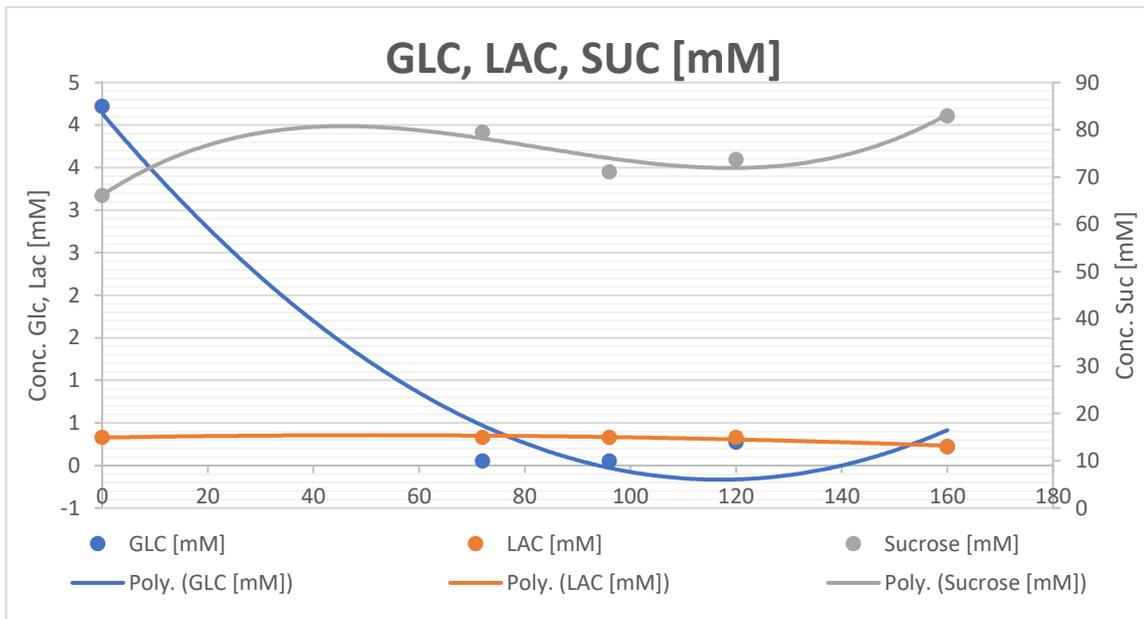
Datos obtenidos:

Tiempo	Glucosa [g/L]	Lactato [g/L]	Sacarosa [g/L]
0	0,760	0,03	22,613
72	0,010	0,03	27,207
96	0,010	0,03	24,324
120	0,050	0,03	25,225
160	0,040	0,02	28,378
200			
	180	90,1	342
	gr/mol	gr/mol	gr/mol

$$\frac{0,760 [g/L]}{180 [g/mol]} = 0,00422 \left[\frac{mol}{L} \right] = 0,00422 [M] \frac{1000 [mM]}{1 [M]} = 4,22 [mM]$$

- Repetiendo para cada uno de los datos se obtiene:

Run time [hr]	Bacetrias [10^6 cell/mL]	GLC [mM]	LAC [mM]	Sucrose [mM]
0	-36,402	4,222	0,333	66,120
72	2698,540	0,056	0,333	79,553
96	2875,426	0,056	0,333	71,123
120	7596,943	0,278	0,333	73,757
160	8644,657	0,222	0,222	82,977



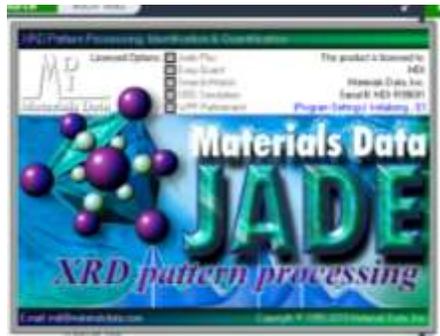
Determinación de concentración de aminoácidos

Equipo e implementos

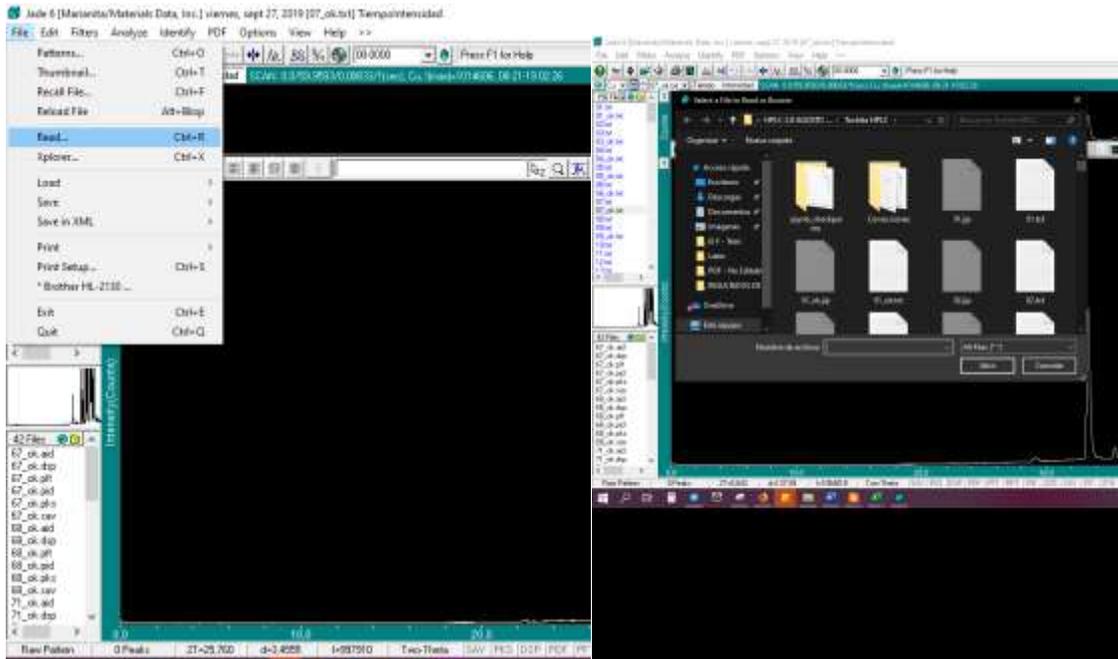
- El equipo utilizado es el HPLC de Shimadzu corporation
- Columna C18 4,6x150mm de PerkinElmer
- Para análisis de datos, software MDI Jade v 6.5

Metodología

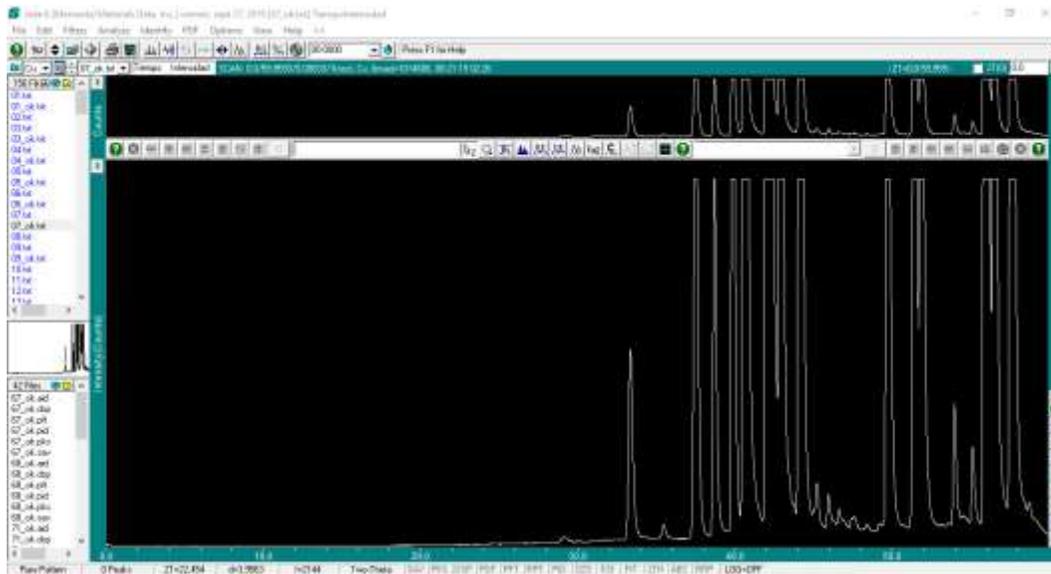
- Luego de correr el equipo HPLC con el protocolo de medición de aminoácidos, se obtiene un archivo ACSII con los datos obtenidos.
- Se abre el programa Jade V 6.5.



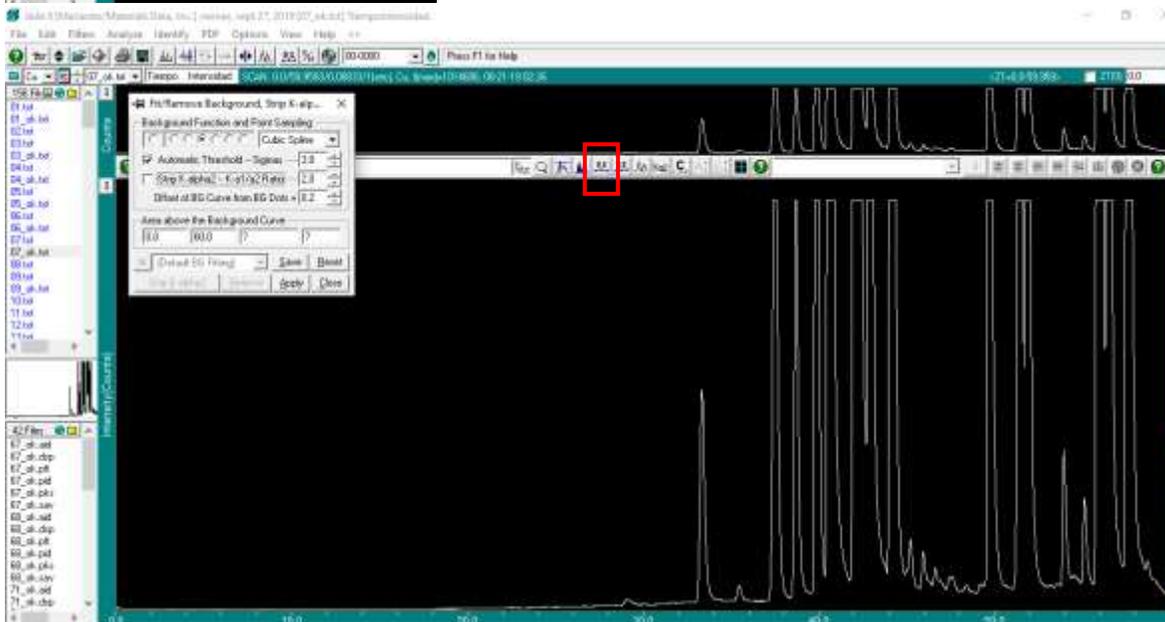
- Al abrir uno busca > File > Read para abrir el archivo deseado

