

## **Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutation**

Memoria que presenta la licenciada Magdalena Valdivieso Ugarte para aspirar al grado de Doctor en Química.

Fdo. Magdalena Valdivieso Ugarte

Los directores de esta Tesis doctoral, Dr. José Luis Adrio Fondevila, Doctor en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela, y Dra. Carmen Ronchel Barreno, Doctora en Biología por la Universidad de Granada.

CERTIFICAN que los trabajos que se exponen en esta memoria de Tesis Doctoral: "Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutation" han sido realizados en el Departamento de Biotecnología de Puleva Biotech S.A., bajo la tutela de la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Suárez Ortega del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos. La presente memoria ha sido revisada por nosotros, encontrándola conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Química por el tribunal que en su día se designe.

Fdo. Dr. José Luis Adrio Fondevila

Fdo.Dra. Carmen Ronchel Barreno

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Magdalena Valdivieso Ugarte  
D.L.: Gr. 843 - 2006  
ISBN: 84-338-3821-0

---

## Índice

<b>Abreviaturas</b>	I
<b>Índice de Figuras</b>	III
<b>Índice de Tablas</b>	V
<b>1. Introducción</b>	1
<b>1.1 Estrés oxidativo y especies reactivas del oxígeno</b>	1
1.1.1 Oxígeno y principales especies reactivas del oxígeno	3
1.1.2 Producción de ROS	5
1.1.3 Efectos perjudiciales de las especies reactivas del oxígeno	6
<b>1.2. Sistemas de defensa antioxidante</b>	8
1.2.1 Antioxidantes enzimáticos	10
1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos	13
<b>1.3 Biosíntesis de glutatión</b>	16
<b>1.4 Producción biotecnológica de glutatión</b>	18
1.4.1 Síntesis enzimática	19
1.4.2 Producción por fermentación	20
1.4.3 Nuevas estrategias	22
<b>1. 5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	23
1.5.1 <i>S. cerevisiae</i> y estrés oxidativo	25
1.5.2 Metabolismo del azufre y glutatión	29
1.5.3 Estrés nutricional y ambiental	30
<b>1. 6 Mejora de cepas para uso industrial</b>	31
1.6.1 Mutagénesis clásica	32
1.6.2 Ingeniería genética	33
<b>1.7 Optimización del medio de cultivo</b>	35
1.7.1 Diseños experimentales y metodología de superficie de respuesta	36
1.7.2 Diseños experimentales para ajustar superficies de respuesta	39

---

<b>2. Objetivos</b>	45
---------------------	----

---

<b>3. Materiales y métodos</b>	49
--------------------------------	----

---

<b>3.1 Microorganismos</b>	49
3.1.1 Cepas Bacterianas	49
3.1.2 Cepas fúngicas	49
<b>3.2 Medios de cultivo</b>	49
3.2.1 Medios de cultivo para bacterias	49
3.2.2 Medios de cultivo para levaduras	50
<b>3.3 Cultivo y conservación de las cepas</b>	51
3.3.1 Crecimiento de cepas bacterianas	51
3.3.2 Crecimiento de levaduras	52
3.3.3 Conservación de las cepas	52
<b>3.4 Tampones y otras soluciones</b>	52
<b>3.5 Oligonucleótidos</b>	54
<b>3.6 Plásmidos</b>	56
<b>3.7 Purificación de ácidos nucleicos</b>	57
3.7.1 Purificación de DNA plasmídico de bacterias	57
3.7.1.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico (minipreps)	57
3.7.1.2 Preparaciones de DNA plasmídico	58
3.7.1.3 Preparaciones de DNA plasmídico a gran escala	58
3.7.2 Purificación de fragmentos de DNA	58
3.7.3 Purificación de DNA genómico de levaduras	59
3.7.4 Purificación de RNA total de levadura	60
<b>3.8 Manipulación de ácidos nucleicos</b>	61
3.8.1 Digestión de DNA con enzimas de restricción	61
3.8.2 Relleno de extremos 5' protuberantes	62

---

3.8.3 Ligación de moléculas de DNA	62
3.8.4 Determinación espectrofotométrica de la cantidad de RNA	63
3.8.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
<b>3.9. Electroforesis de macromoléculas</b>	65
3.9.1. Electroforesis de DNA	65
3.9.2. Electroforesis de RNA	65
<b>3.10 Transformación de células</b>	66
3.10.1 <i>Escherichia coli</i>	67
3.10.1.1 Preparación de células electrocompetentes	67
3.10.1.2. Transformación por electroporación	67
3.10.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
3.10.2.1 Preparación de células competentes	68
3.10.2.2 Transformación	68
<b>3.11 Transferencia, marcaje e hibridación de DNA</b>	69
3.11.1 Transferencia	69
3.11.2 Marcaje	70
3.11.3 Hibridación	71
3.11.3.1 Prehibridación e hibridación	71
3.11.3.2 Detección inmunológica	72
<b>3.12 Mutación de cepas de <i>S. cerevisiae</i></b>	73
3.12.1 Curva de mortalidad	73
3.12.2 Mutagénesis	74
<b>3.13. Selección de cepas superproductoras de glutation</b>	75
3.13.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	75
3.13.2 Selección	75
<b>3.14 Análisis de la concentración de glutation</b>	76
3.14.1. Análisis mediante HPLC-fluorescencia	76

3.14.2 Análisis por colorimetría	80
<b>3.15 Análisis de etanol</b>	81
<b>3.16 Estudio de la estabilidad mitótica de plásmidos</b>	83
<b>3.17 Análisis de la expresión génica mediante microarrays</b>	84
3.17.1 Síntesis de cDNA de doble hebra a partir de RNA	85
3.17.2 Síntesis de cRNA marcado con biotina	86
3.17.3 Fragmentación del cRNA biotinilado	87
3.17.4. Hibridación de las muestras	88
3.17.5. Lavado, tinción y escaneado	89
<b>3.18 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR</b>	89
<b>3.19 Optimización del medio de cultivo mediante la metodología de superficie de respuesta</b>	91
<b>4. Resultados</b>	97
<hr/>	
<b>4.1 Obtención de cepas superproductoras de glutation</b>	97
4.1.1 Primera ronda de mutación	98
4.1.2 Segunda ronda de mutación	99
4.1.3 Tercera ronda de mutación	100
4.1.4 Cuarta ronda de mutación	101
<b>4.2 Caracterización de la cepa M4T123</b>	103
4.2.1 Curvas de crecimiento	103
4.2.2. Análisis de la expresión génica	106
4.2.2.1 Medio YPD	106
4.2.2.2 Medio MFS	111
4.2.3. Cuantificación de la expresión génica por RT-PCR	115
4.2.4 Análisis de la concentración de etanol	120
<b>4.3 Optimización de los parámetros de cultivo</b>	122
4.3.1 Modelo de primer orden	122

---

4.3.2 Método del ascenso más pronunciado	128
4.3.3 Modelo de segundo orden	129
<b>4.4 Obtención de cepas superproductoras de glutathion mediante incremento de la dosis génica</b>	132
4.4.1 Construcción de un vector de expresión integrativo	132
4.4.2 Clonación del gen <i>GSH1</i>	134
4.4.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	135
4.4.4 Análisis de la concentración de glutathion	136
4.4.5 Análisis molecular de las cepas seleccionadas	137
4.4.6 Estabilidad mitótica	139
<b>5. Discusión</b>	143

---

<b>5.1 Glutathion: importancia biológica y usos</b>	143
<b>5.2 Obtención de cepas superproductoras de glutathion</b>	144
<b>5.3 Análisis de expresión génica</b>	146
<b>5.4 Optimización de la producción de glutathion</b>	158
<b>5.5 Obtención de cepa superproductora mediante aumento de la dosis génica</b>	162
<b>6. Conclusiones</b>	167

---

<b>7. Bibliografía</b>	171
------------------------	-----

---



---

<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CSL</b>	<i>Corn steep liquor</i> (líquido de maceración de maíz)
<b>Cys</b>	L-cisteína
<b>DCC</b>	Diseño central compuesto
<b>DEPC</b>	Diethylpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>gGC</b>	$\gamma$ -glutamilcisteína
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>Gly</b>	L-Glicina
<b>GSH</b>	Glutation reducido ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina)
<b>GSH1</b>	$\gamma$ -glutamilcistein sintetasa
<b>GSH2</b>	glutation sintetasa
<b>GSSG</b>	Glutation oxidado
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography Mass</i> , Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>HPLC-MS</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography Mass</i> , Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Masas
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>M</b>	Concentración molar
<b>mM</b>	Concentración Milimolar
<b>MSR</b>	Metodología de superficie de respuesta
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenin dinucleótido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenin dinucleótido difosfato
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NTG</b>	Nitrosoguanidina
<b>OPA</b>	O-ftaladehído
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico

<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Especies Reactivas del Oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	<i>Real time Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>TBOOH</b>	Hidroperóxido de terc-butilo
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b><math>\gamma</math>-GT</b>	$\gamma$ -glutamiltanspeptidasa
<b><math>\mu</math>M</b>	Concentración Micromolar

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b>	Fuentes de ROS y respuesta celular.	2
<b>Figura 1.2.</b>	Reducción secuencial y univalente de la molécula de oxígeno.	4
<b>Figura 1.3.</b>	Funciones fisiológicas de ROS.	7
<b>Figura 1.4.</b>	Clasificación de los antioxidantes por su nivel de actuación.	8
<b>Figura 1.5.</b>	Ciclo de oxidación-reducción del glutatión.	11
<b>Figura 1.6.</b>	Estructura del glutatión.	14
<b>Figura 1.7.</b>	Síntesis y degradación del glutatión.	17
<b>Figura 1.8.</b>	Micrografía electrónica de barrido de <i>S. cerevisiae</i> .	24
<b>Figura 1.9.</b>	Regulación de la localización intracelular de YAP1.	28
<b>Figura 1.10.</b>	Metabolismo del azufre en <i>S. cerevisiae</i> .	29
<b>Figura 1.11.</b>	Esquema secuencial de la metodología de superficie de respuesta.	38
<b>Figura 1.12.</b>	A. Representación gráfica de un diseño factorial $2^2$ . B. Matriz del diseño $2^2$ .	40
<b>Figura 1.13.</b>	A. Representación gráfica de un diseño factorial $2^3$ . B. Matriz del diseño $2^3$ .	41
<b>Figura 1.14.</b>	Diseño central compuesto. A para $k=2$ ; B $K=3$ .	42
<b>Figura 3.1.</b>	Separación cromatográfica de $\gamma$ -glutamilcisteína (gGC) y glutatión (GSH).	78
<b>Figura 3.2.</b>	Reacciones que se producen en el análisis de GSH por colorimetría.	80
<b>Figura 3.3.</b>	Análisis de la expresión génica mediante el empleo de geneChips de Affymetrix.	85
<b>Figura 3.4.</b>	Representación gráfica del diseño central compuesto para las variables inóculo y tiempo.	94
<b>Figura 4.1.</b>	Estrategia para la selección de cepas superproductoras de GSH.	97
<b>Figura 4.2.</b>	Curvas de crecimiento en medio YPD. A. Biomasa, B. Producción específica de GSH.	104

<b>Figura 4.3.</b>	A. Curvas de crecimiento en medio MFS. A. Biomasa, B. Producción específica de GSH.	106
<b>Figura 4.4.</b>	Genes sobreexpresados y reprimidos (ratio M4T123/ CECT 1328) en medio YPD.	108
<b>Figura 4.5.</b>	Genes sobreexpresados y reprimidos (ratio M4T123/CECT 1328) en medio MFS.	112
<b>Figura 4.6.</b>	Análisis por RT-PCR. A. Medio YPD, B. Medio MFS	117
<b>Figura 4.7.</b>	Análisis de expresión por RT-PCR (ratio MFS/YPD) A. Cepa M4T123. B. Cepa CECT 1328.	118
<b>Figura 4.8.</b>	Producción de etanol. A. Medio YPD. B. Medio MFS.	121
<b>Figura 4.9.</b>	Gráfico de Pareto para GSH (mg/mL).	126
<b>Figura 4.10.</b>	Gráfica de superficie de respuesta para GSH (mg/L). A. Efecto del inóculo frente al tiempo. B. Efecto de las melazas frente a CSL.	127
<b>Figura 4.11.</b>	Trayectoria del ascenso más pronunciado para GSH.	129
<b>Figura 4.12.</b>	Superficie de respuesta del diseño central compuesto.	130
<b>Figura 4.13.</b>	Construcción del plásmido de expresión integrativo pBT39.	133
<b>Figura 4.14.</b>	Vector de expresión integrativo pBT119.	135
<b>Figura 4.15.</b>	A. Organización genética de una unidad de rDNA en <i>S. cerevisiae</i> . B. Predicción de la integración del casete de expresión por recombinación homóloga.	138
<b>Figura 4.16.</b>	Hibridación de los transformantes.	138
<b>Figura 5.1.</b>	Cambios de expresión (ratio entre la cepa M4T123/CECT1328) en medio YPD.	148
<b>Figura 5.2.</b>	Cambios del metabolismo celular en <i>S. cerevisiae</i> por exposición al cadmio (Jamieson, 2002).	149
<b>Figura 5.3.</b>	Valores de expresión de la RT-PCR en medio MFS de los genes implicados en la fermentación alcohólica.	150
<b>Figura 5.4.</b>	Cambios de expresión (ratio entre la cepa M4T123/ CECT1328) medio MFS.	
<b>Figura 5.5.</b>	Represión catabólica por nitrógeno.	
<b>Figura 5.6.</b>	Análisis (RT-PCR) en medio MFS de los genes implicados en la fermentación alcohólica.	

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.1.</b>	Especies reactivas del oxígeno (ROS).	3
<b>Tabla 1.2.</b>	Sistemas antioxidantes.	9
<b>Tabla 1.3.</b>	Estrategias para la producción de GSH con microorganismos recombinantes.	23
<b>Tabla 1.4.</b>	Sistemas antioxidantes en <i>S. cerevisiae</i> .	26
<b>Tabla 1.5.</b>	Pautas generales para el diseño estadístico de experimentos.	37
<b>Tabla 3.1.</b>	Composición y preparación de tampones y soluciones.	52
<b>Tabla 3.2.</b>	Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR utilizando DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> como molde.	54
<b>Tabla 3.3.</b>	Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR cuantitativa utilizando como molde RNA de <i>S. cerevisiae</i> .	55
<b>Tabla 3.4.</b>	Plásmidos utilizados en este trabajo.	56
<b>Tabla 3.5.</b>	Parámetros instrumentales para el análisis de GSH por HPLC.	78
<b>Tabla 3.6.</b>	Parámetros instrumentales CG-FID.	82
<b>Tabla 3.7.</b>	Factores y niveles utilizados en el diseño factorial 2 <sup>4</sup> .	92
<b>Tabla 3.8.</b>	Matriz del diseño factorial 2 <sup>4</sup> .	92
<b>Tabla 3.9.</b>	Método del ascenso más pronunciado.	93
<b>Tabla 3.10.</b>	Diseño central compuesto.	94
<b>Tabla 4.1.</b>	Análisis de las cepas seleccionadas en la segunda ronda de mutación.	100
<b>Tabla 4.2.</b>	Análisis de las cepas seleccionadas en la tercera ronda de mutación.	101
<b>Tabla 4.3.</b>	Análisis de las cepas seleccionadas en la cuarta ronda de mutación.	102
<b>Tabla 4.4.</b>	Análisis de las cepas seleccionadas en las cuatro ronda de mutación.	103
<b>Tabla 4.5.</b>	Variación ( $\geq 1,5$ veces) en el nivel de expresión de genes en medio YPD.	109
<b>Tabla 4.6.</b>	Variación ( $\geq 1,5$ veces) en el nivel de expresión de genes en medio MFS.	113

<b>Tabla 4.7.</b>	Genes analizados mediante RT-PCR.	115
<b>Tabla 4.8.</b>	Resumen del análisis de la expresión génica mediante microarrays de cDNA y RT-PCR.	120
<b>Tabla 4.9.</b>	Variables y niveles utilizados en el diseño factorial $2^4$ .	123
<b>Tabla 4.10.</b>	Matriz experimental y valores obtenidos para la respuesta.	124
<b>Tabla 4.11.</b>	Análisis de varianza (ANOVA) para GSH (mg/L).	125
<b>Tabla 4.12.</b>	Método del ascenso más pronunciado.	128
<b>Tabla 4.13.</b>	Diseño central compuesto.	130
<b>Tabla 4.14.</b>	Análisis de varianza (ANOVA) del DCC para GSH (mg/L).	131
<b>Tabla 4.15.</b>	Producción de GSH en los transformantes seleccionados.	136
<b>Tabla 4.16.</b>	Estabilidad mitótica.	139

## **1. Introducción**



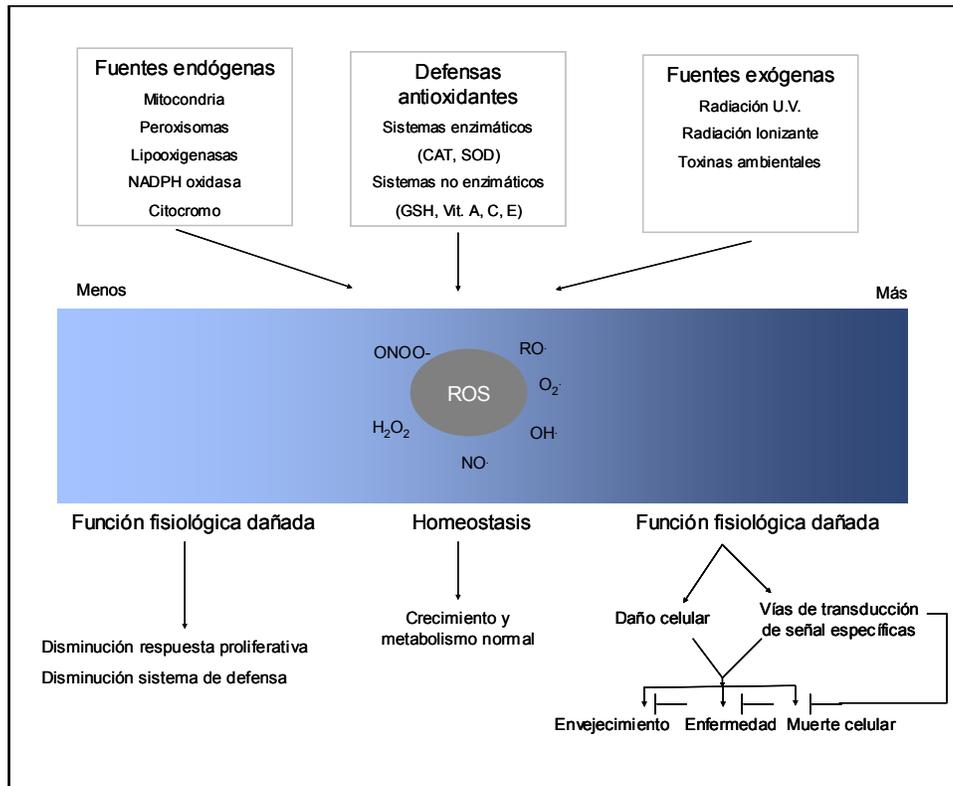
## 1.1 Estrés oxidativo y especies reactivas del oxígeno

A excepción de aquellos organismos llamados anaerobios, que están adaptados para vivir en ausencia de oxígeno, los microorganismos, los animales y las plantas aerobias requieren oxígeno para obtener energía química (ATP) esencial para la vida. Sin embargo, cuando la concentración de oxígeno es mayor que la presente en la atmósfera, los organismos aerobios se enfrentan con la paradójica situación de que el oxígeno, indispensable para su supervivencia, es al mismo tiempo un agente tóxico (Halliwell y Gutteridge, 1989; Scandalios, 2005). Los avances tanto en la investigación básica como en la investigación clínica, han conducido a una comprensión más profunda de los mecanismos que dan lugar a la toxicidad del oxígeno y han permitido entender que ésta constituye un problema de una envergadura muy superior a la que se le atribuía hace unos años.

La toxicidad del oxígeno es consecuencia de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, las siglas en inglés de Reactive Oxigen Species). La formación de estas especies se detectó como parte del proceso de consumo de oxígeno por organismos aerobios. En 1954, Rebeca Gerschman, postuló que la mayor parte del daño producido en organismos vivos por el oxígeno a altas presiones se debía a la formación de radicales libres del oxígeno (Gerschman y col., 1954; Gilbert, 1981). Esta hipótesis fue muy controvertida, hasta que en 1968, McCord y Fridovich descubrieron la superóxido dismutasa, enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, demostrando así la existencia de dichas especies (McCord y Fridovich, 1969). Desde entonces, se ha investigado mucho sobre las especies reactivas del oxígeno y su posible actuación en diversas enfermedades.

Las especies reactivas del oxígeno se generan como resultado del metabolismo intracelular normal, fundamentalmente en las mitocondrias y los peroxisomas, así como a partir de una gran variedad de sistemas citosólicos enzimáticos. Además, numerosos agentes externos son capaces de generar la formación de ROS en el organismo (**Figura 1.1**). Un sofisticado sistema de defensa enzimático y no enzimático actúa regulando los niveles de ROS en el

organismo para mantener un estado de equilibrio en la célula. Niveles de ROS por debajo de los valores de homeostasis celular, pueden alterar las funciones fisiológicas de estos compuestos oxidantes en los sistemas de proliferación y de defensa celular.



**Figura 1.1.** Fuentes de ROS y respuesta celular

De forma similar, cuando existe un incremento de los niveles de ROS, tanto por un aumento de su concentración como por una disminución en los mecanismos de defensa, se pierde el balance entre la aparición de especies nocivas y la capacidad de la célula de evitar su acumulación, originándose una situación conocida como *estrés oxidativo* (Sies, 1985). En estas condiciones, las

especies reactivas del oxígeno reaccionan con las macromoléculas de las células modificando su estructura y su función, dando lugar a alteraciones que pueden originar enfermedades, envejecimiento e incluso la muerte celular (**Figura 1.1**). Numerosas enfermedades han sido vinculadas al estrés oxidativo como la aterosclerosis, síndrome de Down, enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y la diabetes, entre otras (Costa y Moradas-Ferreira, 2001; Busciglio y Yankner, 1995).

### 1.1.1 Oxígeno y principales especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno agrupan a numerosas moléculas altamente reactivas como los radicales libres y otros compuestos que, si bien no pueden catalogarse químicamente como radicales libres, sí son altamente pro-oxidantes y capaces de generar radicales libres durante su metabolismo (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1.** Especies reactivas del oxígeno (ROS).

Radicales	No radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2$
Hidroxilo, $OH^{\cdot}$	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxilo, $RO_2^{\cdot}$	Ozono, $O_3$
Alcoxilo, $RO^{\cdot}$	Oxígeno singlete, $^1O_2$
Hidroperoxilo, $HO_2^{\cdot}$	*Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot}$

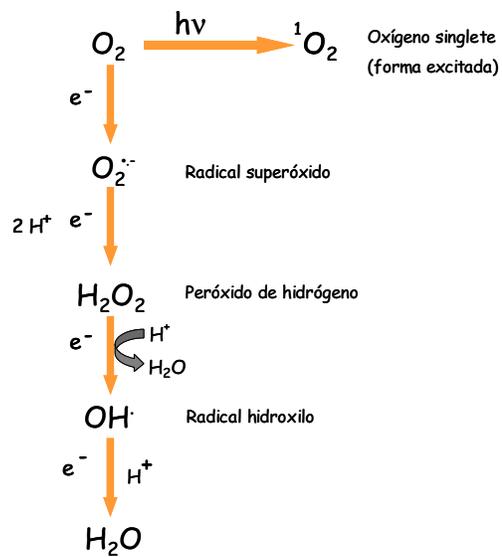
\*También llamado especie reactiva de nitrógeno (RNS).

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en el orbital externo, altamente reactivas y con capacidad de existir de forma independiente. Esta situación les permite reaccionar

prácticamente con cualquier principio activo, lo que también condiciona su corta existencia. Pueden combinarse entre sí, con moléculas que tienen electrones no apareados, dando lugar a moléculas comunes con todos sus electrones apareados, o con moléculas estables generando nuevos radicales libres.

Los radicales libres se generan en las células mediante reacciones en las que se producen transferencia de electrones. Éstas pueden ser enzimáticas o no enzimáticas, interviniendo, en estas últimas, iones metálicos reducidos como el hierro y el cobre (reacciones de Fenton y Haber Weiss).

La toxicidad del oxígeno deriva de su naturaleza de radical que le permite llevar a cabo reacciones químicas de oxidación/reducción. La reducción univalente del oxígeno para producir agua es la responsable de la formación de los intermediarios reactivos que se muestran en la **Figura 1.2**.



**Figura 1.2.** Reducción secuencial y univalente de la molécula de oxígeno.

En la naturaleza existen una gran variedad de radicales libres diferentes a los del oxígeno, como por ejemplo, los radicales de azufre (R-S $\cdot$ ) que se originan por la oxidación de compuestos tioles, los radicales de carbón (CCl $_3$ ) y los de metales de transición como el hierro y cobre entre otros (Halliwell y Gutteridge, 1989).

### **1.1.2 Producción de ROS**

Las especies reactivas del oxígeno pueden producirse de forma endógena, a partir de reacciones del metabolismo aerobio, o debido a fuentes exógenas (Freeman y Crapo, 1982).

Entre las reacciones del metabolismo aerobio que dan origen a diferentes tipos de ROS (**Figura 1.1**), las dos más importantes son, la cadena respiratoria mitocondrial y los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y la membrana nuclear.

La cadena respiratoria mitocondrial constituye la principal fuente de ROS, ya que las mitocondrias son los orgánulos donde se consume más del 90% del oxígeno celular (Boveris y Cadenas, 2000). Aunque estudios iniciales determinaron la formación de peróxido de hidrógeno (Jensen, 1966), posteriormente se demostró que éste procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris y Cadenas, 1975). La generación del radical superóxido en la mitocondria se produce cuando los transportadores de la cadena respiratoria, localizados en la membrana mitocondrial interna, están altamente reducidos (Turrens y Boveris, 1980).

Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila y col., 1981) y xenobióticos (Chignell, 1979). De hecho, los citocromos P450 son los oxidantes más poderosos *in vivo*, que actúan activando el oxígeno molecular dando lugar a especies electrofílicas

de oxígeno (bien radicales, o bien generadoras de radicales), que pueden ser liberadas en la célula (Foster y Estabrook, 1993).

Además de estas dos fuentes principales, las especies reactivas del oxígeno también se generan en los peroxisomas (peróxido de hidrógeno), por la autooxidación de pequeñas moléculas (radical superóxido y peróxido de hidrógeno), durante el proceso catalítico de diversas enzimas y proteínas y durante el metabolismo del ácido araquidónico, catalizado por enzimas unidas a la membrana plasmática, como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa (White, 1990).

Las principales fuentes exógenas que influyen en la producción de ROS (**Figura 1.1**) son los factores ambientales como contaminantes, pesticidas, humo del tabaco, disolventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos (Mason y Fisher, 1982).

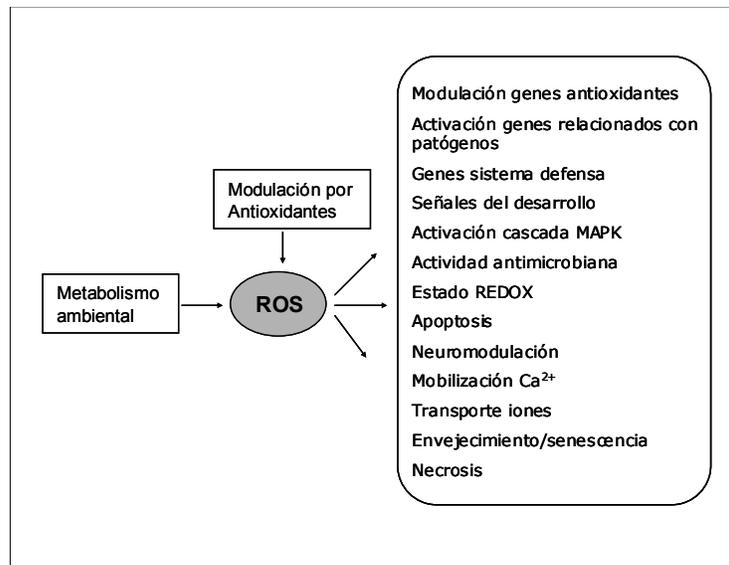
### **1.1.3 Efectos perjudiciales de las especies reactivas del oxígeno**

A concentraciones moderadas, las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante como reguladores de los procesos de comunicación y de señalización intra e intercelular, protegiendo a los organismos frente a infecciones (Finkel, 1998) (**Figura 1.3**).

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, cuando se rompe el equilibrio y se incrementa notablemente su concentración, las especies reactivas del oxígeno son perjudiciales y producen alteraciones dañinas en macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, que afecta a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados o fosfolípidos poliinsaturados, en un proceso autocatalítico que conlleva la fragmentación de estas moléculas y la formación de hidroperóxidos y aldehídos citotóxicos (Aikens y Dix, 1991; Choe y col., 1995). Esta reacción puede desestructurar y alterar las

funciones de las membranas modificando su permeabilidad y conduciendo eventualmente a la lisis y muerte celular (Niki y col. 1991).



**Figura 1.3.** Funciones fisiológicas de ROS.

En general, la oxidación de las proteínas produce un aumento de su hidrofobicidad y, sobre todo, de su sensibilidad a la proteólisis (Martínez-Cayuela, 1995; Shacter, 2000). Según la naturaleza del oxidante y de la proteína, el origen de los cambios es diferente, ya que las especies reactivas del oxígeno pueden actuar sobre algunos aminoácidos convirtiendo sus grupos carboxilos en grupos carbonilo, haciendo a las proteínas más susceptible a la degradación proteolítica o, por otro lado, los enlaces peptídicos pueden ser diana de éstas, originándose entrecruzamientos de cadenas peptídicas (Webster y Nunn, 1988).

En el caso del DNA, las especies reactivas del oxígeno causan alteraciones como mutaciones en pares de bases, eliminaciones, inserciones y reorganizaciones (Wiseman y Halliwell, 1996). El radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) es

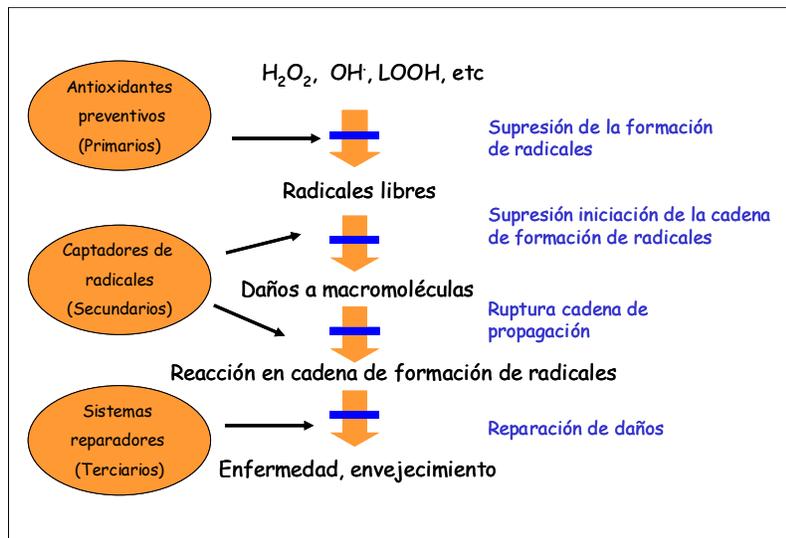
especialmente dañino, modificando las bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas) y la desoxirribosa del DNA (Storz y col., 1987).

## 1.2. Sistemas de defensa antioxidante

Para protegerse contra el daño causado por el estrés oxidativo, las células poseen sistemas de defensa antioxidantes. Estos sistemas de defensa son muy variados y actúan a distintos niveles y en diferentes momentos.

Una sustancia **antioxidante** es aquella que, a concentraciones relativamente bajas respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1989). Según su momento de actuación en el organismo, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios (**Figura 1.4**):

- **Primarios:** Son aquellos que impiden la formación de los radicales libres.



**Figura 1.4.** Clasificación de los antioxidantes por su nivel de actuación.

- **Secundarios:** Interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres por inactivación (Ej. ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol) o desplazan a los radicales libres (Ej. glutatión, carotenoides y mayoría de las enzimas antioxidantes).
- **Terciarios:** Reparar el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que han sido degradadas.

Dentro de los sistemas antioxidantes, se puede hablar de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (**Tabla 1.2**).

**Tabla 1.2.** Sistemas antioxidantes.

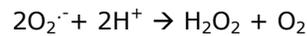
<b>Tipo</b>	<b>Ubicación celular</b>
<b>Enzimáticos</b>	
Superóxido dismutasa (SOD)	Mitocondria (MnSOD) Citosol (Cu-Zn SOD)
GSH peroxidasa	Citosol y mitocondria
Catalasa	Citosol y mitocondria
Tiorredoxina	Citosol y mitocondria
Glutarredoxina	Citosol y mitocondria
<b>No enzimáticos</b>	
Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	Membrana celular
Vitamina C (ácido ascórbico)	Citosol
GSH	Citosol y mitocondria
Ácido lipoico	Citosol, mitocondria y membranas celulares
Carotenoides	Membrana celular
Ubiquinonas	Membrana celular

### 1.2.1 Antioxidantes enzimáticos

Las células disponen de enzimas específicas para la neutralización de las distintas especies reactivas, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutathion peroxidasa (GPX). Además, también contribuyen en la prevención del estrés oxidativo celular las tioredoxinas y la glutarredoxina.

#### Superóxido dismutasa (SOD)

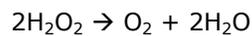
Fueron descritas por primera vez por McCord y Fridovich (1969). Son metaloproteínas que facilitan la dismutación de dos radicales superóxidos originando peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por la catalasa o la glutathion peroxidasa (Fridovich, 1978).



En humanos se han caracterizado tres tipos de SOD, una conteniendo un ión de cobre y otro de zinc (CuZn-SOD) localizada en el citosol, una conteniendo un ión manganeso (Mn-SOD) presente en las mitocondrias (Slot y col., 1986), y otra conteniendo un ión de cobre y otro de zinc (EC-SOD) que se encuentra en la matriz extracelular (Marklund, 1984).

#### Catalasa (CAT)

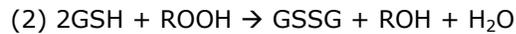
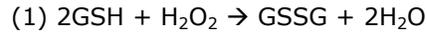
Está involucrada en la destrucción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  generada durante el metabolismo celular.



Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción, pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa. Se localiza mayoritariamente en los peroxisomas.

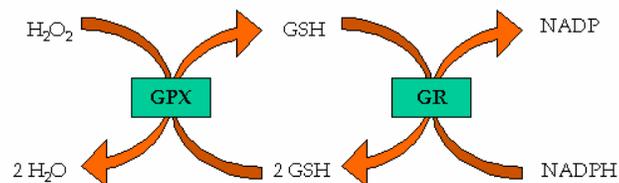
### Glutation peroxidasa (GPX)

Son enzimas del tipo de las oxidoreductasas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (1) y de peróxidos orgánicos (2) usando en ambos casos el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1989):



La GPX es una enzima selenio dependiente muy específica para el GSH pero, sin embargo, poco específica para los hidroperóxidos. Esto, junto al hecho de que la GPX se ubique tanto en el citosol, como en la mitocondria y en la membrana celular, la convierte en un mecanismo de protección celular importante contra el daño oxidativo producido a lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos.

La GPX necesita GSH para poder realizar su función, oxidándolo a glutatión oxidado (GSSG). Por ello, las células disponen de una vía capaz de reducir este GSH. Esta vía está catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), el cual consume NADPH para regenerar el GSH (Collinson y Dawes, 1995) (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5.** Ciclo de oxidación-reducción del glutatión

La enzima GR tiene una distribución celular similar a la GPX. Por tanto, aunque la enzima GR no se considera una enzima antioxidante, su función es esencial para el buen funcionamiento de la GPX.

### **Tiorredoxinas**

Este sistema antioxidante está compuesto por tres proteínas: la tiorredoxina, la tiorredoxina reductasa y la tiorredoxina peroxidasa (Halliwell y Gutteridge, 1989). La tiorredoxina es una óxidoreductasa que cataliza la reducción de puentes disulfuro, por lo que juega un papel importante en la regulación del estado redox de los tioles de las proteínas (Sen, 1998). La forma oxidada de la proteína es reducida directamente por el NADPH y la tiorredoxina reductasa. La tiorredoxina reductasa es capaz de regenerar el ascorbato (May y col., 1997), el cual es un antioxidante no enzimático de gran importancia. La tiorredoxina peroxidasa es una enzima citosólica capaz de transformar el peróxido de hidrógeno y los alquil-hidroperóxidos en agua y alcohol (Netto y col., 1996).

### **Glutarredoxina**

Es una oxidorreductasa implicada en la protección y reparación de los grupos tiol (Starke y col., 1997; Holmgren, 1989). La glutarredoxina establece un ciclo con el glutatión y la glutatión reductasa y se ha especulado la posibilidad de que el glutatión oxidado pueda ser reducido también por la glutarredoxina (Starke y col., 1997). Aunque la glutarredoxina y la tiorredoxina parecen tener una misma función, parece ser que la afinidad por los sustratos es diferente, de forma que ambas se complementan en la reparación de los grupos tiol (Yoshitake y col., 1994).

## **1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos**

### **Vitamina E**

Es un antioxidante liposoluble cuyo término aglutina al menos ocho isómeros estructurales de tocoferoles y tocotrienoles. Entre ellos, el  $\alpha$ -tocoferol es el que tiene mayor actividad antioxidante, y ha sido objeto de un estudio más intenso (Burton y Traber, 1990). La acción antioxidante de la vitamina E reside en su capacidad para neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas. Es uno de los principales protectores de las membranas celulares y lipoproteínas. La neutralización por la vitamina E de un radical provoca la formación del complejo radical-vitamina E, que es reciclado a vitamina E a costa de diversos antioxidantes, como el glutatión o el ascorbato (Burton y Traber, 1990).

### **Vitamina C**

La vitamina C (ácido ascórbico) es un importante antioxidante hidrosoluble, y su forma predominante a pH fisiológico es el anión ascorbato. La vitamina C como agente antioxidante es capaz de neutralizar los radicales superóxido, hidroxilo y lipohidroperóxido. Además, tiene un papel fundamental en la regeneración de la vitamina E (Packer y col., 1979; Burton y Traber, 1990). Al reciclar la vitamina E, se consume el ascorbato pasando a radical ascorbato, el cual puede ser a su vez reciclado por la NADH semiascorbil reductasa, o por tioles celulares como el glutatión o el ácido dihidrolipoico (Sevanian y col., 1985).

### **Ácido $\alpha$ -lipoico**

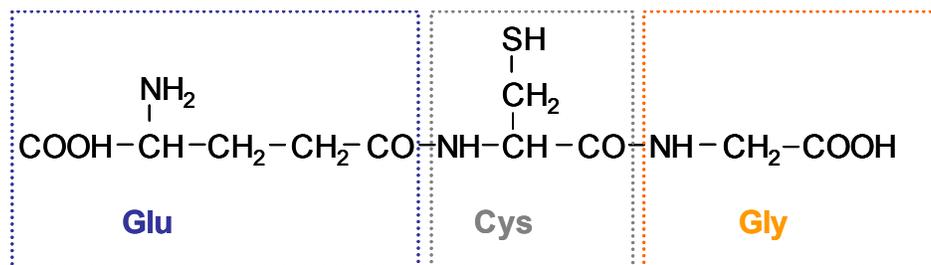
El ácido  $\alpha$ -lipoico es un antioxidante hidro y liposoluble. El ácido  $\alpha$ -lipoico libre (no unido a complejos enzimáticos) es un importante antioxidante debido a su facilidad para ceder electrones. Tiene capacidad de reconstituir las vitaminas E y C (Packer, 1994).

## Carotenoides

Son antioxidantes liposolubles situados principalmente en las membranas, reduciendo la peroxidación lipídica provocada por radicales libres (Krinsky y Denecke, 1982). Las propiedades antioxidantes de los carotenoides residen en su estructura, formada por largas cadenas de dobles enlaces conjugados. Esta disposición permite neutralizar diversos ROS, incluido el radical superóxido y radicales peroxilo (Briviba y Sies, 1994; Yu, 1994).

## Glutation

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina; **Figura 1.6**) Es el tior más abundante presente en los organismos vivos y, predominantemente, en células eucariotas (Meister y Anderson, 1983). Interviene en numerosos procesos celulares y su funcionalidad se debe al grupo tior (SH) de la cisteína.



**Figura 1.6.** Estructura del glutatión.

El GSH actúa directamente como antioxidante, o como cofactor de diversas enzimas, protegiendo el DNA, proteínas y otras biomoléculas frente a ROS. Interviene en procesos metabólicos como la comunicación intramolecular o el transporte de metales, y participa en la regulación del estado redox de las proteínas durante los procesos de degradación y plegamiento (Meister, 1995; Anderson, 1997; Fang y col., 2002; Pastore y col., 2003). El GSH interviene

también en diversos procesos de detoxificación frente a compuestos electrofílicos o metales pesados y es, además, un reservorio de cisteína para la célula (Elskens y col., 1991; Fang y col., 2002).

El 90% del glutatión en la célula se encuentra en su forma reducida, mientras que el 10% restante corresponde a su estado oxidado (GSSG). Además de GSSG, existen otros disulfuros de glutatión presentes en células, tejidos y plasma como, por ejemplo, con el coenzima A (GS-S-CoA) y con la cisteína (GS-S-Cys). También puede encontrarse formando conjugados con las proteínas (GS-S-Prot) (Penninckx, 2002). El GSSG es reducido por la enzima glutatión reductasa a expensas de NADPH (Carmel-Harel y Storz, 2000).

El glutatión puede ser incorporado fácilmente en la dieta ya que se encuentra en frutas y verduras frescas o congeladas, carne y pescado. Fuentes ricas en glutatión son los espárragos, aguacates y nueces (Jones y col., 1995). Mientras que en la leche animal el contenido de GSH es muy escaso (Jones y col., 1995), la leche materna contiene GSH, siendo esta la fuente principal de GSH en los niños recién nacidos (Ankrah y col., 2000).

En humanos, niveles reducidos de GSH están relacionados con diversas enfermedades, como infecciones por VIH, cirrosis hepática, enfermedades pulmonares, cataratas, inflamaciones gastrointestinales y pancreáticas, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y también con el envejecimiento (Anderson, 1998; Townsed y col., 2003; Wu y col., 2004). El consumo de glutatión a partir de frutas y vegetales, se ha relacionado con la protección contra algunos tipos de cáncer (Sen, 1997; Flagg y col., 1994; Valencia y col., 2001b), demostrándose tanto en estudios *in vitro* (Donnerstag y col., 1996) como en estudios *in vivo* (Trickler y col., 1993).

El GSH se utiliza como compuesto farmacéutico ya que su aplicación por vía intravenosa o intramuscular es útil para prevenir la formación de trombos en las intervenciones quirúrgicas (Molloy y col., 1998), reduce los efectos secundarios e incrementa la eficacia de drogas quimioterapéuticas (Smyth y col., 1997), y reduce la presión sanguínea cuando ésta es elevada en personas diabéticas (Ceriello y col., 1991). La incorporación de glutatión en la formulación

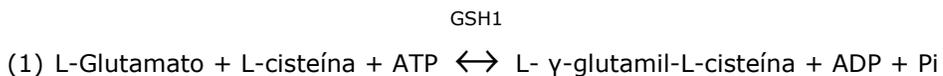
de un spray nasal ha permitido reducir los síntomas de la rinitis crónica (Testa y col., 1995).

Por sus propiedades antioxidantes, también se emplea como aditivo en la industria cosmética, para la fabricación de cremas faciales (Nakajima y Fukuda, 1997; Shinmoto y col., 2002) y distintos cosméticos (Katano y Watanabe, 1989; Kubo y Takahashi, 2001). Además, se utiliza en la industria alimentaria como suplemento en productos para la alimentación infantil (Niki y col., 1970, Harzer y col., 1991; Tamura y col., 2003; Yamauchi y col., 2003), como conservante para alimentos (Troller, 1966) y para su uso en suplementos de la dieta para mejorar el sistema inmunológico (Meydani y Meydani, 2000).

Debido a sus numerosas e importantes propiedades, hay un interés creciente en la obtención de glutathion.

### 1.3 Biosíntesis del glutathion

El GSH se sintetiza a nivel intracelular por la acción consecutiva de la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (GSH1) y la glutathion sintetasa (GSH2), dos enzimas presentes en el citosol (Meister y Anderson, 1983; Anderson, 1998), que catalizan las siguientes reacciones:

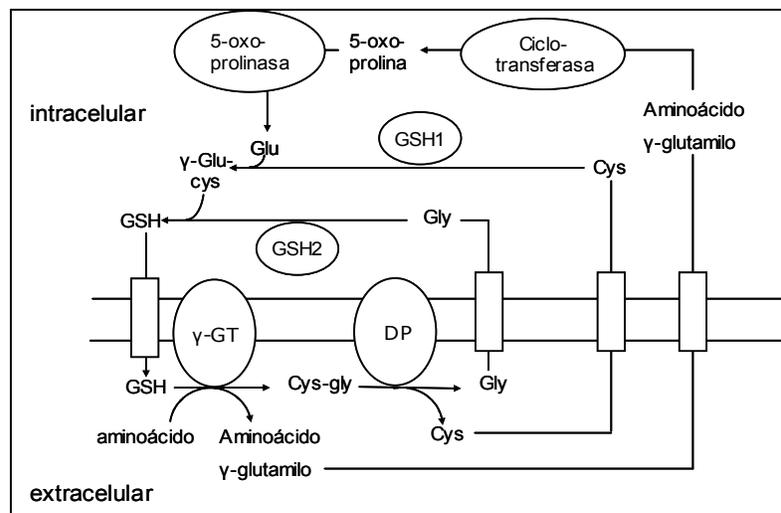


En la primera reacción, el grupo  $\gamma$ -carboxilo del glutamato, reacciona con el grupo amino de la cisteína formando un enlace  $\gamma$ -peptídico que protege al GSH de la hidrólisis de las peptidasas intracelulares. En la segunda, el dipéptido reacciona con la glicina originándose el tripéptido (**Figura 1.6**).

La enzima GSH1 está regulada por la concentración de GSH, por un efecto de retroinhibición o inhibición por producto final (Griffith y Mulcahy, 1999).

Aunque los niveles intracelulares de aminoácidos varían entre especies, tejidos y dependen del nivel nutricional, los niveles de L-cisteína son significativamente menores que los de L-glutamato o L-glicina (Griffith y Mulcahy, 1999), por lo que la disponibilidad de L-cisteína es el factor limitante en la síntesis de GSH (Tateishi y col., 1974). La síntesis de GSH requiere ATP, por lo que este sustrato también puede llegar a ser limitante (Suzuki y Kurata, 1992).

Los niveles de glutatión están controlados homeostáticamente, siendo continuamente reajustados con respecto al balance entre su biosíntesis directa (GSH1 y GSH2), su obtención a partir de GSSG por acción de la GSH reductasa y su utilización como cofactor por numerosas enzimas (peroxidasas, transferasas, transhidrogenasas y transpeptidasas). La degradación de GSH está catalizada por la  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa ( $\gamma$ -GT) y dipeptidasas (DP) (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7.** Síntesis y degradación del glutatión.

Los primeros estudios con respecto a las necesidades y funciones de protección del GSH contra el estrés oxidativo, se llevaron a cabo en bacterias. Dichos estudios demostraron que el GSH no es esencial en condiciones normales de crecimiento (Apontoweil y Berends, 1975). Sorprendentemente, incluso cepas incapaces de sintetizar glutatión, no vieron afectada su resistencia a oxidantes y, además, eran capaces de inducir una respuesta adaptativa al peróxido de hidrógeno y al choque térmico (Greenberg y Demple, 1986). Sin embargo, estos resultados se contraponen con lo que ocurre en células eucariotas, donde la deficiencia en GSH provoca daño celular (Jain y col., 1991; Martensson y col., 1991).