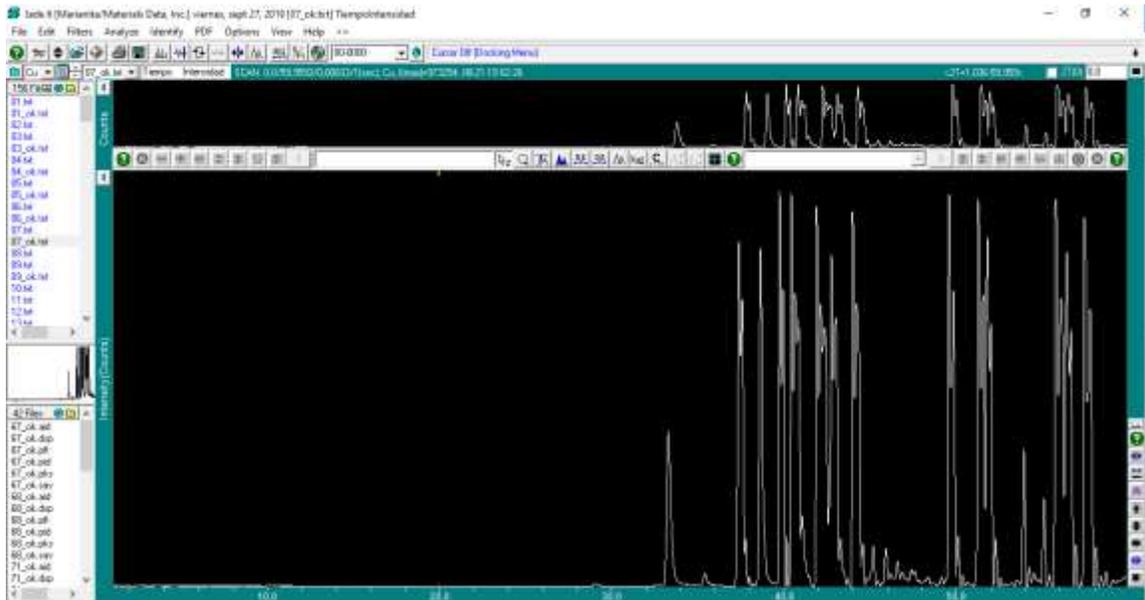
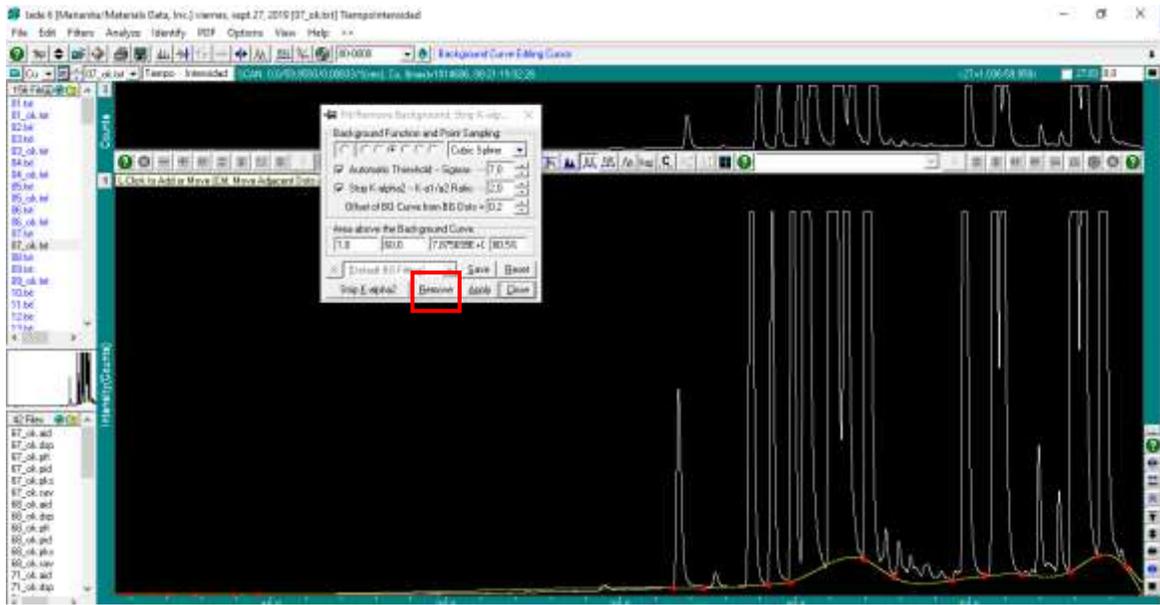


- Abierto el archivo se ven así los datos. Donde inmediatamente se pueden identificar los Peaks.

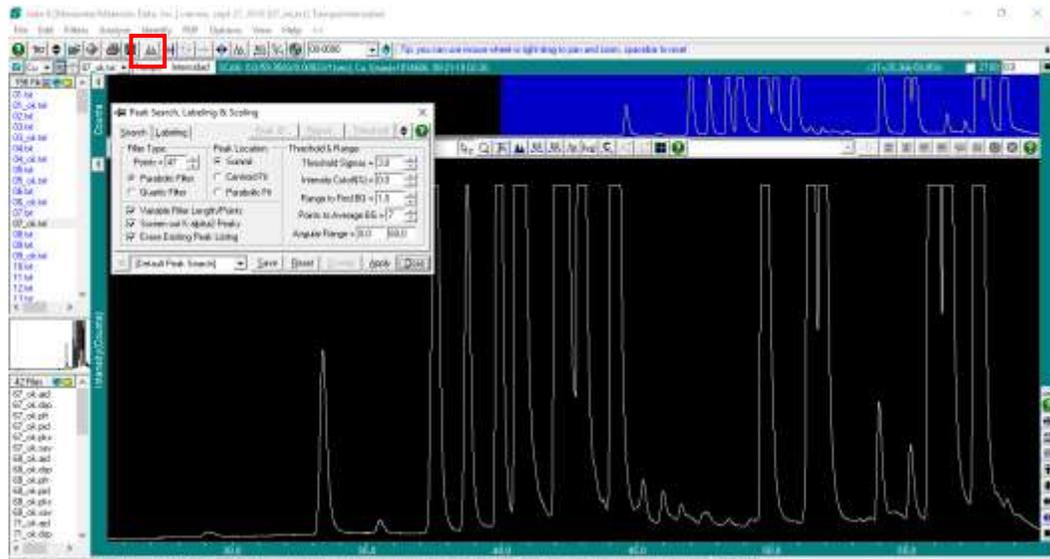


- De ser necesario uno podria generar una BaseLine manualmente eliminando los punto haciendo un ajuste del fondo en >Analyze >Fit Background ó con B.E en el menú de la pantalla principal. Se ajustan el BaseLine con el boton derecho del mouse.y despues eliminarlo.

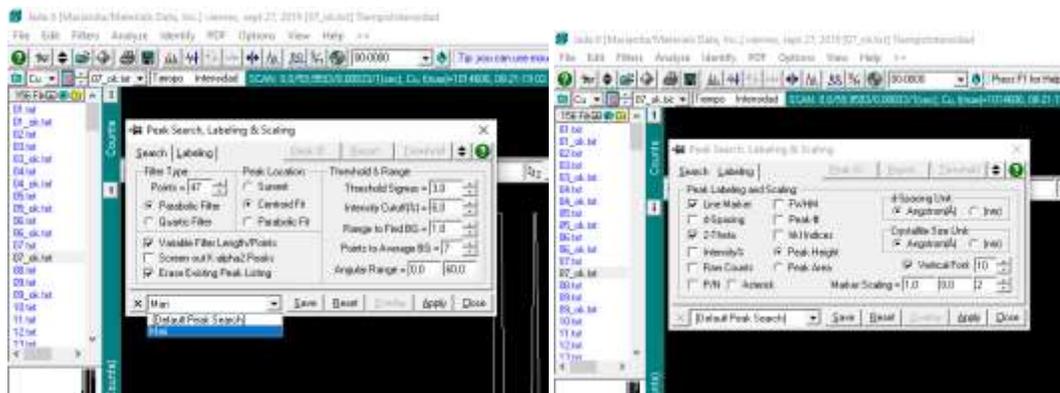




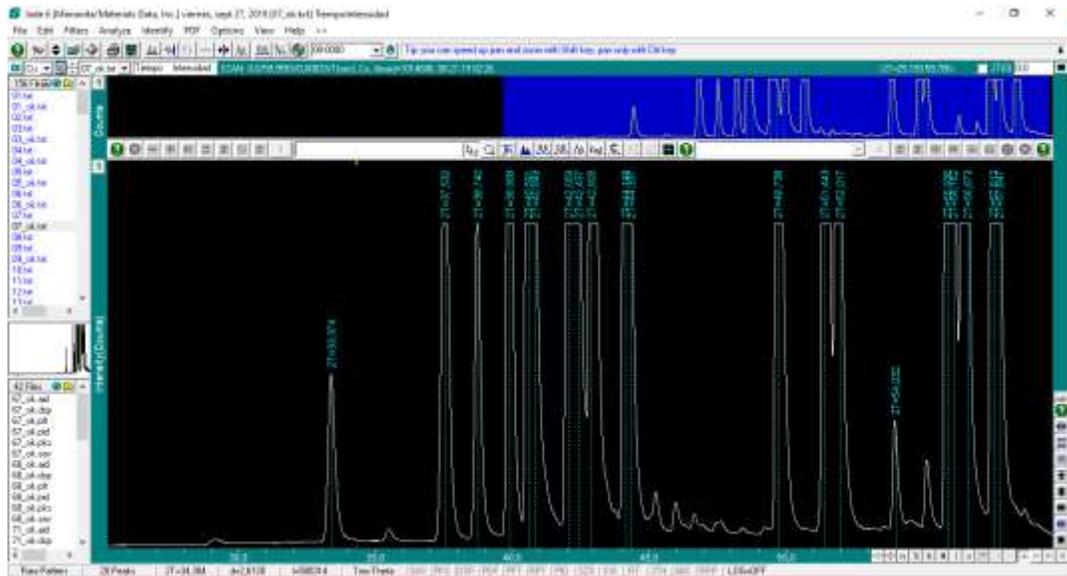
- Esto sirve principalmente para eliminar ruido en caso de existir.
- Otra función útil es la detección de peaks automáticos, donde uno puede configurar la forma de detección preferida y guardarla para que todas las detecciones posteriores sigan los mismos criterios.
- Para abrir esta configuración hacer Click derecho en el botón que se encuentra en el menú principal. 



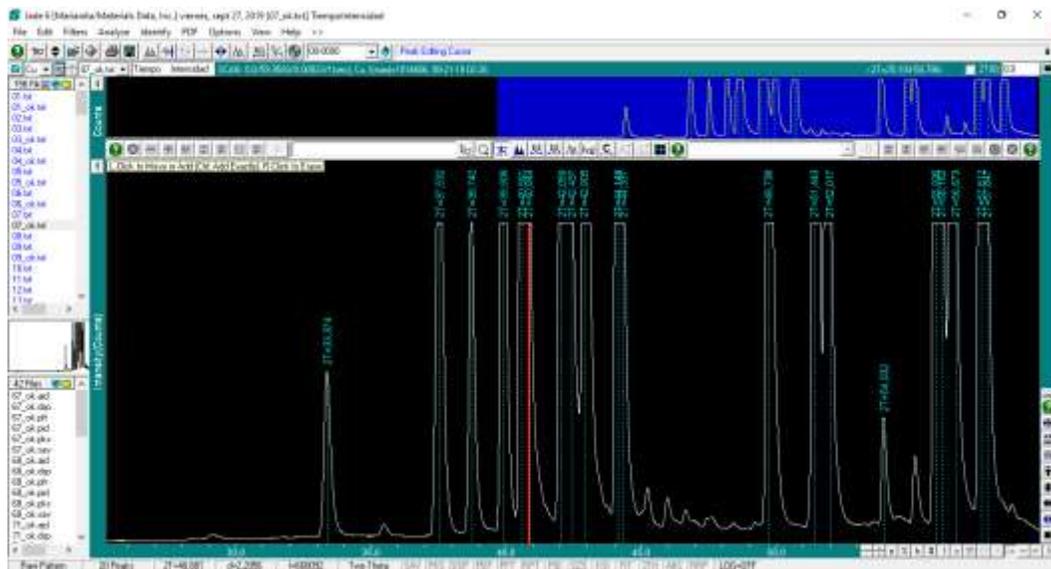
- Se desplegará una ventana donde uno ajusta el tipo de configuración deseada, en este caso se desea que el peak se encuentre en el centro del peaks y la configuración que se muestra a continuación. Ademas en el pestaña “Labeling” uno puede optar por que se meustre el tiempo de cada Peak y el tamaño de letra.