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con bajos niveles de GSH, obtenidas mediante mutaciones en el gen *GSH1*, presentaban baja velocidad de crecimiento y defectos mitocondriales (Kistler y col., 1990; Grant y col., 1996). Un doble mutante *GSH1* y *GSH2* es todavía viable, pero presenta una tasa de crecimiento menor que las células salvajes y defectos en la esporulación (Kistler y col., 1990). Por tanto, las necesidades de GSH son distintas entre eucariotas y procariotas.

## **1.4 Producción biotecnológica de glutatión**

El GSH fue descubierto en un extracto de la levadura *S. cerevisiae* por Rey-Pailhade en 1888 (Valencia y col., 2001a). Sin embargo, su nombre actual se utilizó a partir del descubrimiento de su estructura molecular en 1921 (Hopkins, 1921). Desde entonces, se han realizado numerosas investigaciones con respecto a la producción y uso de este compuesto. La importancia del GSH ha estimulado la investigación en una gran variedad de campos de la biología y ha influenciado en parte la medicina clínica y la nutrición (Hamers y col., 1993; Lomaestro y Malone, 1995; Udeh y Achremowicz, 1997).

El descubrimiento de la presencia de glutatión en muchos organismos, incrementó el interés por realizar su extracción a partir de tejidos animales y de

plantas. Sin embargo, la cantidad limitada de material y su relativa baja cantidad intracelular, hacía que el producto obtenido fuese muy caro.

El GSH puede sintetizarse por vía química (Harington y Mead, 1935) pero, aunque este proceso se comercializó en los años 50, el producto obtenido es una mezcla racémica. Debido a que sólo el isómero L- es fisiológicamente activo, es necesario la resolución de dicha mezcla para separar la forma activa L- del isómero D.

El estudio de la biosíntesis del GSH en un hígado aislado y la caracterización de su ruta de síntesis (Bloch, 1949), despertó el interés por la producción de GSH por vía fermentativa o enzimática. Estas investigaciones tuvieron un gran auge en Japón, sobre todo entre 1976 y 1985, dando lugar, a principios de la década de los 80, a la comercialización de GSH producido industrialmente mediante fermentación de levaduras. Hasta la fecha, la producción enzimática de GSH no ha alcanzado niveles industriales debido al elevado coste de producción (Li y col., 2004).

#### **1.4.1 Síntesis enzimática**

Los primeros trabajos de síntesis enzimática de GSH se realizaron mediante bioconversión, utilizando tanto células intactas como extractos celulares de *S. cerevisiae* (Miwa, 1976; Miyamoto y Miwa, 1977). Posteriormente se han utilizado otros microorganismos como *E. coli* (Fujio y col., 1985), *Candida krusei* (Yokozeki y col., 1985) y *Corynebacterium glutamicum* (Fujio y col., 1985), entre otros.

Los elementos esenciales que constituyen este proceso de síntesis son: las enzimas GSH1 y GSH2, aminoácidos precursores (L-glutamato L-cisteína, glicina), ATP, Mg<sup>2+</sup> (cofactor) y un control de pH apropiado (normalmente 7,5).

Mediante este proceso de síntesis enzimática se logró alcanzar concentraciones de GSH de hasta 9 g/L utilizando células intactas de

*S. cerevisiae* (Miwa, 1978). Sin embargo, el coste de producción se incrementa por el uso de los aminoácidos precursores y del ATP, convirtiéndolo en un proceso económicamente inviable.

La utilización de un solo organismo para llevar a cabo, de forma simultánea, tanto la biosíntesis de GSH como la regeneración de ATP, no permitió obtener buenos resultados (Shimosaka y col., 1982). Por ello, se desarrollaron procesos utilizando dos o más microorganismos, con el objetivo de obtener una forma viable de regenerar ATP. Así, la reacción catalizada por la acetato quinasa en *E. coli*, se utilizó como sistema de regeneración de ATP y se acopló a la biosíntesis de GSH (Langer y col., 1976). Sin embargo, el sustrato de esta enzima, acetil fosfato, era inestable y caro. Murata y colaboradores utilizaron con éxito la ruta glucolítica de *S. cerevisiae* como sistema para regenerar ATP (Murata y col., 1981). Desafortunadamente, cuando la disponibilidad económica de ATP dejó de ser un problema, la baja actividad de las enzimas GSH1 y GSH2 se convirtió en el factor limitante. La necesidad de incrementar las actividades de ambas enzimas aceleró las aplicaciones de la biología molecular y de la ingeniería genética en la biosíntesis de GSH.

#### **1.4.2 Producción por fermentación**

El objetivo final de la producción biotecnológica de GSH es conseguir una elevada concentración de GSH, tanto por el aumento del contenido intracelular del tripéptido como de la biomasa. Mientras que el contenido intracelular de GSH se puede mejorar de manera significativa mediante mutagénesis o técnicas de DNA recombinante (apartado 1.4.3), el incremento de la biomasa se puede conseguir mediante la optimización y el control del proceso. Además, si la estrategia de control es adecuada, también se puede incrementar la producción específica de GSH (De Martín, 2005).

Debido al alto contenido intracelular en GSH (0,1-1% del peso seco) de las cepas salvajes, *S. cerevisiae* y *Candida utilis* son los microorganismos que se emplean normalmente a escala industrial. En la mayoría de los casos, se han

realizado procesos de mutagénesis y selección con el objetivo de evitar o disminuir la retroinhibición de GSH1 por glutation, y se han obtenido cepas cuyo contenido en GSH constituía entre el 3-5% del peso seco celular (Li y col., 2004).

En cuanto al incremento de la biomasa, uno de los métodos más efectivos para conseguir una elevada densidad celular es el cultivo en fed-batch. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) durante el cultivo se debe controlar cuidadosamente para evitar un descenso en el contenido intracelular de GSH. Esta estrategia de control permitió mejorar la producción de GSH un 40% en cepas de *S. cerevisiae* (Shimizu y col., 1991). El control de la concentración del etanol producido durante la fermentación, también permitió incrementar la producción de GSH hasta un 40% (Alfajara y col., 1993; Sakato y Tanaka, 1992).

La adición de los aminoácidos precursores al medio de fermentación ha sido otra de las estrategias para incrementar la producción del tripéptido. Debido a que la L-cisteína es tóxica a concentraciones mayores de 0,7 mmol/g (Alfajara y col., 1992), es necesario desarrollar una adecuada estrategia de adición para mejorar la producción de GSH sin inhibir el crecimiento. En una cepa recombinante de *E. coli*, la adición de L-cisteína aumentó la concentración de GSH un 40% (Li y col., 1998a). Además de la cisteína, la adición a cultivos de *S. cerevisiae* de otra serie de compuestos como suplementos de aminoácidos (Watanabe y col., 1986), etanol (Yoshio y col., 2005), ácido p-aminobenzoico (Kinoshita y col., 1986) y lactato sódico (Hirakawa y col., 1985), también permitieron incrementar entre un 1,4% y un 94% la producción de GSH.

Hay pocos informes sobre la selección de procariotas productores de GSH. La obtención de mutantes de *E. coli* resistentes a selenio permitió obtener cepas que producían entre un 9 y un 173% más glutation en comparación con la cepa salvaje (Schmidt y Konetzka, 1986). El descubrimiento de la producción de GSH en una cianobacteria (Fahey y col., 1978), impulsó una serie de estudios enfocados a encontrar buenos productores entre las microalgas y cianobacterias. Estas últimas, presentan diferencias relacionadas con la síntesis de GSH, en

comparación a levaduras o *E. coli*. Así, por ejemplo, la cianobacteria *Phormidium lapideum* produce GSH en presencia de sus aminoácidos precursores y ATP, que se regenera a partir de ADP utilizando la luz como fuente de energía externa, o en condiciones de oscuridad, cuando, supuestamente, el ATP se regeneraba a partir de un sistema respiratorio activo en oscuridad (Sawa y col., 1986). La producción de GSH por el alga *Dunaliella* sp. llegó a tener interés industrial, ya que se lograron alcanzar contenidos de GSH del 2,38% del peso seco en medios con sólo nutrientes inorgánicos (Yamaoka y Takimura, 1990). Aunque la baja concentración de biomasa limitaba la concentración final de GSH, este estudio plantea alternativas para la producción de aditivos con alto contenido en este compuesto.

### 1.4.3 Nuevas estrategias

Como se ha mencionado anteriormente, el GSH se sintetiza a partir de dos reacciones consecutivas, catalizadas por GSH1 y GSH2. La retroinhibición del GSH sobre GSH1 o la presencia de  $\gamma$ -GT que degrada al GSH sintetizado intracelularmente, son los principales problemas para lograr incrementar el contenido de GSH en la célula.

Aunque hay muchas fuentes microbianas de GSH, la alternativa de *S. cerevisiae* es la más utilizada, no sólo por su facilidad de manipulación, sino también por el bajo coste operacional con respecto a otras posibles fuentes (Ostergaard y col., 2000).

Diversos estudios se centraron en la clonación de los genes tanto en *S. cerevisiae* como en *E. coli*, lo cual permitió duplicar el contenido intracelular de GSH (Murata y col., 1983; Ohtake y col., 1988; Ohtake y col., 1989). En la **Tabla 1.3** se muestran diversas estrategias utilizadas para incrementar la producción de GSH.

El desarrollo de estos estudios y estrategias permiten desarrollar nuevos procesos biotecnológicos que logren disminuir los costes de producción,

abaratando el precio del tripéptido. De lograrlo, este hecho incrementaría las aplicaciones y la utilización de GSH.

**Tabla 1.3.** Estrategias para la producción de GSH con microorganismos recombinantes. (Li y col., 2004).

Cepa	Estrategia	[GSH] mutante	[GSH] parental	Incremento	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>	Cambio promotor de <i>GSH1</i>	24 mg/g	3 mg/g	7	Tezuka y col. (1987)
<i>S. cerevisiae</i>	Aumento resistencia a estrés oxidativo	ND	ND	2,5	Kimura y col. (1996)
<i>S. cerevisiae</i>	Aumento dosis génica <i>GSH1</i>	13,1 mg/g	8,7 mg/g	1,5	Fan y col. (2004)
<i>E. coli</i>	Complementación cepas GSH deficientes	2,42 mg/g	0,5 mg/g	3,4	Kimura y Murata (1983)
<i>L. lactis</i>	Introducción <i>GSH1</i> y <i>GSH2</i> de <i>E. coli</i>	55 mg/g	No produce	-	Li y col. (2005)

ND: No determinado

## 1. 5 *Saccharomyces cerevisiae*

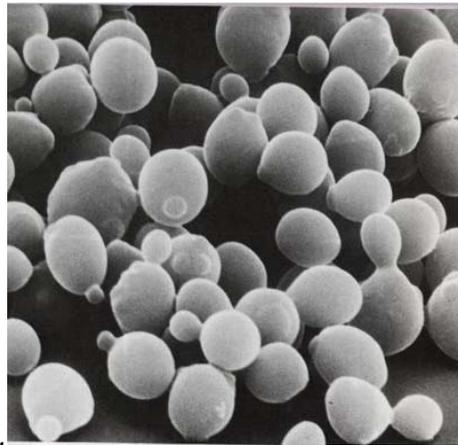
Las levaduras son hongos unicelulares que representan un “puente biológico” entre bacterias y organismos superiores, manteniendo las ventajas de los microorganismos en cuanto a su fácil manipulación y crecimiento rápido.

*Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 1.8**) es quizás la levadura más importante para la humanidad, ya sea por su utilización desde hace miles de años en la producción de pan y bebidas alcohólicas por fermentación, o por ser uno de los organismos eucarióticos modelo más intensamente estudiados a nivel de su biología celular y molecular.

Debido a su relevancia y al amplio conocimiento a nivel genético, el primer genoma eucariota completamente secuenciado fue el de esta levadura (Goffeau y col., 1996). El análisis del mismo reveló un tamaño de unas 13.000 kb y unos 6.275 genes. El 72% de las secuencias corresponden a

secuencias codificantes siendo el tamaño promedio de los genes de 1,45 kb y solamente el 3,8% de los ORFs contienen intrones. Estudios comparativos de las secuencias permitieron estimar que el 23% de su genoma es similar al de los humanos.

La reproducción de las levaduras, en especial las utilizadas industrialmente, es normalmente asexual, a través de la gemación en la superficie, pero la reproducción sexual también se puede dar en determinadas condiciones.



**Figura 1.8.** Micrografía electrónica de barrido de *S. cerevisiae*.

Como hospedador para la producción de proteínas con interés biotecnológico, *S. cerevisiae* presenta varias ventajas sobre las bacterias (Romanos y col., 1992). Al ser células eucarióticas, permiten realizar los procesos de expresión y maduración característicos de las células animales. Entre otras ventajas que presenta esta levadura destacan: ser capaz de realizar modificaciones post-traduccionales (Ej. acetilaciones N-terminales, N-glicosilaciones y fosforilaciones), necesarias para la actividad biológica total de las proteínas expresadas, y ser un microorganismo seguro desde el punto de

vista alimentario, ya que posee el estatus GRAS (generally recognized as safe) que otorga la FDA (Food and Drug Administration) americana (Ostergaard y col., 2000).

### **1.5.1 *S. cerevisiae* y estrés oxidativo**

Las levaduras tienen una gran similitud con las células animales tanto a nivel macromolecular como de orgánulos, y se ha demostrado que cierto número de proteínas de las levaduras tienen funciones intercambiables con sus homólogas humanas. Por tanto, *S. cerevisiae* es un modelo muy conveniente para el análisis de los mecanismos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo.

Además, su fácil manipulación genética y fisiológica, a través de la manipulación de las condiciones ambientales y de crecimiento (Moradas-Ferreira y Costa, 2000), la secuencia completa de su genoma y la existencia de microarrays comerciales, han permitido realizar diversos análisis sobre los cambios que se producen en el transcriptoma durante el proceso de adaptación celular a condiciones de estrés (Ter Linde y col., 1999; Kuhn y col., 2001; Momose e Iwahashi, 2001; Boer y col., 2003).

En *S. cerevisiae*, las respuestas ante el estrés producido por diferentes agentes (temperatura, falta de nutrientes, etanol, oxidantes, metales pesados, pH, etc) comparten mecanismos comunes, aunque existen cambios genéticos y bioquímicos específicos dependiendo del agente causante del estrés. *S. cerevisiae* "detecta" el estrés oxidativo y genera una respuesta a nivel molecular induciendo los sistemas de defensa antioxidantes primarios y secundarios (Costa y Moradas-Ferreira, 2001). En respuesta a este estrés oxidativo, se activan en la célula rutas de transmisión de señal y factores de transcripción específicos, que aumentan la expresión de genes que codifican para las proteínas antioxidantes. Esta respuesta específica al estrés oxidativo tiene como función disminuir los niveles de ROS así como reparar los daños producidos por estos oxidantes. La **Tabla 1.4** muestra los genes, las enzimas y

las proteínas reguladoras más relevantes, que constituyen los sistemas implicados en la respuesta a estrés oxidativo en *S. cerevisiae*.

**Tabla 1.4.** Sistemas antioxidantes en *S. cerevisiae*

Nombre	Gen	Enzima	Regulador
Glutation	<i>GSH1</i>	Glutamilcisteinil sintetasa	YAP1
	<i>GSH2</i>	Glutation sintetasa	
	<i>GLR1</i>	Glutation reductasa	YAP1
Tiorredoxina	<i>TRX1</i>	Tiorredoxina (citoplasma)	
	<i>TRX2</i>	Tiorredoxina (citoplasma)	YAP1/SKN7
	<i>TRR1</i>	Tiorredoxin reductasa I (citoplasma)	YAP1/SKN7
	<i>TRX3</i>	Tiorredoxina (mitocondria)	
	<i>TRR2</i>	Tiorredoxin reductasa II (mitocondria)	
Glutarredoxina	<i>GRX1</i>	Glutarredoxina (citoplasma)	
	<i>GRX2</i>	Glutarredoxina (citoplasma)	YAP1
	<i>GRX3 GRX4</i>	Glutarredoxina (núcleo)	
	<i>GRX5</i>	Glutarredoxina (mitocondria)	
Superóxido dismutasa	<i>SOD1</i>	Cu-ZnSOD (citoplasma)	YAP1/SKN7
	<i>SOD2</i>	Mn-SOD (mitocondria)	YAP1/SKN7
Catalasa	<i>CTA</i>	Catalasa A (peroxisoma)	YAP1/SKN7
	<i>CTT</i>	Catalasa T (mitocondria)	YAP1/SKN7 MSN2/MSN4
Metalotioneina	<i>CUP1</i>	Metalotioneina	ACE1
	<i>CRS5</i>	Metalotioneina	
Endonucleasa	<i>APN1</i>	Endonucleasa apurinica	
Ruta pentosas fosfato	<i>ZWF1</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	YAP1
	<i>TKL1</i>	Transcetolasa	
	<i>RPE1</i>	Ribulosa 5-fosfato epimerasa	
Glutation peroxidasa	<i>GPX1 GPX3</i>	glutation peroxidasa	
	<i>GPX2</i>	glutation peroxidasa	YAP1
Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA1 AHP1</i>	tiorredoxina peroxidasa	YAP1/SKN7

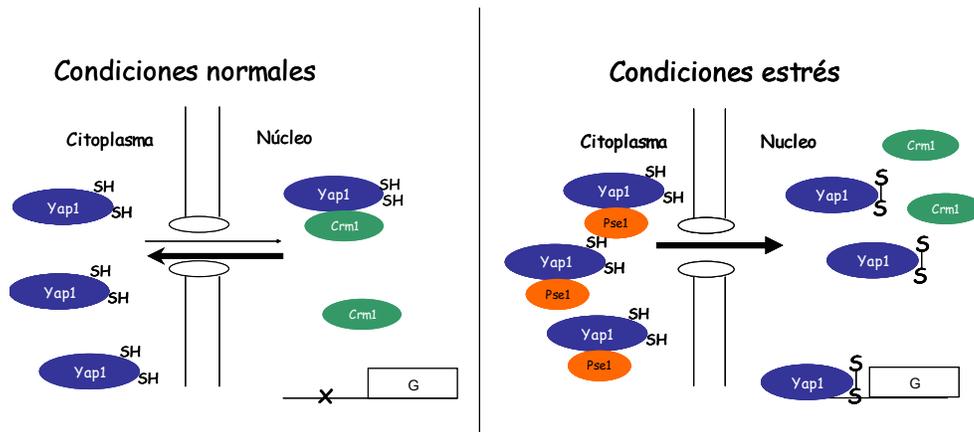
Para que las células respondan a una situación de estrés oxidativo, es necesaria la presencia de proteínas cuya actividad esté regulada por los procesos de oxidación/reducción. Aunque se han identificado diferentes factores de transcripción de genes antioxidantes (**Tabla 1.4**), a continuación se describen los dos más importantes (YAP1 y SKN7) que, además, están directamente relacionados con el glutathione.

El gen *YAP1* de *S. cerevisiae* codifica para una proteína que contiene un dominio básico con cremallera de leucina (b-ZIP), similar al encontrado en la familia de activadores transcripcionales de mamíferos c-jun (Harshman y col., 1988; Fernandes y col., 1997). YAP1 juega un papel importante en la protección contra estrés oxidativo (Stephen y col. 1995), ya que su sobreexpresión confiere resistencia a agentes tóxicos como el cadmio, y cepas mutantes en YAP1 son hipersensibles a oxidantes (Fernandes y col., 1997). YAP1 se encuentra normalmente en el citoplasma (**Figura 1.9**), pero en respuesta a estrés oxidativo, se acumula en el núcleo (Toone y Jones, 1999). Esta proteína contiene en la región C-terminal tres residuos conservados de cisteína formando el dominio CRD (cystein-rich domain, dominio rico en cisteína) y se postula que la oxidación de esas cisteínas actúa como sensor del estado redox (Kuge y col. 1997; Delaunay y col. 2000).

YAP1 también presenta una secuencia que interacciona con el factor de exportación CRM1 que, en condiciones normales, mantiene a YAP1 en el citoplasma. En situación de estrés oxidativo, la interacción entre CRM1 y YAP1 es inhibida (por la oxidación de las cisteínas de CRD) y una  $\beta$ -importina (PseI) transporta a YAP1 al núcleo (Isoyama y col., 2001). Una vez en el núcleo, YAP1 se une al elemento de respuesta AP-1 (ARE, TGACTCA), presente en los promotores de genes que codifican para proteínas implicadas en respuesta a estrés (**Figura 1.9**), cuya expresión, de este modo, dependerá de YAP1.

SKN7 es un factor de transcripción que, junto con SLN1, está involucrado en la respuesta a estrés osmótico y regula la expresión, entre otros, del gen de la tiorredoxina TRX2 (Li y col., 1998b). Por otro lado, SKN7 interviene en la respuesta al estrés oxidativo y se superpone parcialmente con la

función de YAP1 (Lee y col., 1999; Morgan y col., 1997). Así, algunos genes dependientes de YAP1 que codifican para proteínas antioxidantes, son también dependientes de SKN7. YAP1 y SKN7 son esenciales para la resistencia a peróxidos (Ej. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxido de terc-butilo), pero solo YAP1 se requiere para la resistencia a cadmio. SKN7 no solo es dispensable para la resistencia a cadmio, si no que además, ejerce un efecto negativo frente a la tolerancia de dicho metal pesado (Lee y col., 1999).

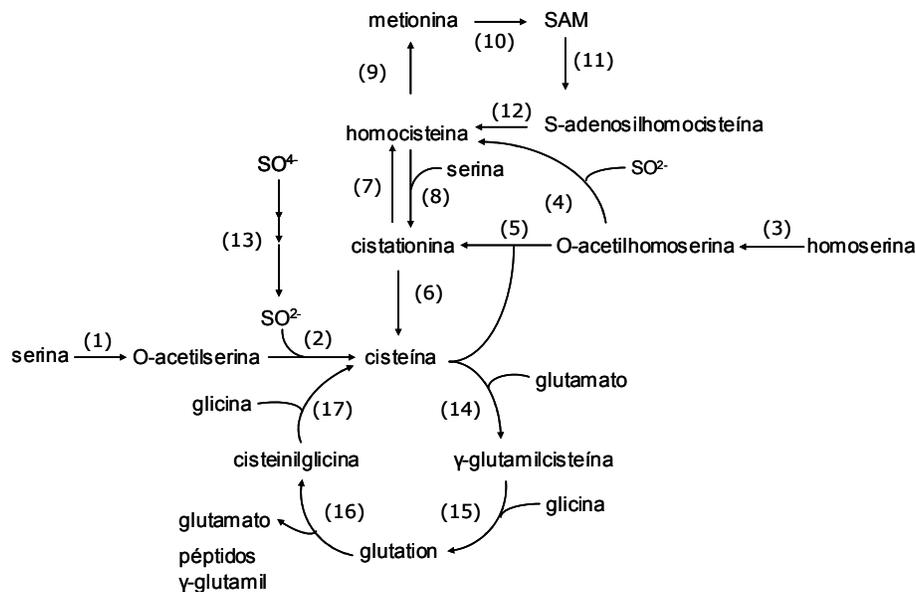


**Figura 1.9.** Regulación de la localización intracelular de YAP1. G: Gen, x: ARE.

YAP1 controla la mayor parte de los genes implicados en la resistencia a hidroperóxidos, cuyo grupo está dividido en dos tipos de genes, que se diferencian por el requerimiento de SKN7 (Lee y col. 1999). SKN7 tienen diferentes sitios de unión al DNA lo que sugiere que la especificidad de unión a cada uno de estos sitios lo dan otras proteínas que también se unen al DNA e interactúan con SKN7.

### 1.5.2 Metabolismo del azufre y glutation

El ciclo del GSH en las levaduras está estrechamente ligado al metabolismo del azufre (**Figura 1.10**). Así, en condiciones en las que existe un exceso de azufre, éste se incorpora en las células en forma de GSH. Por el contrario, cuando las células tienen falta de azufre, *S. cerevisiae* utiliza el GSH como fuente de azufre endógena (Elskens y col., 1991) hasta que éste alcanza una concentración crítica, aproximadamente el 10% de su valor normal (Penninckx, 2000).