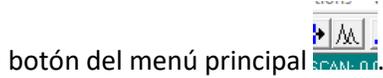
- Una vez aplicadas las configuraciones los datos se verán así.



- Utilizando el botón derecho del mouse uno puede corregir, borrar o agregar peaks que no haya detectado el software.



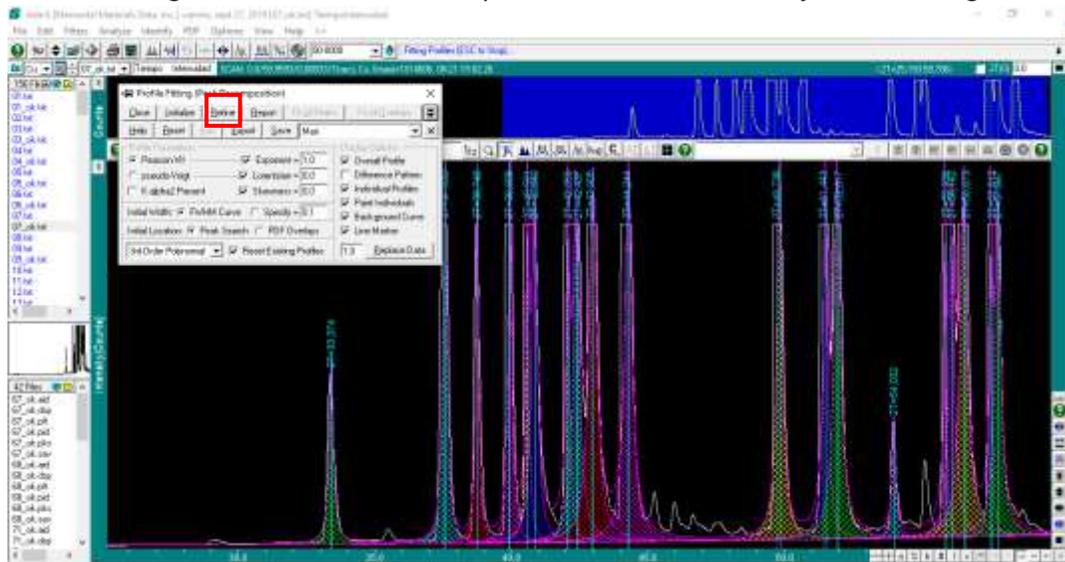
- Para obtener las áreas de las curvas se hace click con el botón derecho del mouse en



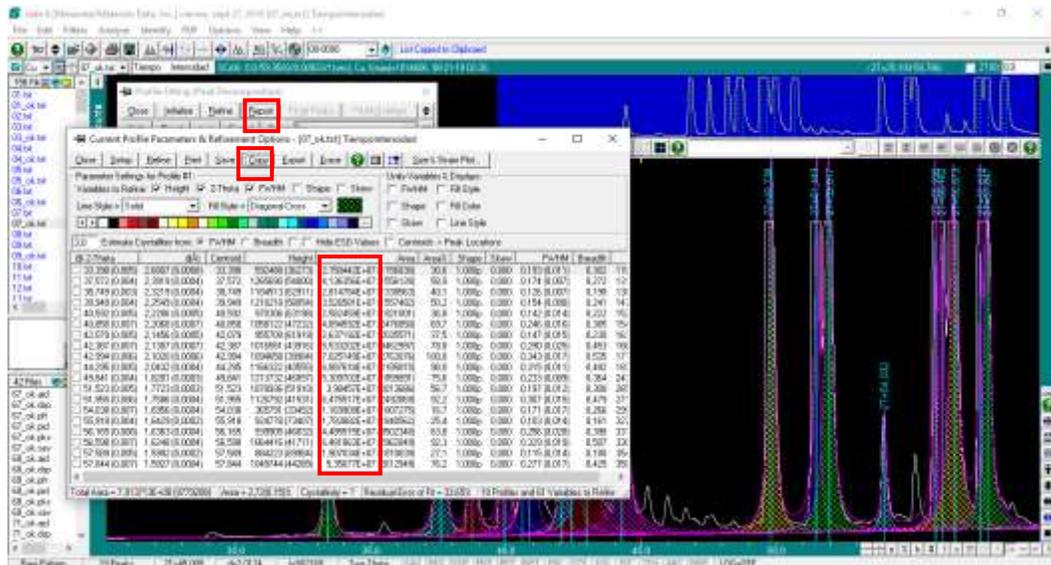
botón del menú principal  .



- Se desplegará una ventana donde uno ajusta el tipo de configuración deseada, en este caso se desea que el ajuste de fitting tenga la configuración mostrada.
- Una vez configurado se coloca “Refine” y el software comenzara a ajustar el Fitting.



- Finalizado el Fitting, uno puede pedir el reporte, que muestra el área y otros datos de nuestras curvas, la columna que nos importa es “AREA” y “Theta” que equivale a los tiempos con el número que se encuentra fuera del paréntesis. Uno aprieta el botón copiar y puede exportar estos datos a un Excel por ejemplo para tratar los datos.

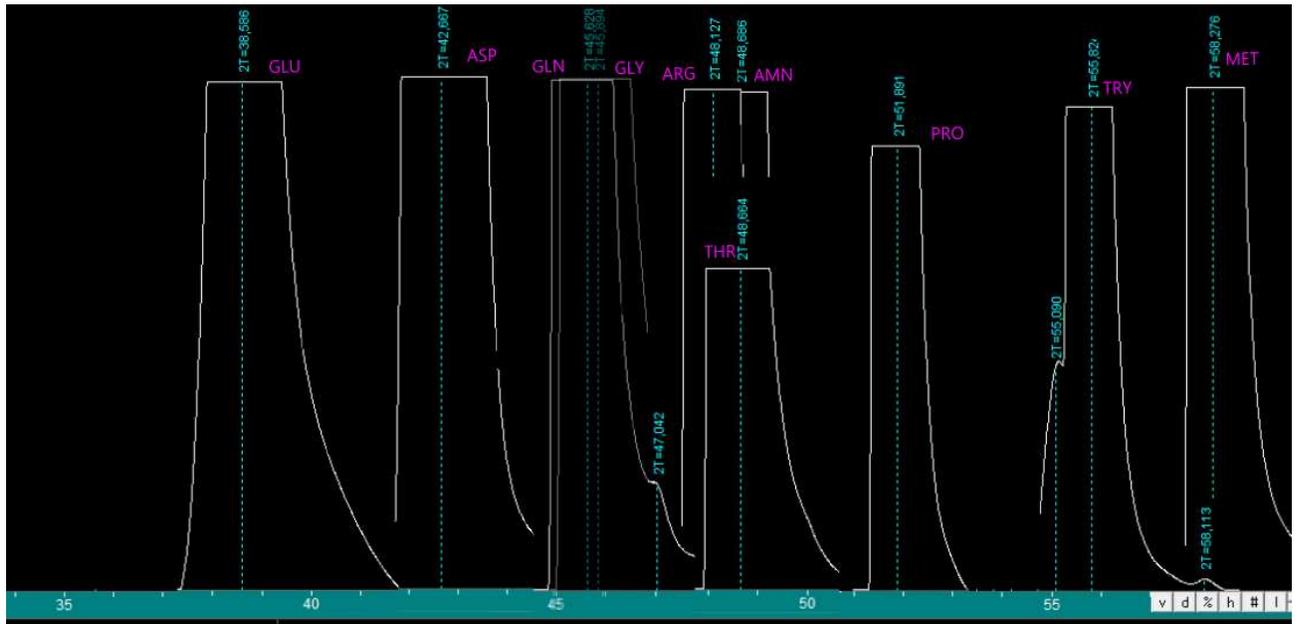


Construcción de detección de aminoácidos.

- Con el fin de poder realizar un protocolo de obtención de aminoácidos se prepararon diferentes muestras para observar su tiempo de elución.

Aminoácido utilizado	Siglas	Tiempo Elución
Ac. Glutámico	GLU	38,58
Ac. Aspártico	ASP	42,66
Glutamina	GLN	45,62
Glicina	GLY	45,89
Arginina	ARG	48,12
Treonina	THR	48,66
Amonio	AMN	48,68
Prolina	PRO	51,89
Triptófano	TRY	55,82
Metionina	MET	58,27

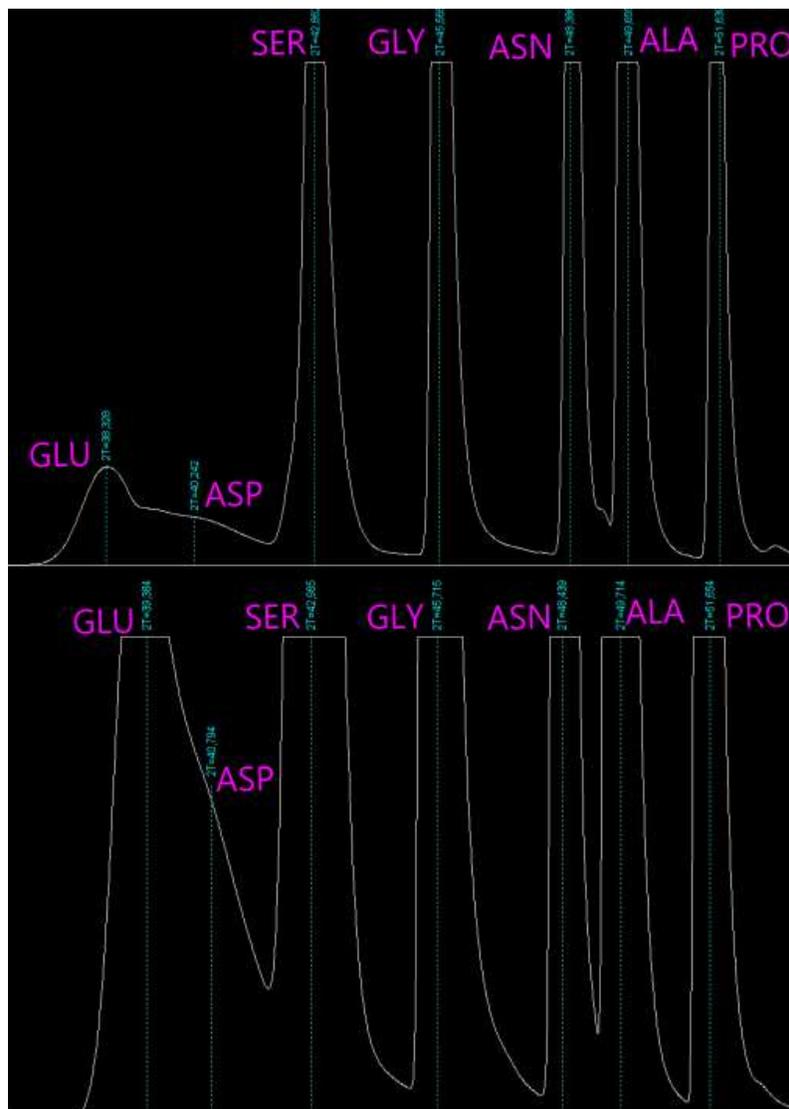
La imagen de todos los tiempos de elución se muestran a continuación:



- Por otro lado, se utilizó una mezcla de aminoácidos no esenciales “Non-Essential Amino Acid (NEAA) Cell Culture Supplement - Cyagen, Catalog Number: NEAA-10201-100”. Que posee los siguientes aminoácidos:

Aminoácidos	Sigla	Tiempo elución
Glicina	GLY	45,56
Alanina	ALA	49,65
Asparragina	ASN	48,38
Ác. aspártico	ASP	40,24
Ác. Glutámico	GLU	38,32
Prolina	PRO	51,63
Serina	SER	42,86

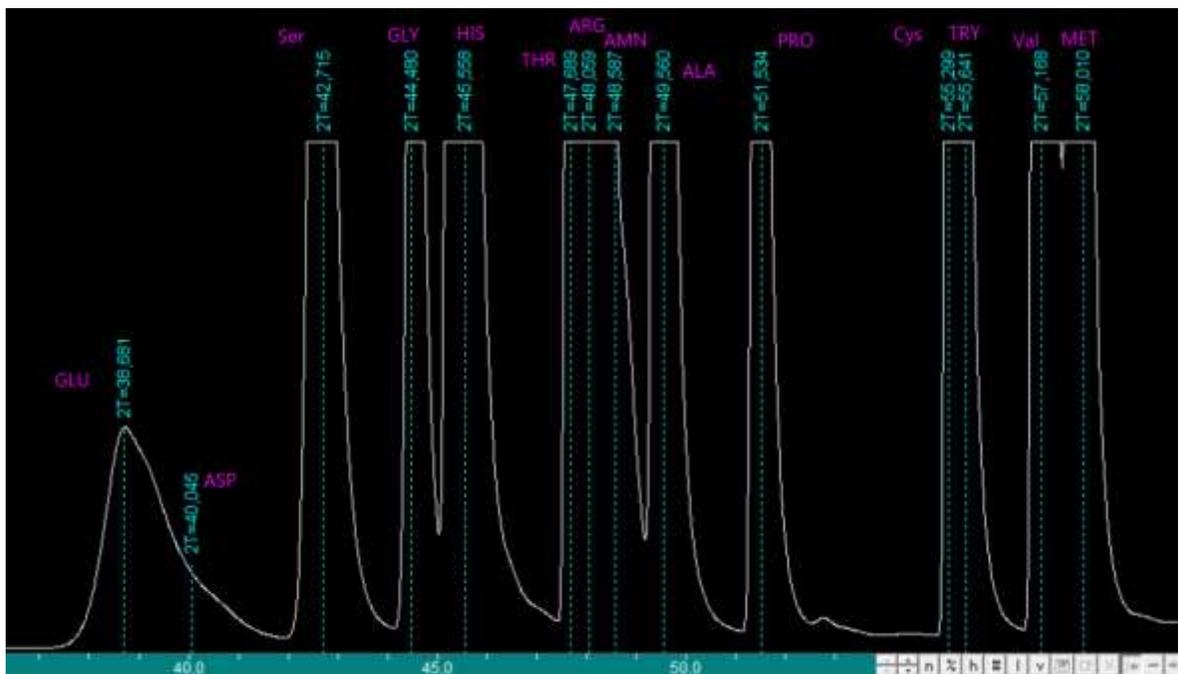
- El kit poseía una concentraciones 100x pero las mediciones fueron hechas en 10X y 1X. Las imágenes e muestran a continuación:



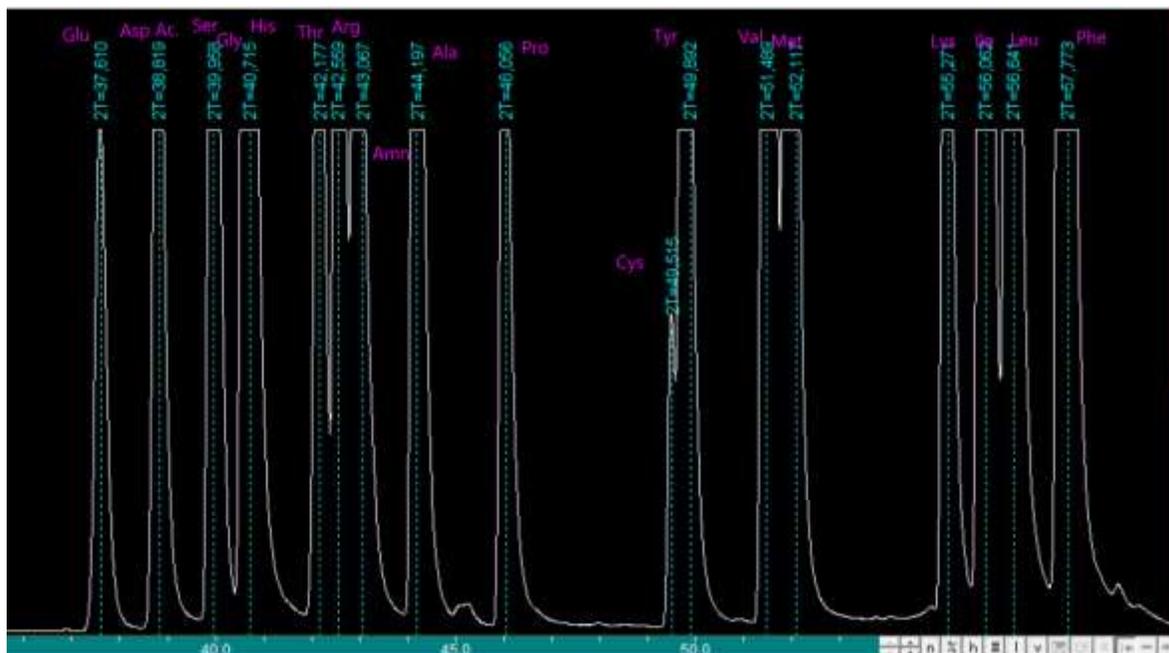
- Reconstruida esas eluciones solo queda determinar el resto de los aminoácidos, para ello se utilizó "AMINO ACID STANDARD SOLUTION for calibrating amino acid analyzers, Sigma Aldrich Stock No. AA-S-18" Se realizó en

Aminoácidos	Sigla	Tiempo elución
Alanina	ALA	49,56
Amonio	AMN	48,58
Arginina	ARG	48,05
Ác. Aspártico	ASP	40,04
Cisteína	CYS	55,29
Ac. Glutámico	GLU	38,68
Histidina	HIS	45,55
Isoleucina	ILE	
Leucina	LEU	
Lisina	LY	
Metionina	MET	58,01
Fenilalanina	PHE	
Prolina	PRO	51,53
Serina	SER	42,71
Treonina	THR	47,68
Tirosina	TRY	55,64
Valina	VAL	57,16

- A continuación, un grafico de los resultados obtenidos con el estándar.



En otra corrida se obtuvo los aminoácidos restantes, cabe destacar que todos los peaks en esta fase están desplazados hacia la izquierda en tiempo.



Quedando los tiempos de elución como:

Aminoácido /Metabolito	Sigla	Tiempos desplazados a la izquierda	Tiempos Desplazados a la derecha
Glutamato	Glu	33,783	38,42
Aspartato	Asp	37,91	39,44
Serina	Ser	38,985	42,53
**Glutamina	Gln	40,101	42,84
Glicina	Gly	40,345	44,59
Histidina	His	41,004	45,51
Treonina	Thr	42,3	47,72
Arginina	Arg	42,666	47,96
Asparragina	Asn	43,07	48,30
Amonio	AMN	43,46	48,56
Alanina	Ala	44,35	49,55
Prolina	Pro	46,24	51,52
Cisteina	Cys	49,732	54,72
Trionina	Try	50,053	55,51
Valina	Val	51,736	57,24
Metionina	Met	52,225	57,93
Lisina	Lys	55,495	
Isoleucina	Ile	56,266	
Leucina	Leu	56,835	
Fenialalanina	Phe	58,01	

- ** Para determinar el momento en que se obtenía el peak de Glutamina, fue necesario analizar y comparar con resultados de medios de cultivo que tuvieran este aminoácido.

Determinación de tasas de consumo específico.

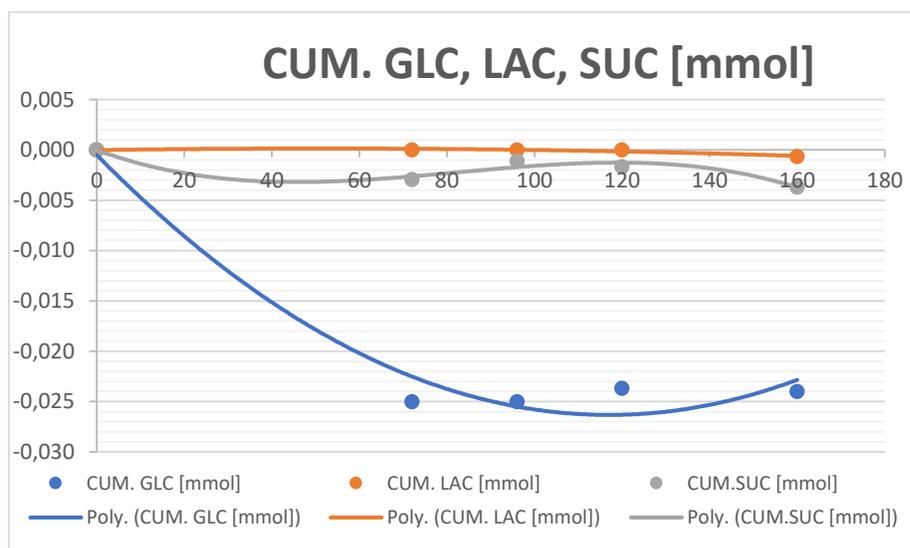
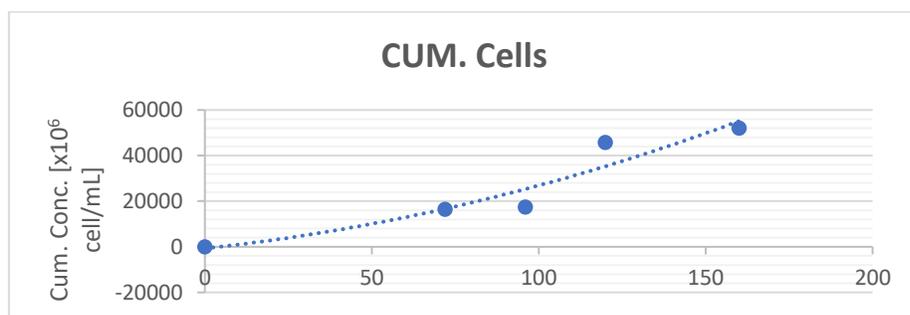
- Con los datos obtenidos anteriormente es posible obtener las tasas de consumo específicas para cada metabolito ya sea consumo/producción de azúcares o aminoácidos.
- Si se tiene los datos de la cantidad de Células [$\times 10^6/\text{mL}$] y de cuantos mL se obtuvieron los datos, se pueden obtener los valores acumulativos para cada uno de los metabolitos, esto es:

$$0 \text{ [mmol]} + \left(\frac{6 \text{ mL}}{1000}\right) * (0,056 - 4,22) \text{ [mM]} =$$

$$(0,006 \text{ L}) * (0,056 - 4,22) \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right] = -0,025 \text{ [mmol]}$$

V [mL]	Run time [hr]	Bacterias [10^6 cell/mL]	GLC [mM]	LAC [mM]	Sucrose [mM]	CUM. CELLS [10^6 cells]	CUM. GLC [mmol]	CUM. LAC [mmol]	CUM. SUC [mmol]
6	0	-36,402	4,222	0,333	66,120	0,000	0,000	0,000	0,000
	72	2638,540	0,056	0,333	73,553	16409,6519	$1000 * (E4-E3)$	0,000	-0,003
	96	2875,426	0,056	0,333	71,123	17470,9727	-0,025	0,000	-0,001
	120	7596,343	0,278	0,333	73,757	45800,0733	-0,024	0,000	-0,002
	160	8644,657	0,222	0,222	82,977	52086,3578	-0,024	-0,001	-0,004
	200	6059,389	-	-	-	36574,7466	-	-	-