**Figura 1.10.** Metabolismo del azufre en *S. cerevisiae* (Penninckx, 2000). 1) Serina acetiltransferasa; 2) cisteína sintetasa; 3) homoserina acetiltransferasa; 4) homocisteína sintetasa; 5)  $\gamma$ -cistationina sintetasa; 6)  $\gamma$ -cistationasa; 7)  $\beta$ -cistationasa; 8)  $\beta$ -cistationina sintetasa; 9) homocisteína metiltransferasa; 10) S-adenosilmetionina sintetasa; 11) S-adenosilmetionina demetilasa; 12) adenosilhomocisteinasa; 13) reducción de sulfato; 14)  $\gamma$ -glutamilcisteinil sintetasa; 15) GSH sintetasa; 16)  $\gamma$ -glutamiltranspeptidasa; 17) cisteinilglicina dipeptidasa.

El catabolismo del GSH se produce por un incremento en la actividad  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ -GT) que provoca la degradación del GSH en sus tres aminoácidos.

#### **1.5.4 Estrés nutricional y ambiental**

Cuando *S. cerevisiae*, previamente crecida en un medio mínimo conteniendo sulfato amónico como única fuente de nitrógeno, se transfiere a un medio que carece de ésta, la concentración intracelular de GSH aumenta de 7 a 17 nmoles/mg de peso seco en una generación (Mehdi y Penninckx, 1997). Durante el crecimiento en el medio con fuente de nitrógeno, aproximadamente el 50% del GSH se encuentra en el citoplasma y el resto se almacena en la vacuola central. La ausencia de nitrógeno provoca un desplazamiento del GSH hacia la vacuola central donde se acumula (más del 90%). La vacuola central en *S. cerevisiae* es utilizada como sitio de almacenaje y se han identificado varios sistemas de transporte de aminoácidos e iones en su membrana (Garril, 1994). Debido al estrés nutricional por la falta de nitrógeno, el GSH almacenado en la vacuola central es hidrolizado por la  $\gamma$ -GT y la cisteinilglicina dipeptidasa, dos glicoproteínas que se encuentran ancladas en la membrana vacuolar, liberándose los tres aminoácidos constituyentes.

La exposición de levaduras frente a xenobióticos o metales pesados como el cadmio, produce lo que se denomina "estrés ambiental" (Penninckx, 2000). Frente a dicho estrés, las levaduras activan la transcripción de YCF1 (Wemmie y col., 1994). YCF1 es un transportador ABC (*ATP bound carrier*, transportador ligado a ATP) que confiere resistencia a cadmio, a otros metales pesados y a compuestos tóxicos, transportándolos al interior de la vacuola en forma de complejos o conjugados con glutation (Li y col., 1996; Mendoza-Cózatl y col., 2005). Además de YCF1, otras proteínas, como COT1 y ZRC1, participan en los procesos de detoxificación debidos a metales pesados (MacDiarmid y col., 2002).

## **1. 6 Mejora de cepas para uso industrial**

A excepción de la industria de alimentos, solo unos pocos procesos comerciales de fermentación utilizan cepas silvestres aisladas directamente de la naturaleza. En la mayoría de los casos se utilizan cepas mejoradas específicamente para la producción de antibióticos, enzimas y otros metabolitos (Crueger y Crueger, 1989; Vinci y Byng, 1999; Parekh y col. 2000; Adrio y Demain, 2005). En general, el principal motivo para el desarrollo industrial de cepas es el económico, ya que las concentraciones de metabolitos producidas por las cepas silvestres son demasiado bajas para desarrollar un proceso a escala industrial. A través de un extenso programa de desarrollo de cepas pueden conseguirse los incrementos de producción necesarios para rentabilizar dichos procesos (Crueger y Crueger, 1989).

El éxito de los programas depende del tipo de metabolito o proteína a producir. El rendimiento de aquellos productos que suponen la actividad de uno o pocos genes, como en las enzimas, puede incrementarse simplemente aumentando la dosis génica. Sin embargo, con los metabolitos secundarios, que frecuentemente son los productos finales de complejos procesos biosintéticos altamente regulados, puede ser necesaria una gran cantidad de cambios en el genoma para permitir la selección de cepas de alta producción (Crueger y Crueger, 1989).

La manipulación genética de microorganismos y células permite modificar el genoma con el objetivo de proporcionar nuevas características. Existen varios métodos para la mejora de cepas (Vinci y Byng, 1999; Adrio y Demain, 2005):

- Los métodos clásicos de mutación al azar y selección.
- Mutagénesis dirigida hacia un gen o genes dianas del organismo.
- Obtención de un nuevo genotipo a través de la recombinación de material genético entre secuencias homólogas de DNA de dos orígenes diferentes.

- Modificación de genes y/o rutas metabólicas mediante la alteración o introducción de genes en la cepa productora.

### **1.6.1 Mutagénesis clásica**

La mutación se puede definir como cualquier alteración permanente de la secuencia de bases de un ácido nucleico (DNA o RNA) no producida por recombinación. Aunque el cambio producido por la mutación es, generalmente, perjudicial para el organismo y eliminado del mismo por la selección, algunas mutaciones son beneficiosas para el microorganismo. Incluso si no son beneficiosas para el microorganismo, pero sí lo son para el hombre, dichas mutaciones pueden ser seleccionadas y preservadas indefinidamente. Las mutaciones pueden afectar a genes estructurales o zonas de regulación del genoma, alterando la función o la cantidad de producto génico. Pese a la aparición durante las últimas décadas de nuevas tecnologías genéticas (Ej. clonación, genómica, proteómica, metabolómica, evolución dirigida y biosíntesis aleatoria), el éxito del desarrollo de cepas en la industria a lo largo de la segunda mitad del siglo XX se debe, básicamente, a la aplicación extensiva de la mutación y selección (Adrio y Demain, 2006).

La metodología más común para la obtención de mutantes altamente productores, es tratar a la población con un agente mutagénico hasta la obtención de un cierto nivel de mortalidad, crecer en placa a los supervivientes en un medio selectivo y analizar la producción del metabolito o enzima en cada una de las colonias seleccionadas al azar (Balz, 1986; Balz, 1999). El nivel óptimo de mortalidad para lograr incrementar la producción de antibióticos se estima en un rango del 70 al 95% (Simpson y Caten, 1979), aunque algunos programas de mejora utilizan niveles por encima del 99% de mortalidad.

El tipo de lesión genética inducida depende del tipo de agente mutagénico empleado. Entre los agentes mutagénicos más utilizados se encuentran la luz ultravioleta, el ácido nitroso, el etilmetanosulfonato (EMS), el metil metano sulfonato (MMS) y la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG).

Los tres últimos son agentes alquilantes que generan alteraciones en el material genético (transiciones, transversiones, eliminaciones) siendo los mutágenos más utilizados.

La NTG actúa preferentemente sobre la horquilla de replicación (Guerola y Cerdá-Olmedo, 1975) causando múltiples mutaciones en genes próximos mediante un proceso conocido como conmutación (Cerdá-Olmedo y Ruiz Vázquez, 1979; Saunders y Saunders, 1987). La conmutación incrementa la probabilidad de que las células que presenten mutaciones en un gen, muestren también mutaciones en los genes vecinos o, incluso, en genes distantes que son replicados simultáneamente por diferentes horquillas de replicación.

El principal mecanismo por el cual la NTG causa mutaciones es el apareamiento incorrecto de bases. Los errores producidos durante la replicación por la copia de estas bases metiladas, fundamentalmente O<sup>6</sup>-metilguanina, originan transiciones GC → AT. Este hecho ha sido confirmado por estudios de resonancia magnética nuclear, que confirman que la O<sup>6</sup>-metilguanina puede formar enlaces por puente de hidrógeno con la timina pero no con la citosina (Williams y Shaw, 1987).

### **1.6.2 Ingeniería genética**

Otra manera de mejorar una cepa para uso industrial es mediante la utilización de sistemas de expresión de genes, incrementando la dosis génica del gen de interés para la producción de metabolitos.

*S. cerevisiae* constituye un buen sistema de expresión heterólogo para la producción de proteínas de interés, ya que posee una buena eficiencia de transformación, tasa de crecimiento y, por otro lado, permite llevar a cabo todo el procesamiento posttraduccional de proteínas eucariotas (Romanos y col., 1992).

Existen diferentes sistemas de expresión en *S. cerevisiae*, cada uno con una serie de características apropiadas para fines concretos. En general, los vectores de levadura, aparte de secuencias de levadura, contienen también secuencias de vectores bacterianos, previstas para su amplificación y manejo sobre todo en *Escherichia coli*. Un tipo de vectores, son los **vectores episómicos** (YEp) (Sander y col., 1994; Seo y col., 2003), que se replican de forma libre. Algunos de ellos contienen el origen de replicación de un plásmido natural de *S. cerevisiae*, el plásmido de 2  $\mu$ m. Estos vectores se mantienen en un número de copias de 50-200 por célula (Broach, 1983) y son estables para la producción de proteínas a nivel de laboratorio (Som y col., 1988). Otros vectores utilizan orígenes de replicación denominados ARS (secuencias de replicación autónoma). Para estabilizar los vectores que contienen la secuencia ARS, es necesario la presencia de una secuencia centromérica (CEN). En general, aunque los YEp mantienen un alto número de copias, son inestables para la producción de proteínas a nivel industrial.

La estabilidad puede lograrse mediante la construcción de vectores que se integren en el cromosoma del organismo hospedador. Los **vectores de integración** (YIp) son moléculas híbridas que contienen secuencias de un plásmido procariótico y secuencias de levaduras. La presencia del plásmido procariótico facilita el crecimiento y preparación de grandes cantidades del vector en *E. coli*. Las secuencias de DNA de la levadura permiten su integración en el genoma mediante recombinación homóloga (Romanos y col., 1992). En *S. cerevisiae*, los procesos de recombinación *in vivo*, recombinación y ligación entre fragmentos homólogos de DNA, se producen de forma muy eficiente (Orr-Weaver y col., 1981; Ma y col., 1987). De hecho, la presencia de fragmentos homólogos de tan sólo 30 pb de longitud es suficiente para que tenga lugar este proceso (Manivasakam y col., 1995).

La transformación de levaduras con los vectores de integración se produce con baja frecuencia, entre 1-10 transformantes por  $\mu$ g de DNA (Struhl y col., 1979; Hinnen y Meyhack, 1982), aunque muestran una elevada estabilidad, siendo la tasa de segregación <0,1% por generación en ausencia de selección. La frecuencia de transformación se puede incrementar realizando una

linearización de los mismos (Hinnen y Meyhack, 1982; Gunge, 1983; Rothstein, 1990) originando cortes sencillos dentro de las secuencias de DNA de la levadura presente en el plásmido. Estos cortes en la doble hebra dan origen a una integración dirigida, de modo que el plásmido se integra en la región del cromosoma homólogo a la secuencia cortada (Orr-Weaver y col., 1981; Rothstein, 1990). Mediante este proceso la frecuencia de transformación se puede ver incrementada entre 10 y 1000 veces.

Para facilitar la integración en un alto numero de copias, ésta puede dirigirse hacia un locus que esté repetido un elevado número de veces el genoma. En el caso de las levaduras, más del 15% del DNA nuclear está formado por secuencias repetidas. Una buena diana en la que se puede integrar el plásmido es en el locus de rDNA, presente en el cromosoma XII, en el que aparecen múltiples copias (entre 100-120) de una secuencia de 9,08 Kb (Petes, 1979; Warner, 1989).

## **1.7 Optimización del medio de cultivo**

Los medios utilizados en el cultivo de los microorganismos contienen todos los elementos en cantidades adecuadas para la síntesis del material celular y para la producción de metabolitos o enzimas. En la investigación a nivel de laboratorio, pueden utilizarse productos de alta pureza para la formulación de medios de cultivo definidos. Sin embargo, en las fermentaciones a nivel industrial, por motivos económicos, se utilizan frecuentemente ingredientes cuya composición es muy compleja, casi indefinible (Kennedy y Krouse, 1999) ya que son subproductos de otros procesos industriales.

La optimización de los medios de cultivo con fines industriales ha sido realizada, en la mayoría de los casos, mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo sino también en las condiciones de operación (Patel y col., 1978; Kamel y Al-Zahram, 1985; Shaker y col., 1985). La mejora u optimización del medio de cultivo original puede realizarse modificando el porcentaje de los componentes del medio y/o

las materias primas utilizadas. En muchos casos, el objetivo no es optimizar un medio que sea más productivo, sino que tenga menor o, como mínimo, igual coste que el original, para lo cual se requiere del uso de varios métodos de optimización (Maddox y Richert, 1977).

### **1.7.1 Diseños experimentales y metodología de superficie de respuesta**

El diseño estadístico de experimentos se refiere al proceso de planificar un experimento, de tal forma, que los datos obtenidos puedan analizarse con métodos estadísticos con el fin de llegar a conclusiones válidas y objetivas. El enfoque estadístico a partir de los resultados es necesario si se quieren lograr conclusiones significativas de los mismo, ya que, cuando el problema incluye datos que están sujetos a errores experimentales, la metodología estadística es la única forma objetiva de análisis. Esta metodología tiene la particularidad de determinar la influencia e importancia de los parámetros estudiados y las interacciones entre éstos con un mínimo de ensayos. Esto último contrasta con la metodología clásica, que consiste en hacer variar cada factor manteniendo los demás constantes, lo cual conduce por una parte a un número considerable de experimentos y, por otra, a ignorar la interacción que pueda existir entre los factores considerados (Box y Draper, 1987; Haaland, 1989; Myers y col., 1995).

Cualquier problema experimental incluye dos aspectos: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos. Estos dos aspectos se encuentran íntimamente relacionados, porque el método de análisis depende directamente del diseño empleado. En la **Tabla 1.5** se muestra un esquema general de los pasos a seguir para diseñar un experimento.

Una vez definidos los factores, sus niveles y la variable de respuesta, la elección del tipo de diseño experimental se puede realizar con la ayuda de paquetes interactivos de software (Ej. Statgraphics v 5.0), con los cuales una vez introducidos todos los valores, presentan, a la consideración del experimentador, una selección de posibles diseños. Además, una vez obtenidos

los resultados, el mismo software permite realizar el análisis estadístico del diseño y determinar el ajuste de los datos al modelo experimental, así como la influencia de cada factor y de las interacciones entre ellos sobre la respuesta.

**Tabla 1.5.** Pautas generales para el diseño estadístico de experimentos.

1. Identificación y exposición del problema
2. Elección de los factores, los niveles y los rangos<sup>a</sup>
3. Selección de la variable de respuesta
4. Elección del diseño experimental
5. Realización del experimento
6. Análisis estadístico de los datos
7. Conclusiones y recomendaciones

---

<sup>a</sup> Los pasos 2 y 3 pueden hacerse de forma simultánea o en orden inverso.

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) se basa en un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que la respuesta de interés está influenciada por varias variables y donde el objetivo es optimizar dicha respuesta (Montgomery, 2003).

En la mayoría de los casos, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por ello, el primer paso en la MSR consiste en determinar un enfoque apropiado a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Por lo general, se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes. Es decir, la función de aproximación es un modelo de primer orden (Montgomery, 2003), que relaciona las variables y la respuesta mediante una ecuación del tipo:

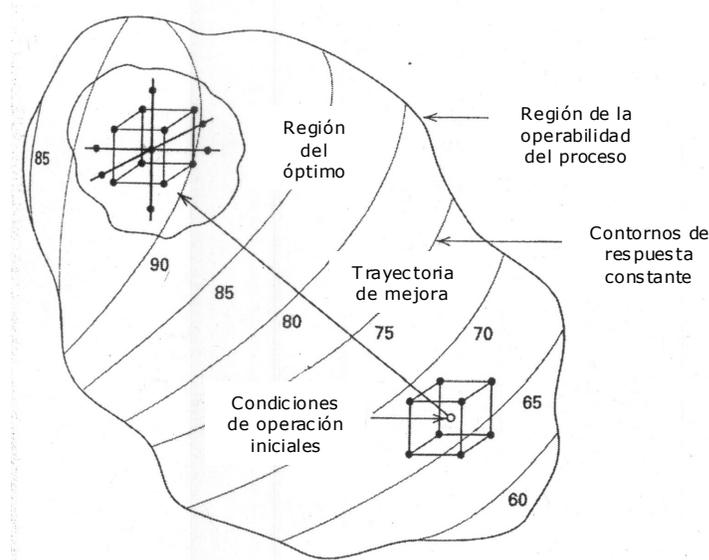
$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon$$

Siendo  $x_1, x_2, \dots, x_k$  las variables codificadas y  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_k$  los coeficientes de regresión.

Si los datos no se ajustan al modelo de primer orden y se determina la presencia de curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, generalmente un modelo de segundo orden, dado por una expresión del tipo:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

Como se muestra en la **Figura 1.11**, la MSR es una metodología secuencial. Muchas veces, cuando el punto de partida está en una zona de la superficie de respuesta alejada del óptimo, como en la mayoría de las condiciones iniciales, el sistema presenta una curvatura moderada y el modelo de primer orden es normalmente apropiado.



**Figura 1.11.** Esquema secuencial de la metodología de superficie de respuesta.

El objetivo en este caso es llevar al experimentador de manera rápida y eficiente por una trayectoria de mejora hasta la zona próxima al óptimo. Para ello, lo más adecuado es utilizar el método de la máxima pendiente de ascenso, el cual permitirá realizar un recorrido secuencial en la dirección del máximo incremento de la respuesta (**Figura 1.11**). Esta dirección es paralela a la normal de la superficie de respuesta ajustada. Estos experimentos secuenciales se llevan a cabo hasta que deja de observarse un incremento adicional en la respuesta. Una vez que se ha encontrado la región del óptimo, puede emplearse un modelo más elaborado, como el de segundo orden, y realizar un análisis para localizar el óptimo. El análisis de una superficie de respuesta, por tanto, puede considerarse como "el ascenso a una colina", donde la cima de ésta, representa el punto de la respuesta máxima.

El objetivo último de la MSR es determinar las condiciones de operación óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que se logren los requerimientos de operación.

La MSR es muy utilizada en procesos de ingeniería industrial e ingeniería química (Murphy y col., 1999; García-Ayuso y col., 2000). Esta metodología también se ha utilizado, aunque en menor medida, para la optimización de medios de cultivos y condiciones de operación para la producción de diversos metabolitos y enzimas de interés como lisina (Udeh y Achremowicz, 1993), lisozima (Gheshlaghi y col., 2005), etanol (Bowman y Geiger, 1984), ácido cítrico (Chen, 1996), estreptomycin (Saval y col., 1993), celulosa (Embuscado y col., 1994), polisacáridos (Hsieh y col., 2005) e incluso, glutation (Liu y col., 1999).

### **1.7.2 Diseños experimentales para ajustar superficies de respuesta**

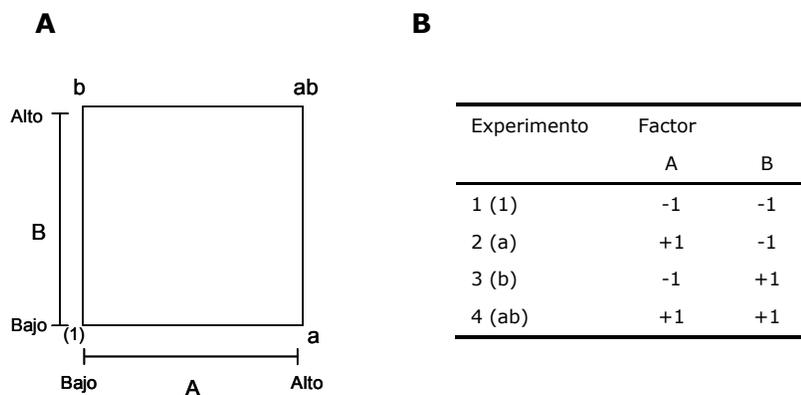
El ajuste y análisis de superficies de respuesta se facilita en gran medida con la elección apropiada del diseño experimental.

### Modelo de primer orden

Los diseños ortogonales de primer orden, entre los que se encuentran los diseños factoriales  $2^k$ , los fraccionados de la serie  $2^k$  y el simplex, son la única clase de diseños que minimizan la varianza de los coeficientes de regresión ( $\beta_i$ ) (Montgomery, 2003). El más importante de estos es el diseño  $2^k$ . Este diseño es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental, ya que proporciona el menor número de experimentos con los que pueden estudiarse  $k$  factores en un diseño factorial completo.

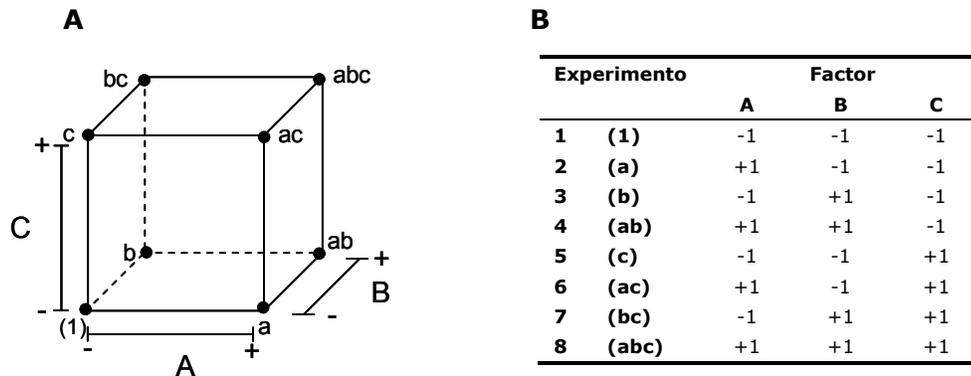
El diseño  $2^k$  no permite la estimación del error experimental a menos que se hagan réplicas de algunos experimentos. Una forma habitual de incluir réplicas en este tipo de diseños es aumentar el diseño con varias observaciones en el centro.

El primer diseño de la serie  $2^k$  es el que sólo tiene dos factores ( $2^2$ ) y cada uno se analiza a dos niveles. Este tipo de diseño se ilustra gráficamente como un cuadrado (**Figura 1.12A**), en cuyos vértices se indican las cuatro combinaciones posibles entre los factores A y B. Utilizando la notación "+" y "-" para denotar respectivamente los niveles alto y bajo de los factores, los cuatro experimentos pueden ordenarse dando lugar a la matriz del diseño (**Figura 1.12B**).



**Figura 1.12. A.** Representación gráfica de un diseño factorial  $2^2$ . **B.** Matriz del diseño  $2^2$ .

En el caso de que sean tres los factores de interés (diseño  $2^3$ ), la representación geométrica de las ocho combinaciones de tratamientos es un cubo (**Figura 1.13A**), al que corresponde una matriz del diseño como la que se muestra en la **Figura 1.13B**.

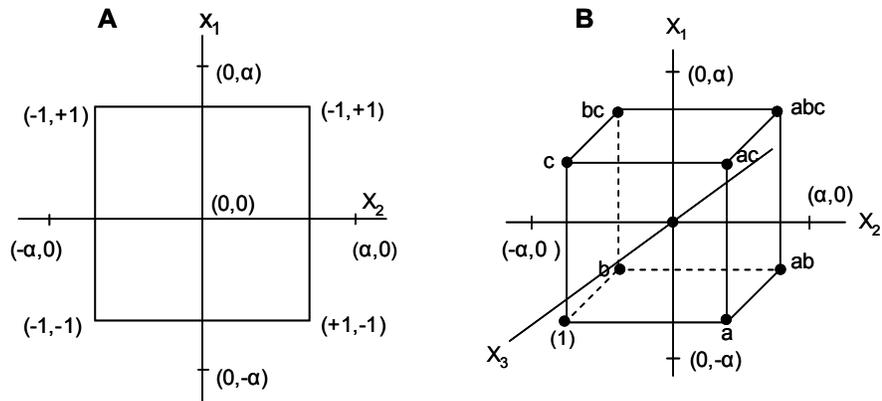


**Figura 1.13.** A. Representación gráfica de un diseño factorial  $2^3$ . B. Matriz del diseño  $2^3$

### Modelo de segundo orden

Uno de los diseños más eficientes para ajustar el modelo de segundo orden son los diseños centrales compuestos (DCC). Los DCC están formados por un diseño factorial  $2^k$ ,  $2k$  puntos axiales y  $n$  puntos centrales. En la **Figura 1.14A** se representa un DCC para  $k=2$  factores y en la **Figura 1.14B** para  $k=3$ .