- Se repite para cada uno de los puntos obteniendo las curvas como se muestran a continuación:



- Una vez obtenidas las curvas acumulativas uno puede obtener los parámetros de dichas curvas con la función Linest de Excel. La derivada de dichos parámetros serán las pendientes de cada una de las curvas, si se normaliza por la cantidad de células se obtiene el consumo por unidad de célula.

	cx ²	bx	a
CUM. CELLS	-1,01,E+00	4,40,E+02	-3,62,E+03
CUM. GLC	1,89,E-06	-4,41,E-04	-5,07,E-04
CUM. LAC	-6,23,E-08	6,36,E-06	-2,50,E-05
CUM. SUC	-1,14,E-08	-1,68,E-05	-2,43,E-04

$$q_{glc} \left[\frac{mmol}{10^9 cells \cdot hr} \right]$$

$$\mu [h^{-1}]_{t_0} = \frac{2 * c * t_0 + b}{BM_{t_0}}$$

$$[q_{glc}]_{t_0} = \frac{2 * c * t_0 + b}{BM_{t_0}}$$

- Se repite para cada uno d ellos puntos obteniendo:

$\mu [hr^{-1}]$	q_{glc} [mmol/10 ⁹ cells/ hr]	q_{lac} [mmol/10 ⁹ cells/ hr]	q_{suc} [mmol/10 ⁹ cells/ hr]
-2,01,E+03	2,02,E-03	-2,31,E-05	7,71,E-05
1,82,E+01	-1,05,E-05	-1,61,E-07	-1,14,E-06
1,43,E+01	-4,53,E-06	-3,25,E-07	-1,10,E-06
4,35,E+00	2,50,E-07	-1,83,E-07	-4,23,E-07
2,27,E+00	3,13,E-06	-2,62,E-07	-3,35,E-07
1,03,E+00	8,62,E-06	-5,11,E-07	-5,83,E-07

- Si nuevamente se obtiene la función de las curvas se tendrá una función que determina la razón de consumo de cada célula, evaluable en el tiempo.

	cx ²	bx	a
$\mu [hr^{-1}]$	-1,08,E-01	3,04,E+01	-1,92,E+03
q_{glc}	1,08,E-07	-3,05,E-05	1,93,E-03
q_{lac}	-1,54,E-03	4,35,E-07	-2,78,E-05
q_{SUC}	4,14,E-03	-1,17,E-06	7,35,E-05

- Por lo tanto, si se quiere obtener el consumo específico de glucosa en el tiempo 100 hrs, bastará con:

$$-1,08x10^{-1} * (100)^2 + 3,04x10 * (100) - 1,92x10^3 = 4,50x10^1 [h^{-1}]$$

- Así se repite para cada uno de los consumos/producción de metabolitos o biomasa.

Apéndice C

Metodología para determinación de concentración de glucosa/sacarosa

COD 12819 60 mL
Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio

**SUCROSE/D-GLUCOSE/
D-FRUCTOSE**



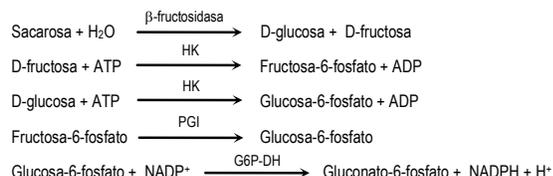
SACAROSA/D-GLUCOSA/D-FRUCTOSA
β-FRUCTOSIDASA / HEXOQUINASA / FOSFOGLUCOSA ISOMERASA

USO PREVISTO

Reactivo para la medición de D-glucosa, D-fructosa y/o sacarosa en diversos tipos de muestra.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sacarosa, la D-fructosa y la D-glucosa presentes en la muestra generan, mediante la reacción descrita, NADPH que puede ser medido por espectrofotometría. La configuración de estos reactivos permite la determinación de sacarosa o de sacarosa + D-glucosa + D-fructosa.



CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

A1. Reactivo. 1 x 40 mL. PIPES 70 mmol/L, NADP⁺ 1,2 mmol/L, hexoquinasa > 15 KU/L, fosfoglucoisomerasa > 10 KU/L, pH 7,0.

A2. Reactivo. 1 x 10 mL. ATP > 15 mmol/L, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa > 10 KU/L, pH 9,0.

B. Reactivo. 1 x 10 mL. Tampón 100 mmol/L, β-fructosidasa > 1 KU/mL, pH 4,8.

ATENCIÓN: H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

S. Patrón multiazúcar: 1 x 5 mL. Los valores de concentración asignados para cada componente y su trazabilidad se muestran en las tablas adjuntas (Nota 1).

ATENCIÓN: H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro: Absorbancia del blanco superior al límite indicado en "Parámetros de la prueba".

EQUIPO ADICIONAL

Analizador, espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 340 nm.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo A: vaciar el contenido del Reactivo A2 en la botella del Reactivo A1. Agitar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 4 mL de Reactivo A1 + 1 mL de Reactivo A2. Estable 6 meses a 2-8°C.

El reactivo B está listo para su uso.

El Patrón está listo para su uso.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual (Notas 2, 3, 4 y 5)

1. Precalentar los reactivos y el fotómetro a 37°C.

2. Pipetear en una cubeta:

	Blanco de reactivo (RB)	Patrón / Muestra
Patrón / Muestra (ST1)	-	12 µL
Agua destilada	12 µL	-
Reactivo A	1000 µL	1000 µL

3. En caso de determinar sacarosa, mezclar e incubar durante 5 minutos a 37°C. Leer la absorbancia (A1) a 340 nm. En caso de determinar sacarosa+D-glucosa+D-fructosa, mezclar e incubar durante 1 minuto. No es necesario leer la absorbancia.

4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo B	200 µL	200 µL
------------	--------	--------

5. En caso de determinar sacarosa, mezclar e incubar durante 5 minutos a 37°C. En caso de determinar sacarosa+D-glucosa+D-fructosa, mezclar e incubar durante 10 minutos a 37°C. Leer la absorbancia (A2) del blanco de reactivo, del patrón y de la muestra a 340 nm. El color es estable durante al menos 30 minutos.

6. Calcular la concentración de sacarosa o sacarosa+D-glucosa+D-fructosa usando las siguientes fórmulas:

$$\frac{(A2 - 0,84 \times A1)_{\text{Muestra}} - (A2 - 0,84 \times A1)_{\text{RB}}}{(A2 - 0,84 \times A1)_{\text{Patrón}} - (A2 - 0,84 \times A1)_{\text{RB}}} \times C_{\text{Patrón (Sacarosa)}} [\text{g/L}] = C_{\text{Muestra (Sacarosa)}} [\text{g/L}]$$

$$\frac{(A2)_{\text{muestra}} - (A2)_{\text{RB}}}{(A2)_{\text{patrón}} - (A2)_{\text{RB}}} \times C_{\text{Patrón (sacarosa+D-glucosa+D-fructosa)}} [\text{g/L}] = C_{\text{Muestra (sacarosa+D-glucosa+D-fructosa)}} [\text{g/L}]$$

CALIBRACIÓN

Debe realizarse un blanco de reactivo cada día y calibrar después de un cambio de lote de reactivo o cuando lo requieran los procedimientos de control de calidad.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de control de calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los resultados de los controles no se encuentren entre los límites de aceptación.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS¹⁻³

Las características metrológicas descritas se han obtenido utilizando un analizador Y15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

– Límite de detección: Sacarosa: 0,08 g/L ; Sacarosa+D-glucosa+D-fructosa: 0,07 g/L.

– Límite de linealidad: Sacarosa: 4,00 g/L ; Sacarosa+D-glucosa+D-fructosa: 8,00 g/L.

– Precisión:

Concentración media de sacarosa	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
0,50 g/L	2,8 %	3,1 %
1,80 g/L	2,5 %	2,6 %

Concentración media de sacarosa+D-glucosa+D-fructosa	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
1,04 g/L	1,4 %	2,4 %
4,10 g/L	0,7 %	2,8 %

– Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con un procedimiento de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

NOTAS

1. La concentración de sacarosa+D-glucosa+D-fructosa se expresa como g/L de glucosa o fructosa.

2. Aunque se recomienda la calibración de cada serie de medidas usando el patrón, también puede calcularse la concentración de sacarosa o sacarosa+D-glucosa+D-fructosa en la muestra usando el siguiente cálculo:

$$(A2 - 0,84 \times A1)_{\text{Muestra}} - (A2 - 0,84 \times A1)_{\text{RB}} \times 5,49 = C_{\text{sacarosa}} [\text{g/L}]$$

$$(A2)_{\text{Muestra}} - (A2)_{\text{RB}} \times 2,88 = C_{\text{sacarosa+D-glucosa+D-fructosa}} [\text{g/L}]$$

3. Los volúmenes propuestos son para el uso de una cubeta semi-micro. Puede utilizarse otros volúmenes si se mantiene la relación entre los reactivos y la muestra.

4. El procedimiento y los parámetros de la prueba pueden variar el función del tipo de muestra (Sample Type: ST).

5. Al analizar muestras sólidas y semisólidas que se pesan para su preparación, el contenido (g/100 g) (CT) se calcula a partir de la cantidad de muestra pesada (W), el volumen en el que se prepara muestra pesada (V), la concentración obtenida en la muestra (C) y el factor de dilución (df) si es necesario, según se describe a continuación:

$$\frac{C_{\text{Muestra}} (\text{g/L}) \times V (\text{L})}{W_{\text{Muestra}} (\text{g})} \times 100 \times \text{df} = C_{\text{T Muestra}} [\text{g}/100 \text{ g}]$$

BIBLIOGRAFÍA

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of precision of quantitative measurement methods; Approved guideline – Third edition. EP5-A3. Wayne: USA 2004.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; Approved guideline – Second edition. EP17-A2. Wayne: USA 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; Approved guideline – Third edition. EP6-A. Wayne: USA 2003.
- International organization of vine and wine (OIV), Compendium of international methods of wine and must analysis Vol. 1 & 2, 2016.
- Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, Wine analysis and production. Van Nostrand Reinhold; 1 edition (December 31, 1990).
- EBC Analysis Comitee. Analytica-EBC. Verlag Hans Carl; 7th edition (2010).
- A.O.A.C 17th Ed., 2000 Official method 920.180 Honey (liquid, strained or comb), preparation of test sample.

MUESTRAS

Procedimientos de preparación

- Filtrar o centrifugar las soluciones turbias.
- Desgasificar las muestras con dióxido de carbono en un baño de ultrasonidos o agitar la muestra en un vaso de precipitados durante aproximadamente 1 minuto.
- Decolorar las muestras muy coloreadas con polyvinylpyrrolidone (PVPP) (e.g. 1 g PVPP/100 mL muestra), agitar durante 1 minuto y filtrar o centrifugar para eliminar el PVPP.
- Muestras con concentraciones superiores al límite de linealidad especificado deben ser diluidas adecuadamente con agua destilada. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.
- Triturar y/o homogenizar muestras sólidas.
- Clarificar y/o desproteinizar con reactivo Carrez (BioSystems ref. 12837) adicionando 5 mL de Carrez-I y 5 mL de Carrez-II al extracto líquido de la muestra en un matraz aforado de 100 mL. Ajustar a pH 7.5 - 8.5 con hidróxido de sodio. Mezclar después de cada adición, adicionar agua destilada hasta la marca del matraz y filtrar.
- Extraer las muestras que contengan grasa con agua caliente a una temperatura por encima del punto de fusión de la grasa. Dejar reposar a temperatura ambiente y llenar el matraz hasta la marca con agua destilada. Almacenar en hielo o en el refrigerador durante 15-30 minutos y luego filtrar. Utilice el sobrenadante transparente o ligeramente opalescente para el ensayo. También es posible clarificar con reactivo Carrez.

Zumos de frutas y bebidas similares (ST1): Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el zumo si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Vino tinto y blanco^{4,5} (ST1): Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el vino si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Se recomienda utilizar el Vino Control (Tinto) (BioSystems ref. 12822) y Vino Control (Blanco) (BioSystems ref. 12821) para verificar el funcionamiento del procedimiento de medida.

Cerveza⁶ (ST1): Desgasificar como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Conservas y otros productos derivados de frutas y verduras (ST1): Pesar con precisión aproximadamente 0,5 g de la muestra homogenizada en un matraz aforado de 100 mL y llenarlo hasta la marca con agua destilada, mezclar y filtrar. Diluir la muestra si es necesario.

Postres y helados (ST1): Pesar con precisión aproximadamente 3 g de muestra en un matraz aforado de 100 mL. Añadir 60 mL de agua e incubar durante 15 minutos a aproximadamente 70°C agitando de vez en cuando. Dejar reposar a temperatura ambiente, llenar hasta la marca con agua, mezclar y filtrar. Clarificar y/o diluir la muestra si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Alimentos sólidos (ST1): Triturar y/o homogenizar las muestras sólidas. Pesar una muestra representativa, extraer con agua (calentar a 60°C, si es necesario) y filtrar. Clarificar y/o diluir la muestra si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Miel⁷ (ST1): Para muestras viscosas o cristalizadas, transferir de 5 a 10 g de miel a un vaso de precipitados y calentar durante 5 minutos a aproximadamente 60°C (no es necesario calentar la miel líquida), agitando con la espátula. Dejar enfriar. Pesar con precisión 3 g de la muestra líquida y disolver con 60 mL de agua en un matraz aforado de 100 mL. A continuación, llenar hasta la marca y mezclar. Preparar una dilución 1/10 de la solución de miel al 3%.

Muestras de fermentación y medios de cultivo celular (ST1): Centrifugar la muestra a 5000 g durante 5 minutos, filtrar el sobrenadante y utilizar el filtrado en el ensayo, diluido si es necesario. Se recomienda inactivar las reacciones enzimáticas poniendo la muestra en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos. También es posible desproteinizar la muestra como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Otras aplicaciones: El método también se puede usar con otros tipos de muestras. Póngase en contacto con su proveedor para obtener más información.

PARÁMETROS DE LA PRUEBA (Notas 4 y 5)

Estos reactivos pueden utilizarse también en otros analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.

BioSystems Y15

Reactivo 1: Utilizar el Reactivo A.

Reactivo 2: Utilizar el Reactivo B.

GENERAL	Técnica	SUCROSE	SUC+D-GLU+D-FRU
	Modo de análisis	diferencial bireactivo	punto final bireactivo
	Tipo de muestra	ST1	ST1
	Unidades	g/L	g/L
	Tipo de reacción	creciente	creciente
	Decimales	2	2
PROCEDIMIENTO			
	Lectura	monocromática	monocromática
	Muestra	3	3
	Reactivo 1	250	250
	Reactivo 2	50	50
	Lavado	1,2	1,2
	Factor predilución	-	-
	Filtro Principal	340	340
	Filtro Referencia	-	-
	Lectura 1	312 s	600 s
	Lectura 2	600 s	-
	Reactivo 2	336 s	72 s
CALIBRACIÓN			
	Tipo de calibración	múltiple	múltiple
	Curva de calibración	-	-
OPCIONES			
	Límite absorbancia blanco	0,300	0,300
	Límite blanco cinético	-	-
	Límite de linealidad	4,00	8,00

BioSystems Y25

Reactivo 1: Utilizar el Reactivo A.

Reactivo 2: Utilizar el Reactivo B.

GENERAL	Técnica	SUCROSE	SUC+D-GLU+D-FRU
	Modo de análisis	diferencial bireactivo	punto final bireactivo
	Tipo de muestra	ST1	ST1
	Unidades	g/L	g/L
	Tipo de reacción	creciente	creciente
	Decimales	2	2
PROCEDIMIENTO			
	Lectura	monocromática	monocromática
	Muestra	3	3
	Reactivo 1	250	250
	Reactivo 2	50	50
	Lavado	1,2	1,2
	Factor predilución	-	-
	Filtro Principal	340	340
	Filtro Referencia	-	-
	Lectura 1	300 s	600 s
	Lectura 2	600 s	-
	Reactivo 2	330 s	75 s
CALIBRACIÓN			
	Tipo de calibración	múltiple	múltiple
	Curva de calibración	-	-
OPCIONES			
	Límite absorbancia blanco	0,300	0,300
	Límite blanco cinético	-	-
	Límite de linealidad	4,00	8,00

Apéndice D

Metodología para determinación de concentración de amonio

COD 12809 100 mL
Sólo para uso in vitro en el laboratorio

AMMONIA



AMONIACO GLUTAMATO DESHIDROGENASA

USO PREVISTO

Reactivo para la medición de amoníaco en diversos tipos de muestra.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El amoníaco presente en la muestra consume, según la reacción descrita a continuación, NADH que se cuantifica espectrofotométricamente.



CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Reactivo. 2 x 40 mL. Tetraborato de sodio 5 mmol/L, NADH 0,5 mmol/L, conservantes, pH 9,5.
- B. Reactivo. 1 x 20 mL. Hepes 400 mmol/L, 2-oxoglutarato 22 mmol/L, glutamato deshidrogenasa > 140 U/mL, etilenglicol 0,2 L/L, conservantes, pH 8,0.
- S. Patrón amoníaco. 1 x 5 mL. Amoníaco 150 mg/L. Patrón primario acuoso.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro: Absorbancia del blanco inferior al límite indicado en "Parámetros de la prueba".

EQUIPO ADICIONAL

Analizador, espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 340 nm.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos y el patrón están listos para su uso.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual (Notas 1, 2 y 3)

1. Precalentar los reactivos y el fotómetro a 37°C.
2. Pipetear en una cubeta:

	Blanco de reactivo (RB)	Patrón / Muestra
Patrón / Muestra	-	20 µL
Agua destilada	20 µL	-
Reactivo A	800 µL	800 µL

3. Mezclar e incubar durante 1 minuto a 37°C. Leer la absorbancia (A1) a 340 nm.
4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo B	200 µL	200 µL

5. Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37°C. Leer la absorbancia (A2) del blanco de reactivo, del patrón y de la muestra a 340 nm.
6. Calcular la concentración en la muestra (C) usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(0,80 \times A1 - A2)_{\text{Muestra}} - (0,80 \times A1 - A2)_{\text{RB}}}{(0,80 \times A1 - A2)_{\text{Patrón}} - (0,80 \times A1 - A2)_{\text{RB}}} \times C_{\text{Patrón}} [\text{mg/L}] = C_{\text{Muestra}} [\text{mg/L}]$$

CALIBRACIÓN

Debe realizarse un blanco de reactivo cada día y calibrar después de un cambio de lote de reactivo o cuando lo requieran los procedimientos de control de calidad.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de control de calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los resultados de los controles no se encuentren entre los límites de aceptación.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS^{1,3}

Las características metrológicas descritas se han obtenido utilizando un analizador Y15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

- Límite de detección: 3 mg/L.
- Límite de linealidad: 200 mg/L.
- Precisión:

Concentración media	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
50 mg/L	1,3 %	4,6 %
150 mg/L	1,2 %	1,6 %

- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con un procedimiento de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

NOTAS

1. Aunque se recomienda la calibración de cada serie de medidas usando el patrón, también puede calcularse la concentración de amoníaco en la muestra usando el siguiente factor:

$$[(0,80 \times A1 - A2)_{\text{Muestra}} - (0,80 \times A1 - A2)_{\text{RB}}] \times 137,8 = \text{mg/L}$$

2. Los volúmenes propuestos son para el uso de una cubeta semi-micro. Puede utilizarse otros volúmenes si se mantiene la relación entre los reactivos y la muestra.
3. Al analizar muestras sólidas y semisólidas que se pesan para su preparación, el contenido (mg/Kg) (CT) se calcula a partir de la cantidad de muestra pesada (W), el volumen en el que se prepara muestra pesada (V), la concentración obtenida en la muestra (C) y el factor de dilución (df) si es necesario, según se describe a continuación:

$$\frac{C_{\text{Muestra}} (\text{mg/L}) \times V (\text{L})}{W_{\text{Muestra}} (\text{g})} \times \text{df} = \text{CT}_{\text{Muestra}} [\text{mg/Kg}]$$

BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of precision of quantitative measurement methods; Approved guideline – Third edition. EP5-A3. Wayne: USA 2004.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; Approved guideline – Second edition. EP17-A2. Wayne: USA 2012.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; Approved guideline – Third edition. EP6-A. Wayne: USA 2003.
4. International organization of vine and wine (OIV), Compendium of international methods of wine and must analysis Vol. 1 & 2, 2010.
5. Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, Wine analysis and production. Van Nostrand Reinhold; 1 edition (December 31, 1990).

MUESTRAS

Procedimientos de preparación

- Filtrar o centrifugar las soluciones turbias.
- Desgasificar las muestras con dióxido de carbono en un baño de ultrasonidos o agitar la muestra en un vaso de precipitados durante aproximadamente 1 minuto.
- Decolorar las muestras muy coloreadas con polyvinylpyrrolidone (PVPP) (e.g. 1 g PVPP/100 mL muestra), agitar durante 1 minuto y filtrar o centrifugar para eliminar el PVPP.
- Muestras con concentraciones superiores al límite de linealidad especificado deben ser diluidas adecuadamente con agua destilada. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.
- Triturar y/o homogenizar muestras sólidas.
- Clarificar con reactivo Carrez (BioSystems ref. 12837) adicionando 5 mL de Carrez-I y 5 mL de Carrez-II al extracto líquido de la muestra en un matraz aforado de 100 mL. Ajustar a pH 7.5 - 8.5 con hidróxido de sodio. Mezclar después de cada adición, adicionar agua destilada hasta la marca del matraz y filtrar.
- Extraer las muestras que contengan grasa con agua caliente a una temperatura por encima del punto de fusión de la grasa. Dejar reposar a temperatura ambiente y llenar el matraz hasta la marca con agua destilada. Almacenar en hielo o en el refrigerador durante 15-30 minutos y luego filtrar. Utilice el sobrenadante transparente o ligeramente opalescente para el ensayo. También es posible clarificar con reactivo Carrez.
- Desproteínizar las muestras que contengan proteínas con reactivo Carrez.

Zumos de frutas y bebidas similares: Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el zumo si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Vino tinto y blanco^{4,5}: Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el vino si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Se recomienda utilizar el Vino Control (Tinto) (BioSystems ref. 12822) y Vino Control (Blanco) (BioSystems ref. 12821) para verificar el funcionamiento del procedimiento de medida.

Leche y yogur: Pesar con precisión aproximadamente 10 g de leche o yogur homogenizado en un matraz aforado de 100 mL, llenarlo hasta la marca con agua destilada, mezclar y filtrar.