Hay dos parámetros que deben especificarse: la distancia  $\alpha$  de los experimentos axiales al centro del diseño y el número de puntos centrales. Puesto que la finalidad de la MSR es la optimización y la localización del óptimo se desconoce antes de realizar el experimento, debe utilizarse un diseño que proporcione una precisión de la estimación igual en todas las direcciones.



**Figura 1.14.** Diseño central compuesto. **A.** para  $k=2$ ; **B.**  $k=3$ .

Un DCC se hace rotatable mediante la elección de  $\alpha$ . El valor de  $\alpha$  para la rotabilidad depende del número de experimentos en la porción factorial del diseño. En cuanto al número de puntos centrales, es normal incluir entre 3 y 5 puntos con el fin de proporcionar una varianza razonablemente estable de la respuesta.

## **2. Objetivos**



El presente trabajo ha sido financiado por la empresa Puleva Biotech S.A., empresa dedicada a la investigación, desarrollo y comercialización de ingredientes funcionales. En los últimos años ha aumentado el interés por el consumo de antioxidantes para combatir los daños ocasionados por el estrés oxidativo y el envejecimiento. Uno de los antioxidantes más importantes en las células eucariotas e incluso presente en leche humana es el glutatión.

Debido a su alto contenido intracelular en GSH, *S. cerevisiae* es el microorganismo más utilizado para la producción del tripéptido a escala industrial. La obtención de cepas de *S. cerevisiae* superproductoras de glutatión constituye un primer paso en el desarrollo de un proceso industrial para la obtención de este tripéptido y su posible incorporación en alimentos funcionales.

Para llevar a cabo este trabajo, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1. Obtención de cepas de *S. cerevisiae* superproductoras de glutatión mediante mutagénesis al azar y selección.**
- 2. Análisis a nivel genómico en la cepa seleccionada.**
- 3. Mejora de la producción de GSH mediante el diseño estadístico de experimentos en la cepa seleccionada.**
- 4. Construcción de un sistema integrativo de expresión en *S. cerevisiae*.**
- 5. Incremento del contenido en glutatión mediante el aumento de la dosis génica del gen *GSH1* en *S. cerevisiae*.**



### **3. Materiales y Métodos**



### 3.1 Microorganismos

#### 3.1.1 Cepas Bacterianas

***Escherichia coli* Top 10 F'** [F' {*proAB*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA*, Δ(*mrr*- *hsdRMS*-*mcrBC*), φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *deoR*, *recA1*, λ<sup>-</sup> *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*]. Cepa derivada de *E. coli* K-12 empleada para la obtención de células electrocompetentes. Fue utilizada para la propagación y mantenimiento de los plásmidos.

#### 3.1.2 Cepas fúngicas

***Saccharomyces cerevisiae* CECT 1328** se utilizó para la obtención de las cepas superproductoras de GSH mediante mutación al azar. También se utilizó para amplificar los fragmentos de DNA ribosómico y el marcador *URA3* a partir de su DNA genómico.

***Saccharomyces cerevisiae* CECT 1645** (*ura3-A*, *trp1*, *leu2-3*, *leu2-112*) se utilizó como cepa hospedadora en los experimentos de transformación.

### 3.2 Medios de cultivo

#### 3.2.1 Medios de cultivo para bacterias

**Medio LB** (Miller, 1972)

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada hasta	1 L

Para la preparación de medio sólido se añade agar (20 g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

### Medio Terrific Broth (TB)

Bacto-triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL
Agua destilada hasta	0,9 L

Después de esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min añadir 100 mL de tampón fosfato potásico 1 M pH6.

### 3.2.2 Medios de cultivo para levaduras

#### Medio YPD

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada hasta	1 L

Para la preparación de medio sólido se añade agar (20 g/L). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

#### Medio Mínimo

Medio para la selección de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* CECT1645.

YNB (sin aminoácidos)	67 g
L-Trp	0,75 g
L-Leu	0,50 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta	1 L

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

**Medio MFS**

Melazas	15 g
Solución Corn steep liquor	10 mL
Agua destilada hasta	1 L

Para preparar la solución de corn steep se diluye 1:1 una preparación de Corn steep liquor al 50% (p/v) (Sigma). Esta disolución se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min y se esteriliza en autoclave.

En este trabajo se utilizaron melazas de remolacha (Azucarera Ebro, Fábrica de La Rinconada, Sevilla) con una concentración de azúcares fermentables del 44,48% (p/v) de los cuales 93,03% sacarosa; 3,66% rafinosa; 2,1% glucosa y 1,21% fructosa.

**3.3 Cultivo y conservación de las cepas****3.3.1 Crecimiento de cepas bacterianas**

Las cepas de *E. coli* se crecieron durante 16-18 horas a 37°C en medio LB. Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces (de volumen variable, dependiendo del protocolo), incubando a 250 rpm a la misma temperatura.

Para la selección y cultivo de cepas transformantes resistentes a ampicilina, el medio se suplementó con 100 µg/mL.

Para la detección de transformantes mediante el sistema de  $\alpha$ -complementación, se añadieron IPTG (100 µg/mL) y X-Gal (40 µg/mL) al medio LB sólido.

### 3.3.2 Crecimiento de levaduras

Las cepas de *S. cerevisiae* se incubaron a 28°C durante 48 h en medio YPD. Los cultivos en medio líquido se realizaron en matraces (de volumen variable, dependiendo del protocolo), incubando a 250 rpm a la misma temperatura.

### 3.3.3 Conservación de las cepas

La conservación de las cepas a corto plazo (2-3 semanas) se realizó a 4°C en estría en placas Petri sobre el correspondiente medio sólido. La conservación a largo plazo se hizo mediante congelación a -80°C de una suspensión de células en glicerol al 20%.

## 3.4 Tampones y otras soluciones

En la **Tabla 3.1** se muestra la composición y preparación de los tampones y soluciones utilizadas en este trabajo.

**Tabla 3.1.** Composición y preparación de tampones y soluciones.

Nombre	Composición / Preparación
<b>Agente reductor</b>	TCEP 1,25 mM, HCl 0,2 M.
<b>Ácido tricloroacético al 7,5% (TCA)</b>	En un matraz aforado de 100 mL se añaden 7,5 mL del ácido puro (100%, 6,1N) y se enrasa al volumen final con agua Milli-Q.
<b>Disolución de OPA (o-ftalaldehído) 12mM en AcNa 50mM</b>	Disolver 0,829 g de OPA en 10 mL de metanol. Por otra parte, pesar 2,058 g de acetato sódico y disolver en 100 mL agua Milli-Q. Mezclar ambas disoluciones y enrasar hasta 500 mL con agua Milli-Q.
<b>Glicerol 20%</b>	Mezclar 200 mL de glicerol con 800 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave.

**Tabla 3.1.** Composición y preparación de tampones y soluciones (continuación).

Nombre	Composición / Preparación
<b>IPTG 1000 x</b> (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido)	Disolver 1 g en 8 mL de agua Milli Q. Esterilizar por filtración y almacenar a $-20^{\circ}\text{C}$ .
<b>Solución desnaturalizante</b>	NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M.
<b>Solución neutralizante</b>	NaCl 3 M, Tris-HCl 1 M pH 7,5.
<b>SSC 20 x</b>	NaCl 3 M, Citrato Sódico 0,3 M pH 7.
<b>SSPE 20 X</b>	Mezclar 8,76 g de NaCl, 1,42 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ y 7,6 g de EDTA en 1 L de $\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q. Esterilizar en autoclave.
<b>STET</b>	Sacarosa 8%, Tritón X-100 0,5%, Tris HCl 10 mM, EDTA 50 mM pH 8.
<b>Tampón AE</b>	Acetato sódico 50 mM pH 5,2, EDTA 10 mM.
<b>Tampón de detección</b>	Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M pH 9,5.
<b>Tampón fosfato potásico 1 M pH 7,8</b>	A 90,8 mL de disolución $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1M se adicionan 9,2 mL de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M. Se ajusta el pH según sea necesario con las disoluciones iniciales.
<b>Tampón fosfato potásico 600mM pH 7,8</b>	A 90 mL de tampón fosfato potásico 1M pH 7,8 se le adicionan 60 mL de agua Milli-Q.
<b>Tampón maleico</b>	Ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5.
<b>Tampón TAE 50 x</b>	Mezclar 242 g de Tris base en 57,1 mL de ácido acético glacial. Añadir 100 mL EDTA 0,5 M pH 8, completar con $\text{H}_2\text{O}$ Elix hasta 1 L.
<b>X-Gal 1000 x</b> (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido)	Disolver 40 mg en 1 mL de N,N'-diethylformamida. Almacenar a $-20^{\circ}\text{C}$ .
<b>Tampón TE</b>	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 8.

### 3.5 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones en cadena de la polimerasa fueron sintetizados por la empresa MWG-Biotech AG (Ebersberg, Alemania). En las **Tablas 3.2** y **3.3** se muestran las secuencias de todos ellos. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR se diseñaron mediante el software específico Primer Express (Applied Biosystems).

**Tabla 3.2.** Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR utilizando DNA genómico de *S. cerevisiae* como molde.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Tm (°C)	Función
rDNA1-F	GTTTGGGAATTCAGCTCTAAG Diana <i>EcoRI</i>	55,9	Amplificación fragmento del extremo 5´ del rDNA 25S
rDNA1-R	GACGATCGAATTCACGTCAGA Diana <i>EcoRI</i>	60,3	
rDNA2-F	GTCTCCAAGCTTAACAGCCTC Diana <i>HindIII</i>	59,8	Amplificación fragmento del extremo 3´ del rDNA 25S
rDNA2-R	CGCCGAAGCTTCACTTATTC Diana <i>HindIII</i>	59,8	
URA3-F	AAACCTGCAGGAAACGAAG Diana <i>PstI</i>	54,5	Amplificación del gen marcador de selección <i>URA3d</i>
URA3-R	TTAGGATCCATGCATTTACTTAT Diana <i>BamHI</i>	53,5	
GSH1-F	TCAGCTCGAGTATAGAAGAATAAAATGGG Diana <i>XhoI</i>	62,4	Amplificación del gen <i>GSH1</i>
GSH1-R	ACTTTCTTTCGCGGCCGCAGTAAAAGGAG TTTAACATTTGC Diana <i>NotI</i>	71,4	

**Tabla 3.3.** Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR cuantitativa utilizando como molde RNA de *S. cerevisiae*.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Gen amplificado
ADH1-F	TGGTTACACCCACGACGGTT	59,4	Alcohol deshidrogenasa 1 ( <i>ADH1</i> )
ADH1-R	GAGGAATGTGAGCGGCTTGA	59,4	
CDC19-F	GATGTCGATTTGCCAGCTTTG	57,9	Piruvato quinasa 1 ( <i>CDC19</i> )
CDC19-R	GAAGACCATGTGGACACCGTT	59,8	
CYS3-F2	GAAGCTGCTTCCAAGTTCGC	59,4	Cistationina $\gamma$ -liasa ( <i>CYS3</i> )
CYS3-R2	CAGCGGGCACTTCCAATAGA	59,4	
CYS4-F2	TAAATCTGAGCAGCAAGCCGA	57,9	Cistationina $\beta$ -sintasa ( <i>CYS4</i> )
CYS4-F2	TGATACCCAAAGCCTTAGGCA	57,9	
ENO2-F	ATTGCTACCG CCATCGAAAA	55,3	Enolasa 2 ( <i>ENO2</i> )
ENO2-R	GTTGCGAGCGAAAGAGTCTTG	59,8	
GSH1-F2	AGCCAAAAATTCGACAGGCA	55,3	$\gamma$ -Glutamilcisteinil sintetasa ( <i>GSH1</i> )
GSH1-R2	GGTCATCCTCGATGGACACC	61,4	
GSH2-F2	AAATGCATCGGTGCACCAG	57,3	Glutation sintetasa ( <i>GSH2</i> )
GSH2-R2	CAGGTTGGGCCATATCTTGG	59,4	
MET2-F	CAACCTGTGGCCGACTATC	61,4	Homoserina-O-acetiltransferasa ( <i>MET2</i> )
MET2-R	TTTGC GTGCTCCTCCCTTT	57,3	
PDC5-F	CTAACGAATTGAACGCTGCCT	57,9	Piruvato descarboxilasa 5 ( <i>PDC5</i> )
PDC5-R	ACAACGTGCAAAACACCGAC	57,3	
SER2-F	CCTGCATAGCTCATGGAGAAAA	58,4	Fosfoserina fosfatasa ( <i>SER2</i> )
SER2-R	TTGAACAATCGATCCTGCGA	55,3	
18S-F	ATTGGAAGGGCAAGTCTGGTG	59,4	rRNA 18S
18S-R	AAAGTCCTGGTTCGCCAAGAG	59,8	

### 3.6 Plásmidos

En la **Tabla 3.4** se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo y sus características más relevantes.

**Tabla 3.4.** Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Tamaño (kb)	Marcador	Características	Fuente
<b>pUC18Not</b>	2,686	Ampicilina	Vector de clonación en <i>E. coli</i> . Idéntico al pUC18, pero cuyo sitio de clonación múltiple esta flanqueado por dos dianas <i>NotI</i>	Herrero y col. (1990)
<b>pUC19</b>	2,686	Ampicilina	Vector de clonación en <i>E. coli</i> . Selección por $\alpha$ complementación en presencia de IPTG y X-Gal.	Invitrogene
<b>p416TEF</b>	5,526	Ampicilina	Vector de expresión en levaduras. Contiene el promotor constitutivo <i>TEF</i> , el terminador <i>CYC1</i> y el sitio de clonación múltiple del plásmido pBSK.	Mumberg y col. (1995)
<b>pBT1</b>	3,624	Ampicilina	pUC19 portando el gen <i>GSH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> CECT 1328 clonado en <i>SmaI</i> .	Este trabajo
<b>pBT20</b>	3,326	Ampicilina	pUC18Not con fragmento rDNA2 de <i>S. cerevisiae</i> CECT 1328 clonado en <i>HindIII</i> .	Este trabajo
<b>pBT21</b>	3,924	Ampicilina	pBT20 con fragmento de rDNA1 de <i>S. cerevisiae</i> CECT 1645 clonado en <i>EcoRI</i> .	Este trabajo
<b>pBT32</b>	4,7 57	Ampicilina	pBT21 portando el gen de selección <i>URA3d</i> de <i>S. cerevisiae</i> CECT 1328 clonado en <i>PstI/BamHI</i>	Este trabajo
<b>pBT39</b>	5,514	Ampicilina	pBT32 portando el fragmento <i>SacI/KpnI</i> de p416TEF.	Este trabajo
<b>pBT119</b>	7,611	Ampicilina	Vector de expresión integrativo pBT39 portando el gen <i>GSH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> CECT 1645 clonado en <i>XhoI/XbaI</i> .	Este trabajo

## **3.7 Purificación de ácidos nucleicos**

### **3.7.1 Purificación de DNA plasmídico de bacterias**

#### ***3.7.1.1 Minipreparaciones de DNA plasmídico (minipreps)***

Se ha seguido el protocolo descrito por Holmes y Quigley (1981), el cual permite obtener DNA plasmídico de un gran número de colonias en poco tiempo.

1. Se inoculan, a partir de colonias aisladas, tubos Eppendorf con 1 mL de medio TB suplementado con el antibiótico apropiado y se incuban a 250 rpm, a 37°C durante 8-12 h.
2. Se recogen las células por centrifugación a 10.000 rpm, a T<sup>a</sup> ambiente durante 10 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 300-350 µL de STET mediante agitación fuerte.
3. Se añaden 10 µL de una solución de lisozima alcalina en agua (10 mg/mL) y se incuba 45 s con agitación fuerte.
4. Se incuban las reacciones en agua hirviendo durante 45 s (se provoca la coagulación de los restos celulares, DNA cromosómico y proteínas). Se centrifuga a 14.000 rpm, a T<sup>a</sup> ambiente durante 15 min. El precipitado formado por los componentes celulares se retira del fondo de los tubos con un palillo estéril.
5. El sobrenadante obtenido se mezcla con 40 µL de acetato sódico 3M pH 5,2 y 400 µL de 2-propanol, precipitando con este procedimiento el DNA plasmídico. Dicho DNA se recoge por centrifugación a 14.000 rpm, a T<sup>a</sup> ambiente durante 10 min y una vez descartado el sobrenadante, se lava con etanol al 70%.
6. El precipitado se seca al aire y se resuspende en 30-40 µL de TE, almacenándose a -20°C.

### **3.7.1.2 Preparaciones de DNA plasmídico**

La obtención de DNA plasmídico se llevó a cabo utilizando el "Nucleospin® Plasmid Kit" (Macherey-Nagel). Mediante este método, el DNA plasmídico contenido en las cepas hospedadoras de *E. coli*, es liberado mediante lisis alcalina. Posteriormente, el lisado resultante se neutraliza y se crean las condiciones apropiadas para la unión del DNA plasmídico a una membrana de sílica. Las posibles contaminaciones con sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares se retiran mediante un lavado de la membrana con etanol al 70%. El plásmido purificado es finalmente eluído bajo unas condiciones iónicas bajas con un tampón ligeramente alcalino (Tris HCl 5 mM pH 8,5).

### **3.7.1.3 Preparaciones de DNA plasmídico a gran escala**

La obtención a gran escala de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el "Nucleobond® PC Kit" (Macherey-Nagel). La membrana que se utiliza en este kit (NucleoBond® AX) es una resina de sílica con un intercambiador aniónico (Metiletilamina). Una vez equilibrada la membrana con un tampón adecuado, el DNA plasmídico queda unido a la resina, siendo posteriormente eluído tras varios lavados. Después de la precipitación con isopropanol el DNA se resuspende fácilmente en tampón TE.

### **3.7.2 Purificación de fragmentos de DNA**

En el presente trabajo se han utilizado sistemas de purificación de DNA basados en la adsorción a sílica de los ácidos nucleicos ("Nucleospin® PC Extract Kit", Macherey-Nagel). Mediante este método el DNA se une, en presencia de sales caotrópicas y otros componentes que disuelven la agarosa, a una membrana de sílica dispuesta en el interior de una columna. A continuación, se realiza un lavado con un tampón etanólico para eliminar sales y componentes macromoleculares solubles y, finalmente, el DNA se eluye con un tampón de baja fuerza iónica y alcalinidad (Tris-HCl 5 mM pH 8,5).

Este procedimiento se utilizó para purificar productos de PCR, digestiones con enzimas de restricción y fragmentos de DNA extraídos de geles de agarosa.

### 3.7.3 Purificación de DNA genómico de levaduras

La obtención de DNA genómico de levaduras se llevó a cabo empleando "AquaPure DNA Isolation Kit" (BioRad). El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. A partir de un cultivo en 10 mL de medio YPD crecido durante 48 h, se toman 200  $\mu$ L y se centrifugan a 13.000 rpm a T<sup>a</sup> ambiente durante 5 min.
2. Se mezclan en frío 300  $\mu$ L del tampón de lisis celular con 1,5  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/mL).
3. Una vez centrifugadas las células, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en la mezcla del tampón de lisis con Proteinasa K.
4. A continuación, se añaden 200  $\mu$ L de **perlas de vidrio acidificadas** y se agita con vortex durante 4 min. Se incuban las muestras a 50-55°C durante 1 h. Una vez enfriadas se añaden 1,5  $\mu$ L de disolución de RNAsa (10 mg/mL), se agita la mezcla y se dejan incubando durante 15 min a 37°C.
5. Se dejan enfriar las muestras a T<sup>a</sup> ambiente y se añaden 100  $\mu$ L de disolución de precipitación de proteínas. Se agita con vortex durante 30 s y se centrifuga a 13.000 rpm durante 3 min a T<sup>a</sup> ambiente.
6. Se transfieren los sobrenadantes a un tubo Eppendorf limpio y se añaden 300  $\mu$ L de isopropanol. Se mezcla varias veces por inversión durante 1 min. Se centrifugan las muestras a 13.000 rpm durante 1 min a T<sup>a</sup> ambiente, se elimina el sobrenadante y se añaden 300  $\mu$ L de etanol al 70%, mezclando varias veces por inversión durante 1 min.

7. Se centrifugan las muestras a 13.000 rpm durante 1 min a T<sup>a</sup> ambiente y se elimina el etanol. Se seca el precipitado al aire durante 15 min.
8. Se añaden 50 µL de tampón de hidratación de DNA. Se resuspende el DNA incubando la muestra a 65 °C durante 1 h, o bien durante toda la noche a T<sup>a</sup> ambiente.

**Perlas de vidrio acidificadas:** se mezclan las perlas de vidrio con ácido nítrico concentrado (realizar en campana de extracción), durante 1 h. Se lavan extensivamente con agua y se secan en un horno a 65°C.

### 3.7.4 Purificación de RNA total de levadura

Para evitar la degradación del RNA por ribonucleasas, es importante usar, durante todo el proceso de extracción, guantes (cambiarlos frecuentemente), puntas obtenidas de una bolsa recién abierta, material de vidrio tratado previamente con cloroformo y soluciones tratadas con dietilpircarbonato (DEPC) o preparadas en agua Elix tratadas con DEPC (H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>). Para la preparación del H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> se disuelve dietilpircarbonato al 0,1% en agua destilada mediante agitación durante 12-15 h y se esteriliza en autoclave.

La purificación de RNA se realizó siguiendo el método descrito por Schmitt y col. (1990). El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Se centrifugan 10-15 mL de cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial a 5.000 rpm durante 5 min a 4°C.
2. Una vez eliminado el sobrenadante, los tubos con las células se colocan en un recipiente con nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C hasta la extracción del RNA.
3. Para la extracción, se resuspende el sedimento celular en 400 µL de tampón AE y se transfiere a un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

4. Se añaden 40  $\mu\text{L}$  de SDS 10% y se mezcla vigorosamente. Posteriormente, se añade un volumen igual de fenol ácido y se incuba 4 min en un baño a 65°C, agitando la mezcla periódicamente.
5. Después se incuba 5 min en hielo y se centrifuga a 12.000 rpm 5 min a Tª ambiente. Una vez centrifugado, la fase acuosa se transfiere a un tubo nuevo y se añaden 450  $\mu\text{L}$  de cloroformo. La mezcla se centrifuga a 10.000 rpm durante 5 min a Tª ambiente.
6. La fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo y se añaden 40  $\mu\text{L}$  de acetato sódico 3M (pH 5,3) y 1 mL de isopropanol. Se centrifuga a 12.000 rpm 10 min a Tª ambiente y se elimina el sobrenadante.
7. Se lava el sedimento con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, se centrifuga igual que en el paso anterior y se seca el RNA a Tª ambiente durante 15 min.
8. Finalmente, se resuspende en 20  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> y se incuba unos min a 65°C para facilitar la disolución del RNA.

### **3.8 Manipulación de ácidos nucleicos**

#### **3.8.1 Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción empleadas para la realización de este trabajo fueron utilizadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores (Promega). La composición del tampón de reacción, pH y concentración de sales apropiados para cada enzima se respetó en todo momento, utilizando en cada paso el tampón de reacción suministrado por la casa comercial.

Las reacciones contenían 0,5-5  $\mu\text{g}$  de DNA, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente y 0,5-5 unidades de la enzima, en un volumen final de 10-100  $\mu\text{L}$  completados con agua Milli-Q.

Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 1-12 h a la temperatura indicada por el fabricante.

### **3.8.2 Relleno de extremos 5' protuberantes**

El relleno de extremos 5' protuberantes en fragmentos de DNA se llevó a cabo utilizando el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Roche Molecular Biochemicals). El procedimiento fue el siguiente:

1. Se purifica el DNA digerido mediante el kit "NucleoSpin® Extract" y se resuspende el DNA en 30 µL de agua Milli-Q.
2. El relleno con Klenow se realizó en un volumen de 50 µL y se preparó añadiendo los 20 µL del DNA purificado, 5 µL del tampón de la enzima, los desoxinucleótidos trifosfato (hasta 25 µM) y dos unidades de enzima. Se completó el volumen hasta 50 µL con agua Milli-Q.
3. La reacción se incubó 30 min a 37°C.
4. El DNA se volvió a purificar con el kit "NucleoSpin® Extract".

### **3.8.3 Ligación de moléculas de DNA**

Para la ligación de extremos de moléculas lineales de DNA se utilizó la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (Roche Molecular Biochemicals), la cual cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato entre dobles cadenas de DNA. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Se mezclan en hielo cantidades de vector e inserto (proporción 1:3) en un volumen final de 8,5 µL.
2. Se añade 1 µL de tampón de ligasa 10X y se añade 0,5 µL de enzima (1 U/µL).
3. La reacción se incubó 12 h a 8-12°C.

4. Finalmente, los productos de la reacción de ligación son utilizados para transformar una cepa apropiada de *E. coli*.

### 3.8.4 Determinación espectrofotométrica de la cantidad de RNA

La cuantificación de la cantidad de DNA o RNA de una muestra se realizó según el procedimiento descrito por Sambrook y col. (1989) basado en la medida de la absorbancia de una muestra, en un espectrofotómetro y en cubeta de cuarzo, a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite determinar la concentración de ácido nucleico en la muestra mientras que la medida a 280 nm indica la cantidad de proteínas. De esta forma, una densidad óptica (DO) de 1 corresponde, aproximadamente, a 40 µg/mL de RNA. La relación entre las medidas a 260 nm y a 280 nm ( $DO_{260nm}/DO_{280nm}$ ) proporciona información de la pureza del ácido nucleico. Preparaciones puras de RNA tienen valores entre 1,8 y 2.

### 3.8.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción estándar para la amplificación de fragmentos de DNA se realizó en tubos Eppendorf de 200 µL añadiendo los siguientes componentes, en el orden indicado:

Agua Milli-Q estéril	hasta 50 µL
Tampón de la polimerasa 10X	5 µL
Oligonucleótido 1 (100 µM)	0,2 µL
Oligonucleótido 2 (100 µM)	0,2 µL
dNTPs (10mM)	1 µL
DNA molde (10-50 ng)	1 µL
DNA Polimerasa (5U/µL)	0,5 µL

Una vez preparada la mezcla de reacción se selecciona y se desarrolla el programa de amplificación.

El esquema general de una PCR consta de tres pasos:

1. **Desnaturalización:** 94-96°C, 30-60 s. En este punto se desnaturaliza completamente el DNA molde, haciéndolo accesible para la unión de los cebadores a sus zonas complementarias.
2. **Hibridación:** 37-70°C, 30-60 s. La disminución de la temperatura favorece la unión de los oligonucleótidos a sus zonas complementarias en el DNA molde. La temperatura de renaturalización se establece generalmente 5°C por debajo de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los oligonucleótidos, calculada empíricamente por su composición nucleotídica.
3. **Extensión o elongación:** 68-72°C. El tiempo de elongación dependerá del tamaño del fragmento de DNA que se quiera amplificar y de la polimerasa utilizada. Las polimerasas que se han utilizado para la realización de este trabajo tenían una velocidad de síntesis de 0,5-2 kb/min.

El conjunto de estos tres pasos constituye un ciclo de PCR. Las reacciones completas pueden constar de entre 20 y 40 ciclos, duplicándose, teóricamente, la cantidad de DNA correspondiente al fragmento a amplificar en cada ciclo. Adicionalmente se suele realizar un paso inicial de desnaturalización, a 94-96°C durante 2-3 min, para asegurarse de que en el primer ciclo todo el DNA molde se encuentre completamente desnaturalizado. Igualmente, después de finalizar el último ciclo de PCR se puede programar un paso de extensión, a 68-72°C durante 5-10 min, en el que se permite que la polimerasa termine de sintetizar todas las hebras que no hubiera completado.

El procedimiento experimental seguido se realizó utilizando un termociclador iCycler™ (BioRad).

Finalizado el programa, una alícuota o todo el volumen de la reacción se analiza en un gel de agarosa.

## **3.9 Electroforesis de macromoléculas**

### **3.9.1 Electroforesis de DNA**

Las condiciones de electroforesis para separar moléculas de DNA en geles de agarosa fueron las descritas por Sambrook y col. (1989).

Se utilizó agarosa de baja electroendosmosis ("Molecular Biology Agarose", Bio-Rad) a diferentes porcentajes (0,5-1,5%), dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. Como tampón de electroforesis se utilizó TAE. El gel se preparó calentando el tampón con la agarosa en microondas.

Las muestras de DNA se mezclaron con tampón de carga "Blue/Orange 6x Loading Dye" (Promega).

Para desarrollar la electroforesis se aplicó una diferencia de potencial de 80-100 voltios durante un tiempo variable (1-2 h), dependiendo del tamaño, del porcentaje del gel y tamaño esperado de los fragmentos de DNA.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio (5 µg/mL) durante 15-20 min, se observaron sobre un transiluminador de luz UV ("Bioimaging System"  $\lambda = 302$  nm, Syngene) y se fotografiaron con una vídeo impresora (Digital Graphic Printer UP-D890, Sony).

El tamaño y concentración de las bandas de DNA en los geles de agarosa se estimó por comparación con varios marcadores de peso molecular.

### **3.9.2 Electroforesis de RNA**

Para el análisis de las muestras de RNA se utilizó el sistema comercial "RNA 6000 Nano assay Kit", siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este sistema se basa en una electroforesis en chip en un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La electroforesis tiene lugar en pequeños canales grabados sobre un soporte sólido (chip). La presencia de RNA se determina mediante la excitación por láser de un fluoróforo que se une específicamente a este tipo de molécula.

El tratamiento de datos se realiza con un software, mostrando el gel clásico y un electroferograma con las diferentes bandas. Al mismo tiempo cuantifica cada una de las bandas mostrando su tamaño, su concentración en ng/mL y su molaridad.

### **3.10 Transformación de células**

#### **3.10.1 *Escherichia coli***

Mediante este procedimiento se preparan las células de *E. coli* para alcanzar un estado de "competencia" que permita introducir varias copias de un vector plasmídico (Sambrook y col., 1989) y una alta eficiencia de transformación (hasta  $10^9$ - $10^{10}$  transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA).

##### **3.10.1.1 Preparación de células electrocompetentes**

A partir de una colonia aislada se inocula un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB (preparado con agua Milli-Q). Se incuba a 250 rpm y 37°C durante 16 h.

1. Se inoculan 2 matraces de 500 mL con 100 mL de medio LB (preparado con agua Milli-Q) con 1 mL del cultivo anterior. Se incuban a 250 rpm y 37°C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,5 (aproximadamente 2 h).
2. Se enfrían los cultivos en agua-hielo durante 30 min para ralentizar el crecimiento del cultivo.

3. Se recogen las células por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. El precipitado se lava sucesivamente con 200, 100 y 4 mL de glicerol al 10% (preparado con agua Milli-Q) frío y finalmente se resuspende en 400  $\mu$ L de esta solución.
5. La suspensión de células se reparte en alícuotas de 40  $\mu$ L en tubos Eppendorf de 1,5 mL fríos y se congelan rápidamente por inmersión en nieve carbónica/etanol o en nitrógeno líquido. Los tubos se guardan a -80°C.

#### **3.10.1.2. Transformación por electroporación**

1. Mezclar 1-5  $\mu$ L de DNA con 40  $\mu$ L de células competentes descongeladas en hielo.
2. Se transfiere la mezcla de células y DNA a una cubeta de electroporación de 0,2 cm, previamente enfriada en hielo. La mezcla debe estar en contacto con las dos láminas metálicas de la cubeta y sin formar burbujas.
3. Se ajustan las condiciones de electroporación (10  $\mu$ F, 2500 V y 600  $\Omega$ ) y se aplica un pulso. La duración del pulso debe ser de 4-5 milisegundos para obtener una buena eficiencia de transformación. La cubeta se coloca en hielo.
4. Se añade 1 mL de LB en la cubeta de transformación, se mezcla con una micropipeta y se recoge el medio con células en un tubo de 1,5 mL.
5. Se incuba a 250 rpm y 37°C durante 1 h.
6. Se siembra la suspensión de células en placas de medio sólido con el correspondiente antibiótico.

### **3.10.2 *Saccharomyces cerevisiae***

Se utilizó el sistema comercial "Yeast Transformation Kit" (Sigma Chemical). Las células de levadura se incuban en una disolución tamponada de cloruro de litio y, a continuación, la transformación se realiza mediante la incubación de las células competentes con el DNA transformante y el DNA de transporte (DNA de esperma de salmón) en una solución que contiene polietileno glicol (PEG).

#### **3.10.2.1 Preparación de células competentes**

1. Se inocula una colonia aislada en 20 mL de medio YPD líquido en un matraz de 100 mL.
2. Se incuba a 250 rpm y 28°C durante 16 h. El cultivo debe alcanzar la fase de crecimiento estacionario ( $DO_{600nm} > 2$ ).
3. Se diluye el cultivo en 100 mL del mismo medio hasta una  $DO_{600nm}$  aproximadamente de 0,3. Se incuba a 250 rpm y 28°C durante 3-6 h. La  $DO_{600nm}$  del cultivo debería duplicarse al menos una vez y no pasar de 1,5.
4. Se recogen las células por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min a Tª ambiente. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 50 mL de agua Elix estéril.
5. Se centrifugan de nuevo las células como en el paso anterior y se elimina el sobrenadante. Se resuspenden las células en 1 mL de tampón de transformación. Las células pueden almacenarse una semana a 4°C o se puede añadir glicerol al 15% y mantenerlas a -80°C.

#### **3.10.2.2 Transformación**

1. Se toman 10 µL de DNA de transporte (10 mg/mL), 0,1 µg del DNA transformante y se añaden a 100 µL de células competentes. Se mezcla con vortex.

2. Se añaden 600  $\mu\text{L}$  de tampón de cloruro de litio y se mezcla con vortex. Se incuba a 250 rpm y 28°C durante 30 min.
3. Se añaden 71  $\mu\text{L}$  de DMSO y se incuba a 42°C durante 15 min en un baño o un bloque calefactor.
4. Se centrifugan las células durante 3 s y se elimina el sobrenadante.
5. Se resuspenden las células en 500  $\mu\text{L}$  de agua Elix estéril. Se siembran 100  $\mu\text{L}$  en placas de selección y se incuba a 30°C durante 2-3 días hasta que aparezcan las colonias.

### **3.11 Transferencia, marcaje e hibridación de DNA**

#### **3.11.1 Transferencia**

La transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech) se realizó mediante un sistema de transferencia con vacío (Vacuum Blotter System, BioRad). El método seguido fue el siguiente:

1. Una vez visualizado el gel de agarosa, se cubre en ácido clorhídrico 0,25 M y se incuba 15 min con agitación suave. Se elimina el ácido y se lava el gel con agua destilada.
2. Se añade solución desnaturalizante hasta cubrir el gel y se incuba 30 min con agitación suave. Se elimina, se lava con agua destilada y se cubre con solución neutralizante. Se incuba 30 min.
3. Se corta una membrana de nylon de un tamaño igual al del gel de agarosa y se humedece con disolución SSC 20X.
4. Se coloca la membrana de nylon sobre la placa porosa de la cubeta de transferencia. Sobre ésta se coloca una lámina de plástico que cubra

toda la placa porosa y que posea una apertura rectangular en el centro, de un tamaño ligeramente inferior a la membrana.

5. Se coloca el gel sobre la lamina de plástico y se conecta la bomba de vacío a 5 pulgadas de mercurio (Hydrotech™ Vacuum Pump, BioRad).
6. Se cubre el gel con SSC 20X. Se mantiene la transferencia durante, al menos, 2 h. Una vez transcurrido el tiempo, se apaga el sistema de vacío, se retira el gel, se recoge la membrana, se lava con SSC 2X y se fija el DNA a la membrana mediante luz ultravioleta (UV Stratalinker® 1800, Stratagene).

### 3.11.2 Marcaje

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas se marcaron con digoxigenina 11-dUTP mediante PCR.

La mezcla de reacción estándar para la amplificación de fragmentos marcados con digoxigenina 11-dUTP de DNA se realizó en tubos Eppendorf de 200 µL añadiendo los siguientes componentes, en el orden indicado:

Agua Milli-Q estéril	hasta 50 µL
Tampón de la polimerasa 10X	5 µL
Oligonucleótido 1 (100 µM)	0,2 µL
Oligonucleótido 2 (100 µM)	0,2 µL
dNTPs (2 mM)	5 µL
- dATP (2 mM)	
- dCTP (2 mM)	
- dGTP (2 mM)	
- dTTP (1,8 mM)	
- DIG-11-dUTP (0,2 mM)	
DNA molde (10-50 ng)	1 µL
Polimerasa (5U/µL)	0,5 µL

Las muestras con la mezcla de reacción se someten a los siguientes ciclos en el termociclador:

Tras una etapa de preincubación de 5 min a 95°C, se lleva a cabo la amplificación en 30 ciclos, comprendiendo cada ciclo una etapa de desnaturalización, una etapa de anillamiento y una etapa de elongación, determinado por cada gen. Al final se programa un paso de extensión, a 68-72°C durante 5-10 min.

### **3.11.3 Hibridación**

#### **3.11.3.1 Prehibridación e hibridación**

Ambos procesos se realizaron siguiendo las indicaciones del "DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I" (Roche Molecular Biochemicals).

1. Se precalienta un volumen (10 mL/100 cm<sup>2</sup> membrana) de tampón de hibridación a la temperatura de hibridación (37-42°C). Prehibridar la membrana durante al menos 30 min.
2. Se desnaturaliza la sonda calentando a 100°C durante 10 min. Se deja en hielo.
3. Se añade la sonda previamente desnaturalizada a un volumen apropiado de tampón de hibridación precalentado (3,5 mL/100 cm<sup>2</sup> membrana) y se mezcla bien evitando la formación de burbujas.
4. Se elimina el tampón de prehibridación y se añade la disolución de hibridación (conteniendo la sonda) a la membrana. Se incuba durante 4-12 h con agitación suave a 42°C.
5. Se elimina la disolución de hibridación y se hacen 2 lavados de 5 min cada uno con 100 mL de SSC 2X, 0,1% SDS a temperatura ambiente bajo constante agitación.

6. Se realizan dos lavados de 5 min cada uno con 100 mL de SSC 0,5X, 0,1% SDS (precalentado a la temperatura de lavado) a 65-68°C bajo constante agitación.

### **3.11.3.2 Detección inmunológica**

1. Después de realizar los lavados, se enjuaga la membrana durante 1-5 min en tampón de lavado (tampón maleico, 0,3% (v/v) Tween 20) bajo constante agitación.
2. Se incuba durante 30 min en 100 mL de disolución de bloqueo (preparar una disolución 1X diluyendo 1:10 la disolución del kit, con tampón maléico) bajo constante agitación.
3. Se incuba 30 min con agitación suave en 20 mL de disolución de anticuerpo que contiene el anticuerpo anti-DIG (digoxigenina) ligado a una fosfatasa alcalina (se diluye 1:5000 en disolución de bloqueo).
4. Se hacen dos lavados de 15 min cada uno con 100 mL de tampón de lavado.
5. Se equilibra 2-5 min con 20 mL de tampón de detección bajo agitación constante.
6. Se incuba la membrana con 10 mL de disolución de color (se añade 0,2 mL de solución NBT/BCIP a 10 mL de tampón de detección) en oscuridad y sin agitación.
7. La reacción se detiene lavando la membrana durante 5 min con 50 mL de agua Milli-Q o con TE.

## **3.12 Mutación de cepas de *S. cerevisiae***

### **3.12.1 Curva de mortalidad**

Para realizar la mutagénesis de cepas de *S. cerevisiae* con el agente alquilante N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), se utilizó el método descrito por Lawrence (1991).

La nitrosoguanidina es uno de los agentes mutagénicos más potentes. Es imprescindible el uso de guantes y mascarilla de seguridad mientras se realice la manipulación de este agente mutagénico. Todo el tratamiento debe realizarse en una campana de extracción de gases.

Para poner a punto el método de mutación se realizó en primer lugar, una curva dosis-respuesta. Esta curva sirve para establecer el tiempo de tratamiento y la concentración de NTG necesaria para alcanzar una tasa de mortalidad del 90-95%. Para ello, decidimos fijar la concentración de NTG (0,15 mg/mL) y tomar muestras a distintos tiempos de incubación.

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. Con un asa de siembra se inocula una colonia de la cepa a mutar en un matraz de 50 mL conteniendo 5 mL de medio YPD. Se incuba a 250 rpm y 28°C durante 24 h.
2. Se inocula un matraz de 250 mL conteniendo 30 mL de medio YPD con 200 µL del preinóculo anterior. Se incuba a 250 rpm y 28°C durante 16-18 h.
3. Se centrifugan las células (en tubo Falcon) a 6.000 rpm, durante 5 min a Tª ambiente. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 30 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 8,0. Se repite el paso 3.

4. Para determinar el número de células inicial, se toma una alícuota y se realizan diluciones seriadas del cultivo que se siembran en placas de medio YPD.
5. Se prepara en un bote de plástico con tapa de rosca unos 300-500 mL de tiosulfato sódico al 5%. Todo el material (puntas, tubos, sobrenadantes, guantes, etc.) que entre en contacto con el agente mutagénico deberá depositarse en este recipiente para su inactivación.
6. En una campana de gases, se añade al resto de la suspensión celular 900  $\mu$ L de una solución de NTG (0,15 mg/mL).
7. Se incuba el tubo a T<sup>a</sup> ambiente, con suave agitación. Se toman muestras de cultivo (1mL) a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min. Cada muestra se centrifuga a 6.000 rpm durante 5 min y T<sup>a</sup> ambiente. Se elimina el sobrenadante vertiéndolo en el bote que contiene la solución de tiosulfato sódico.
8. Las células se resuspenden en 1 mL de una solución de tiosulfato sódico al 5% estéril y se centrifuga como en el apartado anterior. Se repite este proceso de lavado 3 veces.
9. Finalmente, las células se resuspenden en 1 mL de glicerol al 20%. Se realizan diluciones seriadas que se siembran en medio YPD.
10. Se determina la tasa de mortalidad a los tiempos establecidos.

### **3.12.2 Mutágenesis**

La mutación de cultivos de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.11.1. Se utilizó la misma concentración de NTG y el tiempo de tratamiento fue de 20 min con el fin de lograr una tasa de mortalidad mayor del 90%. Los cultivos mutados se guardaron en alícuotas de 10 mL a -20°C.

### **3.13 Selección de cepas superproductoras de glutation**

#### **3.13.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para los diferentes agentes utilizados durante las rondas de selección se determinó sembrando, aproximadamente,  $10^5$  u.f.c. de la cepa parental correspondiente a cada ronda, sobre placas de YPD conteniendo distintas concentraciones del agente utilizado.

La concentración a la que no se observó ningún crecimiento, se utilizó para llevar a cabo la posterior selección. Este proceso se realizó previamente para cada una de las rondas de mutación y selección realizadas.

Los agentes selectivos utilizados en las sucesivas rondas para la obtención de cepas superproductoras de GSH fueron los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxido de terc-butilo (TBOOH) y metales pesados como el cloruro de cadmio ( $CdCl_2$ ).

#### **3.13.2 Selección**

Una vez determinada la CMI para cada compuesto, la selección de cepas resistentes capaces de crecer en presencia de concentraciones elevadas de estos agentes oxidantes o  $Cd^{2+}$  se realizó de la siguiente forma:

1. Se preparan placas de medio YPD conteniendo la CMI establecida para cada compuesto.
2. En cada placa se siembran, aproximadamente unas  $10^5$  u.f.c. de la cepa de *S. cerevisiae* previamente mutada con NTG.
3. Las placas se incuban durante una semana a 28°C.
4. Las cepas capaces de crecer se pican en placas de YPD y, posteriormente, se analiza su contenido en GSH.

5. Se prepara un preinóculo en 5mL de YPD de cada cepa y se incuba a 250 rpm a 28°C durante 24 h.
6. El cultivo se diluye en 10 mL del mismo medio hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,1 y se incuba a 250 rpm a 28°C durante 18 h.
7. Se toman muestras para la determinación de la biomasa y la concentración de GSH.

### **3.14 Análisis de la concentración de glutatión**

#### **3.14.1 Análisis mediante HPLC-fluorescencia**

El método utilizado se basa en los métodos descritos por Cereser y col. (2001) y Busto y col. (1997), y es aplicable a la determinación de la forma reducida de GSH y del dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteína (gGC) en células de *S. cerevisiae*. El procedimiento es válido para un rango de concentración entre 1 y 300  $\mu\text{mol/L}$ .

El objetivo del método es la determinación de la cantidad de glutatión celular tanto reducido como oxidado mediante HPLC por fluorescencia. Por ello, todo el GSH presente debe ser reducido mediante una reacción previa.

El método se basa en la derivatización del glutatión y del dipéptido gGC con o-ftaladehído (OPA) a pH 7,6 y a  $T^a$  ambiente. La reacción origina un compuesto altamente fluorescente previo a la inyección. Se utilizan patrones de concentraciones de GSH de 1 a 250  $\mu\text{M}$  para realizar una recta de calibración.

1. A partir de un cultivo de *S. cerevisiae*, se toma 1 mL de muestra y se centrifuga a 10.000 rpm y  $T^a$  ambiente durante 2 min.
2. Se lavan las células con 1 mL de agua Elix y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones.

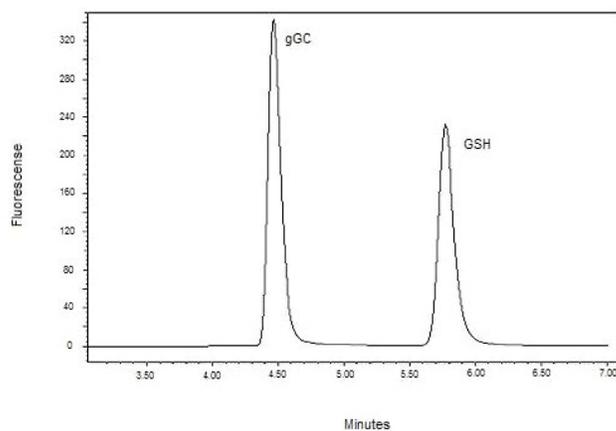
3. A continuación, las células se resuspenden en 300  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (7,5%) y se rompen mediante agitación fuerte durante 1 min.
4. Se centrifugan a 13.200 rpm y T<sup>a</sup> ambiente durante 1 min y a continuación se toman 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que se diluyen con 300  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q.
5. Una vez preparados patrones y muestras del modo descrito anteriormente, en una serie de viales cromatográficos de vidrio, se añaden 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra o patrón, se le añaden 340  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato potásico 0,6 M pH 7,8 y se agita suavemente.
6. A continuación se añaden 340  $\mu\text{L}$  del agente reductor y se deja reposar durante 15 min en oscuridad.
7. Finalmente, se añaden 800  $\mu\text{L}$  de OPA. Se agita durante 1 min en vortex y se deja reaccionar en nevera a 4°C durante 15 min.
8. Las muestras (o patrones), se filtran a través de un filtro de jeringa de nylon de 0,20  $\mu\text{m}$  y se inyectan en el HPLC-Fluorescencia. En caso de tener que conservar las muestras, se mantendrán a -20°C el tiempo necesario hasta el momento de la inyección (no más de 15 horas).

El equipo utilizado fue un HPLC 2695 Waters. En la **Tabla 3.5** se muestran las condiciones optimizadas para la determinación de glutation intracelular mediante HPLC-Fluorescencia.