Queso: Pesar con precisión aproximadamente 1 g de queso en un matraz aforado de 100 mL. Añadir 70 mL de agua e incubar durante 20 minutos a aproximadamente 70°C en agitación. Llenar hasta la marca con agua destilada, dejar reposar en nevera durante aproximadamente 20 minutos para separar la grasa y filtrar. Clarificar y/o diluir la muestra si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Muestras de fermentación y medios de cultivo celular: Centrifugar la muestra a 5000 g durante 5 minutos, filtrar el sobrenadante y utilizar el filtrado en el ensayo, diluido si es necesario. Se recomienda inactivar las reacciones enzimáticas poniendo la muestra en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos. También es posible desproteínizar la muestra como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Otras aplicaciones: El método también se puede usar con otros tipos de muestras. Póngase en contacto con su proveedor para obtener más información.

PARÁMETROS DE LA PRUEBA (Nota 3)

Estos reactivos pueden utilizarse también en otros analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.

BioSystems Y15

Reactivo 1 (Vol. R1): Utilizar el Reactivo A.

Reactivo 2 (Vol. R2): Utilizar el Reactivo B.

GENERAL	Técnica	
	Modo de análisis	AMMONIA Diferencial bireactivo
	Tipo de muestra	-
	Unidades	mg/L
	Tipo de reacción	dereciente
	Decimales	0
PROCEDIMIENTO	Lectura	monocromática
	Muestra	6
	Reactivo 1	240
	Reactivo 2	60
	Lavado	1.2
	Factor predilución	-
	Filtro Principal	340
	Filtro Referencia	-
	Lectura 1	72 s
	Lectura 2	600 s
Reactivo 2	96 s	
CALIBRACIÓN	Tipo de calibración	específico
	Curva de calibración	-
OPCIONES	Límite absorbancia blanco	1,200
	Límite blanco cinético	-
	Límite de linealidad	200

BioSystems Y25

Reactivo 1 (Vol. R1): Utilizar el Reactivo A.

Reactivo 2 (Vol. R2): Utilizar el Reactivo B.

GENERAL	Técnica	
	Modo de análisis	AMMONIA diferencial bireactivo
	Tipo de muestra	-
	Unidades	mg/L
	Tipo de reacción	dereciente
	Decimales	0
PROCEDIMIENTO	Lectura	monocromática
	Muestra	6
	Reactivo 1	240
	Reactivo 2	60
	Lavado	1.2
	Factor predilución	-
	Filtro Principal	340
	Filtro Referencia	-
	Lectura 1	75 s
	Lectura 2	600 s
Reactivo 2	90 s	
CALIBRACIÓN	Tipo de calibración	específico
	Curva de calibración	-
OPCIONES	Límite absorbancia blanco	1,200
	Límite blanco cinético	-
	Límite de linealidad	200

Apéndice E

Metodología para determinación de concentración de lactato

COD 12802 100 mL
Sólo para uso in vitro en el laboratorio

USO PREVISTO

Reactivo para la medición de ácido L-láctico en diversos tipos de muestra.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ácido L-láctico en la muestra genera, mediante la reacción descrita, NADH que puede ser medido por espectrofotometría.

**CONTENIDO Y COMPOSICIÓN**

A. Reactivo. 2 x 40 mL. Tampón 0,62 mol/L, L-lactato deshidrogenasa > 50 U/mL, conservantes, pH 9,5.

B. Reactivo. 1 x 20 mL. NAD⁺ 25 mmol/L.

ATENCIÓN: H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

S. Patrón multiácido. 1 x 5 mL. Patrón primario acuoso.

ATENCIÓN: H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

Para más advertencias y precauciones, ver la ficha de datos de seguridad del producto (SDS).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

El reactivo A puede presentar agregados que no afectan a su funcionalidad.

Indicaciones de deterioro: Absorbancia del blanco superior al límite indicado en "Parámetros de la prueba".

EQUIPO ADICIONAL

Analizador, espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 340 nm.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos y el patrón están listos para su uso.

PROCEDIMIENTO**Procedimiento manual** (Notas 1, 2, 3 y 4)

1. Precalentar los reactivos y el fotómetro a 37°C.
2. Pipetear en una cubeta:

	Blanco de reactivo (RB)	Patrón / Muestra
Patrón / Muestra (ST1/ST2)	-	10 µL / 50 µL
Agua destilada (ST1/ST2)	10 µL / 50 µL	-
Reactivo A	800 µL	800 µL

3. Mezclar e incubar durante 1 minuto a 37°C. Leer la absorbancia (A1) a 340 nm.
4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo B	200 µL	200 µL
------------	--------	--------

5. Mezclar e incubar durante 10 minutos a 37°C. Leer la absorbancia (A2) del blanco de reactivo, del patrón y de la muestra a 340 nm.
6. Calcular la concentración en la muestra (C) usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(A2 - 0,80 \times A1)_{\text{Muestra}} - (A2 - 0,80 \times A1)_{\text{RB}}}{(A2 - 0,80 \times A1)_{\text{Patrón}} - (A2 - 0,80 \times A1)_{\text{RB}}} \times C_{\text{Patrón}} [\text{g/L}] = C_{\text{Muestra}} [\text{g/L}]$$

CALIBRACIÓN

Debe realizarse un blanco de reactivo cada día y calibrar después de un cambio de lote de reactivo o cuando lo requieran los procedimientos de control de calidad.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de control de calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los resultados de los controles no se encuentren entre los límites de aceptación.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS¹⁻³ (Nota 4)

Las características metrológicas descritas se han obtenido utilizando un analizador Y15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

- Límite de detección: 0,02 g/L (ST1); 0,02 g/L (ST2).
- Límite de linealidad: 3,00 g/L (ST1); 0,60 g/L (ST2).
- Precisión:

Concentración media (ST1)	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
0,25 g/L	2,3 %	3,8 %
2,00 g/L	0,7 %	2,4 %

Concentración media (ST2)	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
0,09 g/L	2,8 %	3,4 %
0,34 g/L	0,9 %	1,2 %

- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con un procedimiento de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

NOTAS

1. Aunque se recomienda la calibración de cada serie de medidas usando el patrón, también puede calcularse la concentración de ácido L-láctico en la muestra usando el siguiente factor:

$$[(A2 - 0,80 \times A1)_{\text{Muestra}} - (A2 - 0,80 \times A1)_{\text{RB}}] \times 1,50 = C_{\text{Muestra}} [\text{g/L}]$$

2. Los volúmenes propuestos son para el uso de una cubeta semi-micro. Puede utilizarse otros volúmenes si se mantiene la relación entre los reactivos y la muestra.
3. Al analizar muestras sólidas y semisólidas que se pesan para su preparación, el contenido (g/Kg) (CT) se calcula a partir de la cantidad de muestra pesada (W), el volumen en el que se prepara muestra pesada (V), la concentración obtenida en la muestra (C) y el factor de dilución (df) si es necesario, según se describe a continuación:

$$\frac{C_{\text{Muestra}} (\text{g/L}) \times V (\text{L})}{W_{\text{Muestra}} (\text{g})} \times \text{df} = \text{CT}_{\text{Muestra}} [\text{g/Kg}]$$

4. El volumen de patrón/muestra/agua destilada utilizado puede variar en función del tipo de muestra (Sample Type: ST). Consultar el apartado "Muestras".

BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of precision of quantitative measurement methods; Approved guideline – Third edition. EP5-A3. Wayne: USA 2004.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; Approved guideline – Second edition. EP17-A2. Wayne: USA 2012.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; Approved guideline – Third edition. EP6-A. Wayne: USA 2003.
4. International organization of vine and wine (OIV). Compendium of international methods of wine and must analysis Vol. 1 & 2, 2016.
5. Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, Wine analysis and production. Van Nostrand Reinhold; 1 edition (December 31, 1990).
6. ISO 8069:2005. Dried milk - Determination of content of lactic acid and lactates.

MUESTRAS

Procedimientos de preparación

- Filtrar o centrifugar las soluciones turbias.
- Desgasificar las muestras con dióxido de carbono en un baño de ultrasonidos o agitar la muestra en un vaso de precipitados durante aproximadamente 1 minuto.
- Decolorar las muestras muy coloreadas con polyvinylpyrrolidone (PVPP) (e.g. 1 g PVPP/100 mL muestra), agitar durante 1 minuto y filtrar o centrifugar para eliminar el PVPP.
- Muestras con concentraciones superiores al límite de linealidad especificado deben ser diluidas adecuadamente con agua destilada. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.
- Triturar y/o homogenizar muestras sólidas.
- Clarificar y/o desproteínezar con reactivo Carrez (BioSystems ref. 12837) adicionando 5 mL de Carrez-I y 5 mL de Carrez-II al extracto líquido de la muestra en un matraz aforado de 100 mL. Ajustar a pH 7.5 - 8.5 con hidróxido de sodio. Mezclar después de cada adición, adicionar agua destilada hasta la marca del matraz y filtrar.
- Extraer las muestras que contengan grasa con agua caliente a una temperatura por encima del punto de fusión de la grasa. Dejar reposar a temperatura ambiente y llenar el matraz hasta la marca con agua destilada. Almacenar en hielo o en el refrigerador durante 15-30 minutos y luego filtrar. Utilice el sobrenadante transparente o ligeramente opalescente para el ensayo. También es posible clarificar con reactivo Carrez.

Zumos de frutas y bebidas similares (ST2): Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el zumo si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Vino tinto y blanco^{4,5}(ST1): Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el vino si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Determinación de derivados esterificados: Para determinar el contenido de ácido L-láctico total, añadir 2 mL de hidróxido de sodio (2 M) a 20 mL de vino y calentar durante 15 minutos en un condensador de reflujo con agitación. Dejar enfriar y neutralizar con ácido sulfúrico (1 M). Transferir a un matraz aforado de 50 mL y llenar hasta la marca con agua destilada. Analizar la muestra según el procedimiento estándar para obtener el contenido de ácido L-láctico total. En los vinos con elevado contenido de azúcares, sustituir el de hidróxido de sodio por agua.

Se recomienda utilizar el Vino Control (Tinto) (BioSystems ref. 12822) y Vino Control (Blanco) (BioSystems ref. 12821) para verificar el funcionamiento del procedimiento de medida.

Cerveza (ST2): Desgasificar, filtrar, clarificar y/o diluir la cerveza si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Leche⁶ y yogur (ST1): Pesar con precisión aproximadamente 10 g de leche o yogur homogenizado en un matraz aforado de 100 mL, llenarlo hasta la marca con agua destilada, mezclar y filtrar.

Queso (ST1): Pesar con precisión aproximadamente 1 g de queso en un matraz aforado de 100 mL. Añadir 70 mL de agua e incubar durante 20 minutos a aproximadamente 70°C en agitación. Llenar hasta la marca con agua destilada, dejar reposar en nevera durante aproximadamente 20 minutos para separar la grasa y filtrar. Clarificar y/o diluir la muestra si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Muestras de fermentación y medios de cultivo celular (ST1): Centrifugar la muestra a 5000 g durante 5 minutos, filtrar el sobrenadante y utilizar el filtrado en el ensayo, diluido si es necesario. Se recomienda inactivar las reacciones enzimáticas poniendo la muestra en un baño de agua a 80°C durante 15 minutos. También es posible desproteínizar la muestra como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Otras aplicaciones: El método también se puede usar con otros tipos de muestras. Póngase en contacto con su proveedor para obtener más información.

PARÁMETROS DE LA PRUEBA (Notas 3 y 4)

Estos reactivos pueden utilizarse también en otros analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.

BioSystems Y15

Reactivo 1 (Vol. R1): Utilizar el Reactivo A.

Reactivo 2 (Vol. R2): Utilizar el Reactivo B.