**Tabla 3.5.** Parámetros instrumentales para el análisis de GSH por HPLC.

<b>Fase estacionaria</b>	Columna Spherisorb S3 ODS2 (Waters) 250x4,6mm, 3 $\mu$ m
<b>Fase móvil</b>	<b>Fase A</b> 96% Acetato sódico 50 mM pH 7,65 <b>Fase B</b> 4% Acetonitrilo
<b>V inyección (<math>\mu</math>L)</b>	10
<b>Flujo</b>	0,8 mL/min
<b>Elución</b>	Isocrático
<b>Profundidad de la aguja</b>	1,0 mm
<b>T carrusel (<math>^{\circ}</math>C)</b>	4,0 $\pm$ 1,0
<b>T columna (<math>^{\circ}</math>C)</b>	35,0 $\pm$ 5,0
<b>Fluorescencia (<math>\mu</math>medida)</b>	Excitación 340nm/ Emisión 420nm; Ganancia 10
<b>Duración (<math>t_{\text{retención}}</math>)</b>	5,33 min
<b>Modo de medida</b>	Áreas

Mediante estas condiciones, se logró una buena separación tanto del dipéptido  $\gamma$ -glutamilcisteina, como del glutathion reducido (**Figura 3.1**).

**Figura 3.1.** Separación cromatográfica de  $\gamma$ -glutamilcisteina (gGC) y glutathion (GSH).

Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles/L}$  de glutation. Esta concentración se determina mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la recta de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida.

$$C_1 = \frac{\text{Señal} - \text{Ordenada}(a)}{\text{Pendiente}(b)}$$

Por tanto, la concentración de GSH en el vial, teniendo en cuenta la dilución realizada será:

$$C_{\text{Final}} = C_1 \times 4$$

Por lo que, la concentración en la muestra de partida, expresada en  $\text{mg/L}$ , se calcula a partir de la expresión:

$$C_{\text{muestra}} = \frac{C_{\text{final}} (\mu\text{M}) \cdot V_{\text{TCA}} (\mu\text{L})}{V_{\text{muestra}} (\mu\text{L})} \cdot PM_c \left( \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{mol}} \right) \cdot \frac{1\text{mg}}{1000\mu\text{g}}$$

donde:

$C_{\text{muestra}}$ : Concentración de la muestra original ( $\text{mg/L}$ )

$C_{\text{final}}$ : Concentración en el vial ( $\mu\text{M}$ )

$V_{\text{TCA}}$ : Volumen de TCA ( $300 \mu\text{L}$ )

$V_{\text{muestra}}$ : Volumen de muestra centrifugada ( $1000 \mu\text{L}$ )

$PM_c$ : Peso molecular del glutation ( $307,4 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$ ).

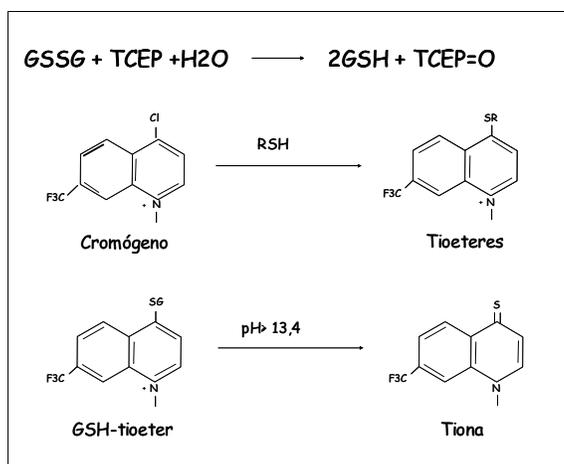
La producción específica de GSH ( $\text{mg/g}$ ) se calculó a partir de la biomasa obtenida. El peso seco de la biomasa se obtiene tomando muestras de  $10 \text{ mL}$  por duplicado que se centrifugan a  $5.000 \text{ rpm}$  durante  $5 \text{ min}$  y  $T^a$  ambiente. Se

lavan con 5 mL de H<sub>2</sub>O Elix y se vuelven a centrifugar como en el paso anterior. Finalmente se dejan secar en la estufa a 65°C durante 48 horas.

### 3.14.2 Análisis por colorimetría

El análisis por colorimetría se realizó utilizando el kit BIOXYTECH GSH-420 (OxisResearch). El método se basa en la formación de una tiona cromófora. La absorbancia leída a 420 nm es proporcional a la concentración de GSH presente.

La reacción se produce en 3 pasos: la muestra tamponada se reduce con una mezcla ácida conteniendo el agente reductor (TCEP), de forma que todo el glutatión oxidado pasa al estado reducido. Posteriormente, se añade el cromógeno y se forman tioésteres con todos los grupos tioles presentes en la muestra. Finalmente, se añade una base con el fin de situar el pH por encima de 13 y producir una liberación β-específica del RSG-tioéster liberando la tiona cromogénica (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Reacciones que se producen en el análisis de GSH por colorimetría.

La preparación de las muestras se realiza de la misma forma que en el caso del análisis mediante HPLC.

El análisis de la concentración de GSH, tanto de las muestras, como de los patrones para realizar una recta de calibración, se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. En una placa de 96 pocillos de fondo plano, se añade 40  $\mu\text{L}$  de muestra o patrones (GSH 150  $\mu\text{M}$  y 350  $\mu\text{M}$  incluidos en el kit).
2. A continuación se añaden 40  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato potásico 0,6 M pH 7,8 y 40  $\mu\text{L}$  de agente reductor.
3. Se añaden 40  $\mu\text{L}$  de cromógeno y, por último, 40  $\mu\text{L}$  de revelador (NaOH 2M). Se incuba a  $T^{\text{a}}$  ambiente en oscuridad absoluta durante 30 min.
4. Finalmente, se lee la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro.
5. La cuantificación de las muestras se realiza mediante interpolación de los resultados obtenidos sobre la recta patrón.

### **3.15 Análisis de etanol**

La determinación del etanol presente en muestras procedentes de medios de cultivo de *S. cerevisiae* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada con detección por ionización de llama (CG-FID).

El equipo utilizado fue un HPLC CG-MS Varian provisto de detector de ionización de llama tipo FID. Se utilizan patrones de concentraciones de etanol de 0,5 a 15 g/L para realizar una recta de calibración.

Tras un periodo determinado de incubación, se toma una muestra de 1 mL del caldo de fermentación. Se filtra para eliminar las células y el filtrado se introduce en un vial cromatográfico que se inyecta en el CG-FID. Los patrones

necesarios para la recta de calibración se preparan de la misma manera. Las condiciones de análisis, optimizadas para muestras acuosas, se muestran en la **Tabla 3.6.**

**Tabla 3.6.** Parámetros instrumentales CG-FID.

<b>Fase estacionaria</b>	BP20 (SGE) 25 m x 0,32 mm ID, 10 µm
<b>Fase móvil</b>	Nitrógeno
<b>Flujo</b>	1,0 mL/min
<b>V inyección (µL)</b>	0,5 µL
<b>T inyector (°C)</b>	240°C (8,0 min)
<b>T detector (°C)</b>	FID 260°C (8,0 min)
<b>Modo de medida</b>	Áreas
<b>Réplicas</b>	1
<b>Relación de Split</b>	0,00 min On Relación 50 0,01 min On Relación 50 2,00 min Off
<b>T horno (°C)</b>	t=0 min 65°C, 2,5 min Rampa 250°C (60°C/min; 2,42 min)

Los resultados se expresan en mg/L. La concentración ( $C_1$ ) se determina mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la recta de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida.

$$C_1 = \frac{\text{Señal} - \text{Ordenada(a)}}{\text{Pendiente(b)}}$$

### 3.16 Estudio de la estabilidad mitótica de plásmidos

Se realizó según el procedimiento descrito por Christianson y col. (1992).

1. A partir de una colonia aislada de la cepa transformante, se inocula un matraz de 50 mL con 15 mL de YPD y se incuba a 250 rpm y 28°C durante 24h.
2. Se diluye el cultivo en 50 mL del mismo medio hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,1.
3. Se realizan diluciones seriadas del cultivo a tiempo cero y se siembran en placas de YPD y medio mínimo.
4. Las colonias que aparecen en las placas de YPD se cuentan para determinar la concentración de células de la dilución ( $N_1$ ) y se determina el porcentaje de células que presentan plásmido en el inóculo ( $P_1$ ) mediante replica en el medio de selección.
5. Los cultivos se mantienen en crecimiento exponencial (diluyendo el cultivo cada 24 h a una  $DO_{600nm}$  de 0,1) hasta que transcurren aproximadamente 75 generaciones. En ese momento, se toman muestras que se siembran en medio YPD y en medio mínimo suplementado con triptófano y leucina.
6. Las colonias que crecen en el medio completo permiten determinar la concentración celular ( $N_2$ ) y el porcentaje de células que portan plásmido ( $P_2$ ) se determinó sobre el medio de selección. El cálculo del número de generaciones transcurridas ( $g$ ) se realiza mediante la fórmula:

$$g = \frac{\ln(N_1/N_2)}{\ln 2}$$

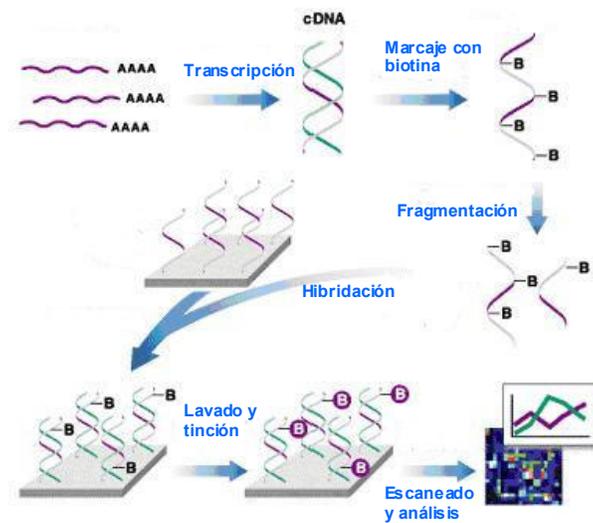
La estabilidad de los plásmidos se determina mediante el cálculo de la tasa de segregación ( $m$ ), que se define como el porcentaje de células sin plásmido que aparecen en la población final después de una generación, a partir de la siguiente fórmula:

$$m = 1 - e^{-\frac{\ln(P_2/P_1)}{g}}$$

Esta expresión incorpora varias consideraciones: primera, parte del inóculo puede contener células libres de plásmido; segunda, los segregantes aparecen y se reproducen en cada generación y, tercera, si la tasa de segregación es alta, el porcentaje de células que portan el plásmido declina en cada generación, reduciendo el número de células capaces de segregar en generaciones futuras.

### **3.17 Análisis de la expresión génica mediante microarrays (GeneChips®)**

Los microchips utilizados fueron los "Yeast Genome S98" (Affymetrix) que contiene 6.400 genes de *S. cerevisiae*. En la **Figura 3.3** se muestra un esquema de todo el proceso de análisis.



**Figura 3.3.** Análisis de la expresión génica mediante el empleo de GeneChips de Affymetrix.

A partir del RNA de la cepa control y de la cepa mutante, se sintetiza cDNA marcado con biotina, de manera que los genes de las muestras hibridan con los del chip emitiendo fluorescencia, cuya intensidad determina el nivel de expresión.

### 3.17.1 Síntesis de cDNA de doble hebra a partir de RNA

A partir de una muestra de RNA extraído según el protocolo descrito en el apartado 3.7.4 y analizado con un Agilent 2000 Bioanalyzer para comprobar su integridad, se utilizó el protocolo descrito en el kit comercial "Superscript Choice System" (Invitrogen Life Technologies).

1. Se mezclan 16-20  $\mu\text{g}$  de RNA total, 2  $\mu\text{L}$  de oligo dT (50  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  hasta 20  $\mu\text{L}$  y se incuba a 70°C durante 10 min.

2. Se incuba en hielo 5 min y se añaden 4  $\mu\text{L}$  de tampón "primera cadena de cDNA 5X", 2  $\mu\text{L}$  DTT 0,1M y 1  $\mu\text{L}$  de una mezcla de dNTP 10 mM. Se incuba a 42°C durante 2 min.
3. Finalmente, se añaden 3  $\mu\text{L}$  de la enzima Superscript II RT (200 U/ $\mu\text{L}$ ) y se incuba a 42°C durante 1 hora.
4. Para sintetizar la segunda hebra se añaden los siguientes reactivos y se incuba a 16°C durante 2 horas:

H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	91 $\mu\text{L}$
Tampón de reacción de segunda cadena 5X	30 $\mu\text{L}$
dNTPs 10 mM	3 $\mu\text{L}$
<i>E. coli</i> DNA ligasa 10 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
<i>E. coli</i> DNA Polimerasa I 10 U/ $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
Rnasa <i>E. coli</i> H U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

5. Posteriormente se añaden 2  $\mu\text{L}$  de T4-DNA polimerasa y se incuba 5 min a 16°C.
6. Finalmente se añaden 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M y se lava con el kit comercial "Cleanup of Double-Stranded cDNA" (Affymetrix), eluyendo la muestra de cDNA en 12  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>.

### 3.17.2 Síntesis de cRNA marcado con biotina

Para la síntesis de cRNA marcado con biotina utilizamos el sistema comercial "Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labelling kit" (Affymetrix). El protocolo fue el siguiente:

1. Al cDNA molde se añaden los componentes que se mencionan a continuación en orden estricto:

H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	10 µL
Tampón de reacción HY 10X	4 µL
Ribonucleótidos marcados con biotina 10X	4 µL
DTT 10X	4 µL
Inhibidor de RNasas 10X	4 µL
RNA Polimerasa T7 20X	2 µL

2. Se mezclan cuidadosamente los reactivos e inmediatamente se incuban durante 5 horas a 37°C, agitando suavemente la mezcla cada 30-45 min.
3. Una vez obtenido el cRNA marcado, se vuelve a lavar con el kit "Genechip Sample cleanup Module" de Affymetrix, eluyendo la muestra en 11 µL de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>.
4. Por último, se cuantifica el cRNA purificado por espectrofotometría. Para la cuantificación de cRNA obtenido a partir de RNA total, el rendimiento ha de calcularse utilizando la siguiente fórmula:

$$cRNA \text{ biotinilado purificado} = cRNA (DO_{260nm}) - [(RNA \text{ total})(x)]$$

donde:

cRNA biotinilado purificado: µg cRNA obtenido después de la purificación, teniendo en cuenta el rendimiento por arrastre de RNA total no marcado.

cRNA (DO<sub>260 nm</sub>): cRNA (µg) medido espectrofotométricamente tras purificar.

x: Fracción de cDNA total utilizado como molde en la síntesis de cRNA marcado.

### 3.17.3 Fragmentación del cRNA biotinilado

Este paso es crítico para la sensibilidad del microarray. La concentración mínima de cRNA debe ser 0,6 µg/µL. Se añade 2 µL de tampón de fragmentación 5X por cada 8 µL de cRNA. La concentración final de cRNA en la mezcla de fragmentación puede oscilar entre 0,5 y 2 µg/µL.

Se incuba a 94°C durante 35 min. Posteriormente se pone en hielo tras la incubación. Se puede utilizar el sistema bioanalyzer para comprobar que el cRNA está fragmentado.

### 3.17.4. Hibridación de las muestras

La reacción de hibridación del cRNA fragmentado con el cDNA presente en el microarray se realizó de la siguiente forma:

1. Se prepara una mezcla de hibridación con los componentes descritos en la tabla:

Componente	Cantidad	Concentración final
cRNA fragmentado	15 µg	0,05 µg/µL
Oligonucleótido control B2 (3 nM)	5 µL	50 pM
Controles Eucarióticos Hibridación 20X (bioB,bioC,bioD,cre)	15 µL	1,5, 5, 25 y 100 pM respectivamente
DNA esperma de arenque (10 mg/mL)	3 µL	0,1 mg/mL
BSA Acetilado (50 mg/mL)	3 µL	0,5 mg/mL
Tampón hibridación 2X	150 µL	1X
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Hasta 300 µL	

2. Se equilibra el chip a T<sup>a</sup> ambiente inmediatamente antes de su uso y se calienta la mezcla de hibridación a 99°C durante 5 min.
3. Utilizando una micropipeta, se humedece el chip con 200 µL de tampón de hibridación 1X y se incuba en un horno de hibridación con rotación de 60 rpm y 45°C durante 10 min.
4. La mezcla de hibridación previamente calentada a 99°C se incuba a 45°C durante 5 min.

5. Con ayuda de una micropipeta se saca por aspiración el volumen de tampón de hibridación 1X del chip y se vuelve a rellenar con 200  $\mu$ L de mezcla de hibridación.
6. El chip se hibrida durante 16 horas en el horno de hibridación con una rotación constante de 60 rpm y 45°C.

### **3.17.5. Lavado, tinción y escaneado**

Una vez finalizada la hibridación, el lavado y tinción de los geneChips® se realizó siguiendo el protocolo EukGE-WS2v4 definido en el software *Microarray Suite*.

Mediante este protocolo, el chip se lavó 10 veces con tampón SSPE y se tiñó con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10mg/mL) (Molecular probes) en tampón SSPE. La estreptavidina es una sustancia fluorescente que tiene alta afinidad por la biotina (con la que están marcados los cRNAs hibridados a los oligos del chip).

Finalmente los chips se leyeron a 560 nm usando un escáner (Agilent Gene Array Scanner, Affymetrix). La intensidad de la fluorescencia emitida por la estreptavidina es directamente proporcional a la hibridación del cRNA marcado con biotina y el oligo, o lo que es lo mismo, a su complementariedad. Las lecturas obtenidas se analizaron con el programa informático "Gene Expression Análisis Software" (Affymetrix).

### **3.18 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR**

Esta técnica consiste en la monitorización activa durante todo el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La monitorización se llevó a cabo utilizando el fluorocromo intercalante SYBR GreenI. Al inicio de la amplificación, la señal de fluorescencia se mantiene baja, ya que el fluorocromo

SYBR GreenI solo se une a DNA de doble hélice, aumentando a medida que el gen se va amplificando.

Una de las ventajas de esta técnica es la posibilidad de confirmar el producto amplificado una vez terminada la reacción, a través de la curva de desnaturalización. En el último paso de desnaturalización, las moléculas del fluorocromo se van separando del DNA al aumentar la temperatura y la fluorescencia registrada disminuye, siendo la temperatura de fusión ( $T_m$ ) la temperatura a la que la mitad de la doble hélice de DNA está desnaturalizada. Este valor es específico de cada fragmento, permitiéndonos identificar el producto amplificado.

Para cada gen los valores de la cuantificación del RNA por PCR deben ser normalizados, y para ello, sobre el mismo cDNA, se realiza otra PCR que amplifica un gen cuya expresión en las células no está sujeta a grandes cambios. Para estos estudios utilizamos el rDNA 18S.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con el kit "High Capacity cDNA Archive kit" (Applied Biosystems).

1. En un tubo de 0,2 mL se mezclan los siguientes componentes:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
RNA	1 $\mu$ g
Tampón Transcriptasa reversa 10X	4 $\mu$ L
dNTPs 25X	4 $\mu$ L
Hexámeros al azar 10X	10 $\mu$ L
Transcriptasa reversa Multiscribe (50U/ $\mu$ L)	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	Hasta 50 $\mu$ L

2. Los tubos con la mezcla de reacción se sometieron a 10 min de preincubación a 25°C y a una incubación a 37°C durante 2 horas.
3. La cuantificación del cDNA obtenido se realizó utilizando el equipo de PCR a tiempo real ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System®

(Applied Biosystems). Para ello, una vez amplificado el cDNA, se añade 1/10 del volumen a la mezcla de reacción (SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix) que contiene AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polimerasa, tampón de reacción específico, MgCl<sub>2</sub> y dNTPs en las concentraciones optimizadas por el fabricante, SYBR GreenI, y finalmente, los oligonucleótidos específicos para cada gen.

4. Una vez preparadas las muestras, estas se amplifican en el termociclador mediante 40 ciclos de la siguiente forma:
  - 95°C 10 min
  - 95°C 10 segundos
  - 60°C 1 minuto

Tras la amplificación se lleva a cabo un proceso de desnaturalización lenta, 15 segundos a 65°C y una lenta y gradual ascensión de la temperatura hasta 95°C, que permite identificar el producto.

### **3.19 Optimización del medio de cultivo mediante la metodología de superficie de respuesta**

Como hemos mencionado en la introducción, la metodología de superficie de respuesta (MSR), es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés está influida por un determinado número de factores, siendo el objetivo optimizar esta respuesta. Debido a que la MSR es una metodología secuencial, el procedimiento de optimización se realizó en las siguientes etapas:

1. Diseño de un modelo de primer orden

Se realizó un diseño factorial 2<sup>4</sup> con 6 puntos centrales. Los factores utilizados y sus niveles analizados se indican en la **Tabla 3.7**.

**Tabla 3.7.** Factores y niveles utilizados en el diseño factorial  $2^4$ .

<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>
Melaza	1,5-6 (% p/v)
Corn steep liquor (CSL)	0,5-4 (% p/v)
% inóculo	1-5 (% v/v)
Tiempo	24-48 (h)

La matriz del diseño factorial  $2^4$  utilizado se muestra en la **Tabla 3.8**. Una vez realizado este diseño experimental, se determinó la superficie de respuesta y se observaron las interacciones entre los factores. Se analizaron los resultados con ayuda del programa informático Statgraphics v 5.0 plus.

**Tabla 3.8.** Matriz del diseño factorial  $2^4$ .

	<b>Melazas (%)</b>	<b>CSL (%)</b>	<b>Inóculo (%)</b>	<b>Tiempo (h)</b>
<b>1</b>	-1	-1	-1	-1
<b>2</b>	-1	+1	+1	+1
<b>3</b>	-1	+1	-1	-1
<b>4</b>	-1	+1	+1	-1
<b>5</b>	+1	+1	-1	+1
<b>6</b>	+1	+1	+1	-1
<b>7</b>	+1	+1	-1	-1
<b>8</b>	+1	-1	-1	+1
<b>9</b>	-1	+1	-1	+1
<b>10</b>	-1	-1	+1	-1
<b>11</b>	+1	-1	+1	-1
<b>12</b>	+1	-1	-1	-1
<b>13</b>	-1	-1	+1	+1
<b>14</b>	+1	-1	+1	+1
<b>15</b>	-1	-1	-1	+1
<b>16</b>	+1	+1	+1	+1
<b>17</b>	0	0	0	0
<b>18</b>	0	0	0	0
<b>19</b>	0	0	0	0
<b>20</b>	0	0	0	0
<b>21</b>	0	0	0	0
<b>22</b>	0	0	0	0

## 2. Ascenso más pronunciado

A partir del análisis del primer diseño factorial, se realizan una serie de experimentos en la dirección del incremento máximo de la respuesta. Para ello, a partir del valor central del diseño anterior, se realizaron 7 pasos sobre dicha trayectoria. En la **Tabla 3.9** se muestra el diseño experimental para esta estrategia.

**Tabla 3.9.** Método del ascenso más pronunciado.

<b>Pasos</b>	<b>Tiempo (h)</b>	<b>Inóculo* (%)</b>
<b>Origen</b>	0	0
<b>Incremento (<math>\Delta</math>)</b>	12	*
<b>Origen + <math>\Delta</math></b>	12	0,6
<b>Origen + <math>2\Delta</math></b>	24	0,6
<b>Origen + <math>3\Delta</math></b>	36	1,2
<b>Origen + <math>4\Delta</math></b>	48	1,75
<b>Origen + <math>5\Delta</math></b>	60	2,36
<b>Origen + <math>6\Delta</math></b>	72	2,49
<b>Origen + <math>7\Delta</math></b>	84	2,49

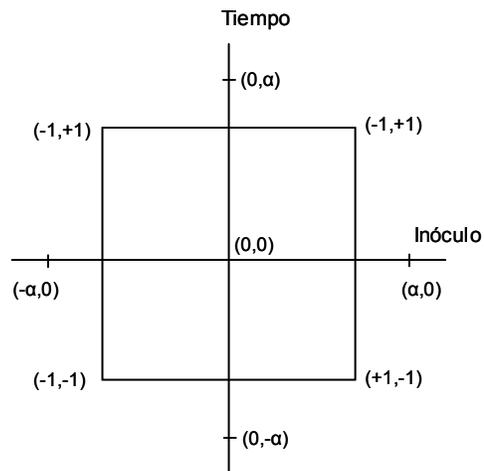
\* Valores determinados mediante software Statgraphics 5.0.  
Se fijaron Niveles de Melazas (1,5%) y CSL (0,5%).