GENERAL	Técnica Modo de análisis Tipo de muestra Unidades Tipo de reacción Decimales	L-LACTIC ACID diferencial bireactivo ST1 / ST2 g/L creciente 2
PROCEDIMIENTO	Lectura Muestra Reactivo 1 Reactivo 2 Lavado Factor predilución Filtro Principal Filtro Referencia Lectura 1 Lectura 2 Reactivo 2	monocromática 3 / 15 240 60 1,2 - 340 - 72 s 480 s 96 s
CALIBRACIÓN	Tipo de calibración Curva de calibración	múltiple -
OPCIONES	Límite absorbancia blanco Límite blanco cinético Límite de linealidad	0,300 - 3,00 / 0,60

BioSystems Y25

Reactivo 1 (Vol. R1): Utilizar el Reactivo A.

Reactivo 2 (Vol. R2): Utilizar el Reactivo B.

GENERAL	Técnica Modo de análisis Tipo de muestra Unidades Tipo de reacción Decimales	L-LACTIC ACID diferencial bireactivo ST1 / ST2 g/L creciente 2
PROCEDIMIENTO	Lectura Muestra Reactivo 1 Reactivo 2 Lavado Factor predilución Filtro Principal Filtro Referencia Lectura 1 Lectura 2 Reactivo 2	monocromática 3 / 15 240 60 1,2 - 340 - 75 s 480 s 90 s
CALIBRACIÓN	Tipo de calibración Curva de calibración	múltiple -
OPCIONES	Límite absorbancia blanco Límite blanco cinético Límite de linealidad	0,300 - 3,00 / 0,60

Apéndice F

Metodología de medición de glutamato y glutamina

Product Information

Glutamine/Glutamate Determination Kit

Catalog Number **GLN1**
Storage Temperature 2–8 °C

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

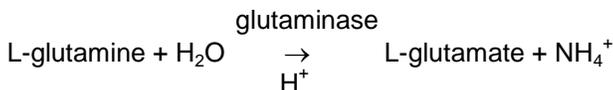
The Glutamine/Glutamate Determination Kit is designed for the spectrophotometric measurement of L-glutamine and/or L-glutamate via enzymatic deamination of L-glutamine and dehydrogenation of L-glutamate with conversion of NAD⁺ to NADH.

This kit may be used for the spectrophotometric measurement of L-glutamine and/or L-glutamate in liquid preparations. Pretreatment is required for the analysis of L-glutamine in serum or plasma.¹ D-isomers are not detected with this kit.

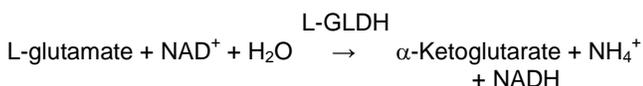
Determination of L-glutamine is a two-step reaction: (A) deamination of L-glutamine to L-glutamate and (B) dehydrogenation of the L-glutamate to α-ketoglutarate accompanied by reduction of NAD⁺ to NADH. The conversion of NAD⁺ to NADH is measured spectrophotometrically and is proportional to the amount of glutamate that is oxidized, hence the amount of glutamine converted to glutamate in the samples.

Note: The terms, glutamic acid and glutamate, are used interchangeably throughout this procedure.

Reaction (A): Deamination of glutamine



Reaction (B): Dehydrogenation of glutamate and reduction of NAD⁺



For determination of L-glutamine in medium containing both L-glutamine, and L-glutamate or its salts, endogenous L-glutamate must be measured. See: Reaction (A); Test samples containing L-glutamine and L-glutamate.

It is recommended the entire procedure be reviewed before starting the assay.

Components

Catalog Number	Item	Quantity
A4433	0.5 M Acetate buffer, pH 5 100 mM Adenosine	20 ml
A4558	5'-Diphosphate, (ADP) Lyophilized*	1 ml
G6275	2 mM L-Glutamine, Lyophilized*	25 ml
G6150	1 mM L-Glutamic Acid, Glutamic Dehydrogenase	25 ml
G5900	(L-GLDH)	1 ml
G8880	Glutaminase 10 U/ml, Lyophilized*	5 ml
207942	Hydrazine Monohydrate (64-65% Hydrazine)	3 ml
N9268	30 mM β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD), Lyophilized*	5 ml
T3161	Tris (0.1 M)-EDTA (0.002 M) Buffer	60 ml

* Lyophilized items should be reconstituted to the indicated volume to yield appropriate concentration, See Preparation Instructions for details.

Equipment Required but Not Provided.

- Spectrophotometer capable of reading absorbance at 340 nm.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

Use ultrapure water for the preparation of components.

Preparation Of Components

1. Reconstitute L-Glutamine (Catalog Number G6275), L-Glutamate (Catalog Number G6150), NAD (Catalog Number N9268), and ADP (Catalog Number A4558) with water to volumes indicated on labels. Store reconstituted components at -20°C in working aliquots.
2. Prepare a 1:10 dilution of Acetate Buffer (Catalog Number A4433) in water and use 5 ml of this to dissolve Glutaminase (Catalog Number G8880). Store at -20°C after reconstitution in working aliquots.
3. Add entire contents of Hydrazine Monohydrate (Catalog Number 207942, 3 ml) to 57 ml of Tris-EDTA Buffer and adjust pH to 9.0. Smaller aliquots may be prepared using the ratio of 1 ml hydrazine to 19 ml Tris-EDTA Buffer. Keep unused hydrazine tightly closed at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Storage/Stability

The Glutamine-Glutamate Determination Kit can be stored at $2-8^{\circ}\text{C}$.

Store reconstituted components at -20°C in working aliquots.

Procedure

This is a modification of the procedure described by Lund.¹

I. DETERMINATION OF GLUTAMINE

A. Reaction (A): Deamination Of Glutamine

Standard Curve – Use ultrapure water for the preparation of standards and samples.

1. Label appropriate size tubes STD 0.1 to 1.0. Total reaction volume of each tube should equal 1 ml.
2. Dispense components as follows:
 - a. Acetate buffer (undiluted): 0.2 ml
 - b. Glutaminase solution: 0.1 ml
 - c. 2 mM Glutamine Standard (Gln) and water according to Table 1.

Table 1.

Preparation of Glutamine Standards

μmoles	Gln (ml)	Water (ml)
0	0*	0.7
0.1	0.05	0.65
0.2	0.1	0.6
0.3	0.15	0.55
0.4	0.2	0.5
0.5	0.25	0.45
0.6	0.3	0.4
0.7	0.35	0.35
0.8	0.4	0.3
0.9	0.45	0.25
1.0	0.5	0.2

* Tube with 0 ml of L-glutamine is the assay blank.

Test Samples without Glutamate

Note: Samples with a concentration $>2\text{ mM}$ L-glutamine must be diluted to 2 mM or less. The amount of glutaminase used may not be sufficient to deaminate higher levels of L-glutamine.

1. Label tubes GLN. If using more than one tube, number tubes to avoid confusion.
2. Add Acetate buffer and Glutaminase as indicated for preparation of Standard Curve (See Procedure, Steps I, A, 2a and 2b).
3. Add: 0.25 ml of Test Sample and 0.45 ml of water.

Note: If other sample volumes are used, the water volume must be adjusted to yield a total reaction volume of 1 ml.
4. Incubate all tubes at 37°C for 1 hour.

Test Samples containing both L-glutamine and L-glutamate

– For samples containing both L-glutamine and L-glutamate, endogenous L-glutamate must be determined and subtracted from L-glutamate concentration derived by deamination of L-glutamine.

1. Label and number duplicate tubes for each sample as follows: GLN+GLU for endogenous and L-glutamate derived from L-glutamine. GLU for endogenous L-glutamate.

- Add components as indicated below for tubes marked GLN+GLU and GLU.

	GLN+GLU	GLU
a. Acetate buffer	0.2 ml	0.2 ml
b. Glutaminase	0.1 ml	–
c. Test sample	0.25 ml	0.25 ml
d. Water	0.45 ml	0.55 ml

Note: If other sample volumes are used, the water volume must be adjusted to yield a total reaction volume of 1 ml.

- Incubate all tubes at 37 °C for 1 hour.

B. Reaction (B): Dehydrogenation of Glutamate

- Label cuvettes: STD, GLN, GLN+GLU, or GLU as applicable.
- Dispense components into appropriate tubes as follows:

	STD	GLN	GLN+GLU	GLU
Tris-EDTA-Hydrazine buffer	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
NAD solution	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
ADP solution	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
From REACTION A:				
STD tubes (including blank)	0.5 ml	–	–	–
GLN tubes	–	0.5 ml	–	–
GLN+GLU tubes	–	–	0.5 ml	–
GLU tubes	–	–	–	0.5 ml
Water	0.39 ml	0.39 ml	0.39 ml	0.39 ml

- Place caps on cuvettes and mix by inversion.
- Read absorbance at 340 nm to obtain background reading.
- Add 0.02 ml of L-GLDH, mix by inversion, and hold at room temperature for 40 minutes.
- Read absorbance at 340 nm after 40 minutes or until absorbance remains constant. Subtract background absorbance from this reading for net absorbance.
- Glutamine Standard Curve: Graph the L-glutamine standards using μ moles vs. absorbance.

Note: Unknown concentrations for L-glutamine and L-glutamate can be determined from the graph.

- Calculation of L-glutamine in test sample: To determine concentration of L-glutamine in sample, divide the observed result by 0.25 ml or the volume of sample that was used in the test. Multiply the result by the reciprocal of any dilutions that were made.

Note: μ moles/ml = mmoles/L

- For samples containing both L-glutamine and L-glutamate, subtract endogenous L-glutamate concentration from total L-glutamate concentration. The result is the concentration of L-glutamate arising from deamination of L-glutamine.

II. DETERMINATION OF GLUTAMATE

Note: Reaction (B) may be used without Reaction (A) to determine L-glutamate or its salts without determining L-glutamine.

- Construct a glutamate standard curve as shown below to determine L-glutamate in test samples.

- Label cuvettes S (standard) or T (test samples).
- Dispense components as follows:

Tris-EDTA-Hydrazine buffer	1.0 ml
NAD solution	0.1 ml
ADP solution	0.01 ml
Glutamate standards or samples	(See Table 2)
Water	(See Table 2)

Table 2.
Preparation of Glutamate Standards (Glu)

μ moles	Glu (ml)	Water (ml)
0	0*	0.89
0.05	0.05	0.84
0.1	0.1	0.79
0.15	0.15	0.74
0.2	0.2	0.69
0.25	0.25	0.64
0.3	0.3	0.59
0.35	0.35	0.54
0.4	0.4	0.49
0.45	0.45	0.44
0.5	0.5	0.39

* Tube with 0 ml of L-glutamate is the assay blank.

B. Test samples:

- Add 0.25 ml of test samples in place of the glutamate standard and 640 μ l of water. If other sample volumes are used, the water volume must be adjusted to yield a total reaction volume of 2 ml.

Note: Samples with L-glutamate >1 mM should be diluted to 1 mM or less to fall within the standard curve.

- Place caps on cuvettes and mix by inversion.
- Read absorbance at 340 nm to obtain background reading.

4. Add 0.02 ml of L-GLDH, mix by inversion, and hold at room temperature.
5. Read absorbance at 340 nm after 40 minutes until absorbance remains constant. Subtract background from this for net absorbance.
6. Glutamate Standard Curve: Graph L-glutamate standards using mM versus absorbance and determine unknown values from this graph.
7. Calculation of L-glutamate in test sample: To determine concentration of L-glutamate in sample, divide the observed results by 0.25 ml or the volume of sample that was used in the reaction. Multiply this by the reciprocal of any dilutions that were made.
Note: $\mu\text{moles/ml} = \text{mmoles/L}$

Reference

1. Lund, P., L-Glutamine and L-Glutamate: UV-Method with Glutaminase and Glutamate Dehydrogenase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Volume 8, H.U. Bergmeyer, (ed). VCH, Verlagsgesellschaft, (Weinheim, 1986) pp 357-363.

SM,BG,MAM 12/18-1