## 3. Diseño de modelo de segundo orden.

Se realizó un diseño central compuesto (DCC) que consistió en un factorial completo  $2^2$  (+1, -1) con 4 experimentos axiales ( $0+\alpha$ ,  $0-\alpha$ ) y 4 experimentos centrales (0). En la **Tabla 3.10** y en la **Figura 3.4** se representan la matriz y el esquema gráfico del DCC.

**Tabla 3.10.** Diseño central compuesto

	Inóculo (%)	Tiempo (h)
<b>1</b>	+1	-1
<b>2</b>	0	0
<b>3</b>	0	0- $\alpha$
<b>4</b>	0	0
<b>5</b>	0+ $\alpha$	0
<b>6</b>	0- $\alpha$	0
<b>7</b>	0	0+ $\alpha$
<b>8</b>	-1	-1
<b>9</b>	0	0
<b>10</b>	-1	+1
<b>11</b>	+1	+1
<b>12</b>	0	0

**Figura 3.4.** Representación gráfica del diseño central compuesto para las variables inóculo y tiempo.

Los resultados obtenidos para la respuesta (GSH mg/L) se analizaron con ayuda del programa informático Statgraphics v 5.0 plus.

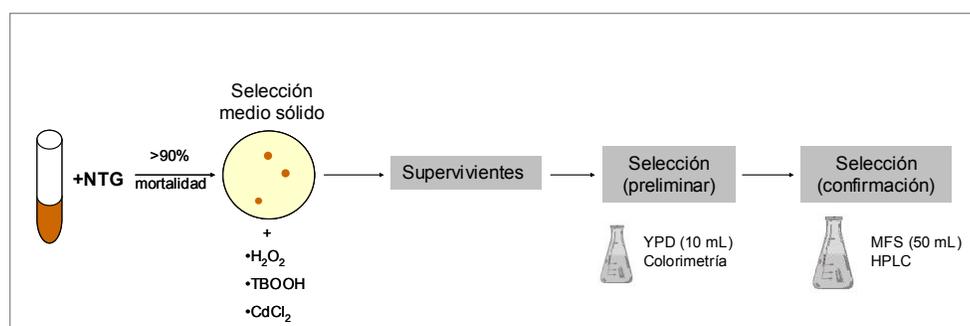
## **4. Resultados**



## 4.1 Obtención de cepas superproductoras de glutation

Las levaduras, en presencia de especies reactivas del oxígeno activan mecanismos de defensa para sobrevivir al estrés oxidativo. Entre estos mecanismos de defensa destaca la producción de GSH (Costa y Moradas-Ferreira, 2001). Debido a ello, la obtención de cepas de *S. cerevisiae* superproductoras de este tripéptido se realizó mediante rondas de mutación al azar utilizando nitrosoguanidina (NTG) y selección en presencia de compuestos oxidantes (peróxido de hidrógeno,  $H_2O_2$ , e hidroperóxido de terc-butilo, TBOOH) o metales pesados ( $CdCl_2$ ).

La estrategia seguida se muestra en la **Figura 4.1**. Una vez fijada la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los agentes oxidantes o  $CdCl_2$ , el tratamiento con NTG se realizó de forma que la mortalidad celular fuese mayor del 90%.



**Figura 4.1.** Estrategia para la selección de cepas superproductoras de GSH.

Tras sembrar la preparación de células mutadas en medio sólido conteniendo el agente de selección a la concentración adecuada, se analizó el contenido en GSH de las cepas resistentes. Dado el elevado número de mutantes analizados, se realizó una selección preliminar (**Figura 4.1**, ver apartado 3.13.2 de Materiales y Métodos) mediante fermentación en volúmenes

pequeños (10 mL). El medio de cultivo utilizado fue YPD, ya que permitía obtener biomasa en un tiempo de incubación relativamente corto.

El medio YPD es un medio de laboratorio con ingredientes de alto coste lo que lo hace poco adecuado para un proceso industrial a gran escala. Por esta razón, una vez seleccionados los mutantes con mayor productividad se recomprobó en volúmenes mayores de medio MFS, cuya formulación contiene componentes como melazas y CSL de menor coste y más adecuados para una producción a nivel industrial (**Figura 4.1**).

La selección de las cepas se realizó por comparación con respecto a la cepa parental de cada ronda y en base a dos parámetros: una producción de biomasa similar (medida como mg de peso seco/mL de cultivo) o, como máximo, un 20% menor y una producción específica de GSH (mg/g de biomasa) al menos un 10% superior. Conjugando estos dos parámetros se asegura una producción volumétrica (mg de GSH/L de cultivo) incrementada.

##### **4.1.1 Primera ronda de mutación**

La primera ronda de mutación se realizó utilizando como cepa parental *S. cerevisiae* CECT 1328. Esta cepa silvestre aislada originalmente a partir de vino, es capaz de producir etanol (12,8% vol/vol) en medio YPD con 50% de sacarosa (Benítez y col. 1983). Las condiciones de mutagénesis se establecieron mediante una curva dosis-respuesta con el objetivo de alcanzar una elevada mortalidad celular. La utilización de una concentración de mutágeno (NTG) de 0,15 mg/L durante 20 min de tratamiento, permitió lograr una tasa de mortalidad superior al 90%.

La selección en medio sólido de los mutantes se llevó a cabo utilizando  $\text{CdCl}_2$  y los oxidantes peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e hidroperóxido de tercbutilo (TBOOH). La concentración mínima inhibitoria (CMI) para la cepa parental resultó ser 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , 12 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 0,8 mM de TBOOH. La suspensión de células mutadas se sembró en placas de YPD conteniendo uno de los

compuestos indicados anteriormente y se incubaron a 28°C durante una semana.

A partir de las placas de selección, de las aproximadamente  $1,4 \times 10^8$  células sembradas, se obtuvieron un total de 188 mutantes. Se analizó la concentración de GSH y la biomasa producida de todos ellos a partir de cultivos crecidos durante 18 h en 10 mL de medio YPD. En este primer análisis, la concentración de GSH se determinó por colorimetría.

De todas las cepas analizadas sólo una de ellas (MRSG2) cumplió los criterios de selección. Estos resultados se comprobaron realizando cultivos por duplicado en medio MFS en mayor volumen.

La cepa MRSG2 (seleccionada en 12 mM  $H_2O_2$ ) mostró un mejor crecimiento (un incremento del 24,5%) y una producción específica un 14% superior, (4,66 mg/g frente a los 4,07 mg/g de la cepa parental). En base a estos resultados, la concentración de GSH (6,24 mg/L) fue un 36% mayor a la de la cepa parental. Esta cepa se seleccionó como punto de partida para realizar la segunda ronda de mutación.

#### **4.1.2 Segunda ronda de mutación**

La cepa MRSG2 se sometió a un nuevo tratamiento con NTG en condiciones similares a las utilizadas en la primera ronda. La tasa de mortalidad obtenida en este caso fue del 94%. Debido a problemas prácticos, en esta segunda ronda la selección se realizó utilizando TBOOH como oxidante. La CMI de TBOOH para esta cepa fue 1,65 mM. La suspensión de células mutadas se sembró en placas de YPD suplementadas con 1,65 mM de TBOOH y se incubaron a 28°C durante una semana.

De las, aproximadamente,  $1,95 \times 10^7$  células sembradas en las placas de selección, se obtuvieron 199 mutantes capaces de crecer bajo estas condiciones. El análisis del contenido en GSH, a partir de cultivos a pequeña escala se realizó

por colorimetría utilizando la cepa MRSG2 como control. De todas las cepas analizadas, se obtuvieron dos que cumplieron las dos condiciones de selección.

Al igual que en la primera ronda, los resultados preliminares obtenidos con las dos cepas seleccionadas se comprobaron en medio MFS, por duplicado y en mayor volumen (**Tabla 4.1**). De los dos mutantes analizados, MT32, presentó un aumento en la producción específica de GSH del 21% y una biomasa similar a la cepa parental por lo que se seleccionó como punto de partida para realizar la tercera ronda de mutación.

**Tabla 4.1.** Análisis de las cepas seleccionadas en la segunda ronda de mutación.

Cepa	Biomasa (mg/mL)	[GSH] (mg/g)	Incremento*	[GSH] (mg/L)	Incremento*
MRSG2	1,37	4,46	1	6,11	1
MT32	1,36	5,42	1,21	7,37	1,2
MT139	1,33	4,97	1,08	6,61	1,08

\*Con respecto a la cepa MRSG2.

#### 4.1.3 Tercera ronda de mutación

Una vez realizada la mutagénesis sobre la cepa MT32, en esta tercera ronda se utilizaron TBOOH y CdCl<sub>2</sub> como agentes de selección. La CMI de TBOOH y CdCl<sub>2</sub> para la cepa MT32 fue de 1,7 mM y 800 µM, respectivamente. Aproximadamente, la misma cantidad de células mutadas ( $4,5 \times 10^7$ ) se sembraron en placas de medio YPD conteniendo TBOOH o CdCl<sub>2</sub> a las concentraciones mínimas determinadas. Después de una semana de incubación a 28°C, se obtuvieron cuatro mutantes capaces de crecer en presencia de TBOOH y 108 mutantes resistentes al CdCl<sub>2</sub>. El análisis a mayor escala y en medio MFS, bajo los dos criterios establecidos, determinó que de los 112 mutantes analizados sólo cuatro de ellos cumplían los criterios de selección. La

**Tabla 4.2** muestra los resultados obtenidos para las cuatro cepas seleccionadas en medio MFS.

**Tabla 4.2.** Análisis de las cepas seleccionadas en la tercera ronda de mutación.

Cepa	Biomasa (mg/mL)	[GSH] (mg/g)	Incremento*	[GSH] (mg/L)	Incremento*
<b>MT32</b>	1,49±0,02	5,12±0,23	1	7,62	1
<b>MTC1</b>	1,96±0,01	5,73±0,15	1,11	11,23	1,47
<b>MTC29</b>	1,30±0,01	6,03±0,18	1,17	7,83	1,02
<b>MTC41</b>	1,69±0,03	7,39±0,01	1,44	12,48	1,63
<b>MTC45</b>	1,78±0,01	7,77±0,19	1,51	13,83	1,81

\*Con respecto a la cepa MT32.

La cepa MTC45, seleccionada a partir de una placa conteniendo  $\text{CdCl}_2$ , fue la que presentó un mayor incremento en la concentración específica, aumentando más de un 50%. Los valores de biomasa fueron también superiores (19%) a los de la cepa MT32. Esta cepa se seleccionó como parental para la cuarta ronda de mutación.

#### 4.1.4 Cuarta ronda de mutación

La selección de las células mutagenizadas de la cepa MTC45 se realizó en presencia de TBOOH o  $\text{CdCl}_2$ . En este caso, la CMI de ambos compuestos fue 1,8 mM para el TBOOH y 1,5 mM para el  $\text{CdCl}_2$ .

Se sembraron, aproximadamente,  $10^8$  células en placas conteniendo TBOOH y unas  $4 \times 10^7$  células sobre placas suplementadas con  $\text{CdCl}_2$ . En el primer medio, 99 mutantes fueron capaces de crecer después de una semana de incubación, mientras que en el medio conteniendo  $\text{CdCl}_2$  sobrevivieron 32 cepas.

EL análisis del contenido de GSH tras la fermentación en medio MFS permitió seleccionar tres cepas que cumplieron los criterios de selección como se muestra en la **Tabla 4.3**.

**Tabla 4.3.** Análisis de las cepas seleccionadas en la cuarta ronda de mutación.

Cepa	Biomasa (mg/mL)	[GSH] (mg/g)	Incremento*	[GSH] (mg/L)	Incremento*
<b>MTC45</b>	1,96±0,02	12,73±0,20	1	24,95	1
<b>M4C80</b>	1,58±0,01	15,33±0,30	1,2	24,22	-
<b>M4T89</b>	1,69±0,03	16,20±0,25	1,27	27,37	1,09
<b>M4T123</b>	1,84±0,01	15,41±0,15	1,21	28,35	1,13

\*Con respecto a la cepa MTC45.

La cepa M4T123, seleccionada en presencia de TBOOH, fue la que mostró los mejores resultados. Su crecimiento fue muy similar a la cepa parental, mientras que su contenido en GSH fue de 15,41 mg/g, es decir, un 21% más que la cepa MTC45. Esta cepa se seleccionó y utilizó para posteriores estudios.

Como conclusión de este apartado, se realizó un estudio comparativo que resume la progresión a lo largo de las cuatro rondas de mutación y selección realizadas. En este caso se realizaron tres réplicas de cultivos de cada cepa y se analizó la producción de biomasa y GSH de todas ellas. Como se puede observar en la **Tabla 4.4**, el incremento final alcanzado en la cepa M4T123 con respecto a la cepa parental original (CECT 1328), fue de casi cuatro veces en cuanto a la concentración específica, pasando de unos 4,6 mg/g a 17,11 mg/g, y aproximadamente cinco veces en cuanto a la concentración final (de 4,78 mg/L a 22,93 mg/L).

**Tabla 4.4.** Análisis de las cepas seleccionadas en las cuatro ronda de mutación.

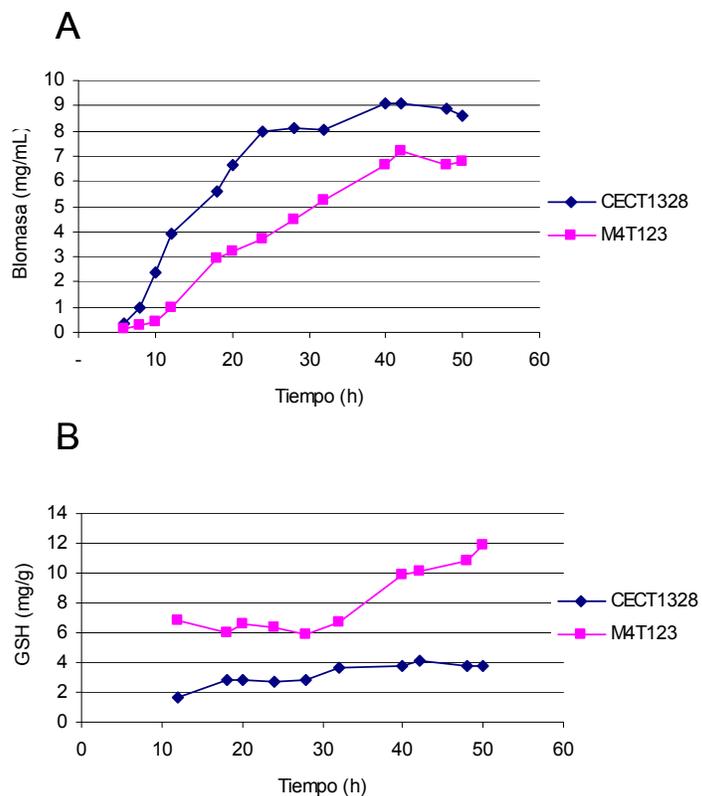
Cepa	Biomasa (mg/mL)	[GSH]		Incremento	
		(mg/g)	(mg/L)	(mg/g)	(mg/L)
<b>CECT 1328</b>	1,04±0,01	4,60±0,15	4,78	1	1
<b>MRS2</b>	1,95±0,02	5,25±0,02	10,23	1,14	2,14
<b>MT32</b>	1,67±0,01	7,34±0,15	12,26	1,6	2,6
<b>MTC45</b>	1,62±0,03	10,34±0,09	16,75	2,2	3,5
<b>M4T123</b>	1,34±0,01	17,11±0,18	22,93	3,7	4,8

## 4.2 Caracterización de la cepa M4T123

Una vez obtenida la cepa superproductora de GSH, M4T123, se realizó un estudio comparativo entre ésta y la cepa original (CECT 1328), con el fin de determinar las posibles alteraciones genéticas implicadas en un incremento tan acusado de la producción del tripéptido.

### 4.2.1 Curvas de crecimiento

En primer lugar, se determinó el crecimiento y la concentración de GSH en ambas cepas tanto en medio YPD como en medio MFS.



**Figura 4.2.** Curvas de crecimiento en medio YPD. **A.** Biomasa, **B.** Producción específica de GSH.

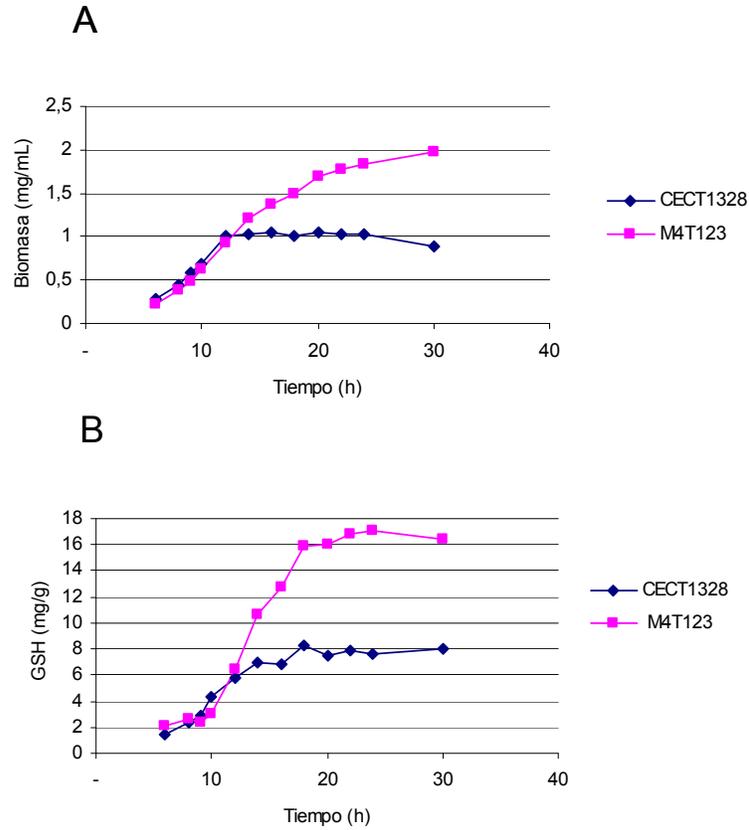
Como se muestra en la **Figura 4.2A**, la cepa M4T123 mostró un crecimiento menor que la cepa CECT 1328 en medio YPD. La cantidad de biomasa a lo largo de toda la fermentación mostró unos valores entre un 22% (42 h) y un 75% (12 h) más bajos que el control. Sin embargo, y pese a su menor crecimiento, la productividad específica se mantuvo en valores dos veces más altos en la cepa M4T123 que el control durante las primeras 30 horas de cultivo, para, posteriormente y hasta las 50 h, incrementarse unas 2,5-3 veces alcanzándose valores próximos a los 12 mg/g (**Figura 4.2B**).

Como se ha mencionado anteriormente, el medio YPD no es económicamente apto para realizar una producción a nivel industrial, por lo que se comprobó también el crecimiento y la producción de GSH en el medio MFS.

El crecimiento de ambas cepas en el medio MFS fue mucho menor que en YPD (**Figura 4.3A**), probablemente debido a la utilización de melazas como fuente de carbono y, sobre todo, a una menor concentración de nitrógeno, ya que este medio tan sólo contiene un 0,25% de CSL.

Es interesante resaltar que, mientras que la cepa M4T123 presentó un perfil de crecimiento normal, en la cepa silvestre CECT 1328 se observó un cese en la producción de biomasa transcurridas 14 horas de incubación. Estas diferencias en el perfil de crecimiento podrían deberse a que la cepa CECT 1328 presente un diferente grado de resistencia a algún componente tóxico presente en el medio, o generado durante el crecimiento. De hecho se ha descrito que las melazas de remolacha presentan una composición compleja en la que están presentes metales pesados y restos de pesticidas (Curtin, 1983).

Por otra parte, como muestra la **Figura 4.3B**, la concentración específica de GSH en ambas cepas fue mayor en este medio, alcanzando valores de 17 mg/g en la cepa mutante y de 8 mg/g en la cepa CECT 1328.



**Figura 4.3.** Curvas de crecimiento en medio MFS. **A.** Biomasa, **B.** Producción específica de GSH.

## 4.2.2. Análisis de la expresión génica

### 4.2.2.1 Medio YPD

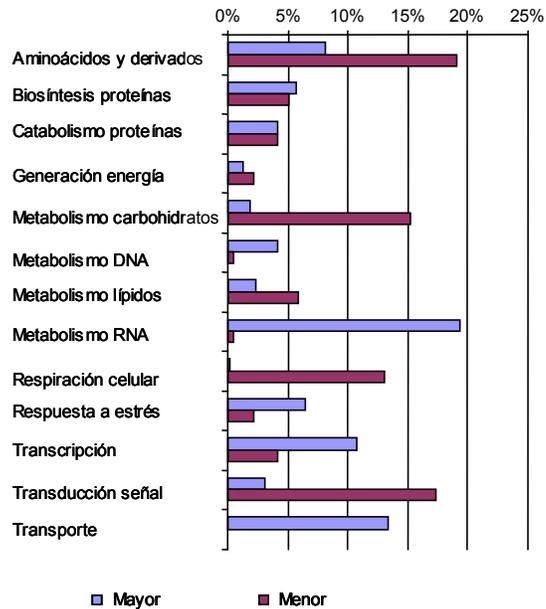
Para analizar los cambios de la expresión génica en la cepa superproductora M4T123 con respecto a la cepa parental CECT 1328, se realizó un estudio utilizando la tecnología de microarrays de cDNA (GeneChip<sup>®</sup>, Affymetrix), tal como se describe en el apartado 3.17 de Materiales y Métodos.

Para ello se realizaron cultivos en medio YPD de las dos cepas y se tomaron muestras a las 10 horas de incubación. Se eligió este tiempo para la recogida de la biomasa debido a que en ese momento la tasa de crecimiento de ambas cepas era similar ( $\mu = 0,3$ ) y, además, la calidad del RNA extraído era mayor a diferencia del obtenido a partir de muestras recogidas a tiempos de incubación más largos (12-24 h), que se encontraba parcialmente degradado.

Tras comprobar la calidad del RNA, se sintetizó cDNA marcado con biotina y estas preparaciones se hibridaron con microarrays "Yeast Genome S98" (Affymetrix) que contiene 6.400 genes de *S. cerevisiae*. Los cDNAs generados hibridan con los genes representados en el microarray emitiendo fluorescencia, a 560 nm cuya intensidad determina el nivel de expresión.

El análisis de los datos con el programa informático "Gene Expression Análisis Software" (Affymetrix) determinó que unos 750 genes de la cepa M4T123 habían modificado su expresión más de 1,5 veces con respecto a la cepa CECT 1328. La **Figura 4.4** muestra el porcentaje de genes con mayor o menor nivel de expresión en la cepa mutante con respecto a la cepa control, agrupados según los procesos celulares en los que intervienen.

Entre los genes reprimidos destacan los responsables de la biosíntesis de aminoácidos y derivados, así como los implicados en el metabolismo de carbohidratos y en la transducción de señales. Los genes más sobreexpresados fueron aquellos relacionados con el metabolismo del RNA, los implicados en el transporte de moléculas y los que participan en los procesos de transcripción (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4.** Nivel de expresión (ratio M4T123/ CECT 1328) en medio YPD. La agrupación de genes se realizó utilizando el programa "GO term finder" (<http://www.yeastgenome.org>).

Un análisis más detallado de los resultados permitió observar que los genes directamente relacionados con la síntesis de glutatión: *GSH1* y *GSH2*, así como los implicados en la síntesis de cisteína *CYS3* y *CYS4*, estaban sobreexpresados en la cepa mutante M4T123 (**Tabla 4.5**). En concreto, dos de ellos, *GSH1* y *CYS3* mostraron un incremento en la expresión de 2,8 y 2 veces con respecto a la cepa control, respectivamente. Ambos genes son claves para la biosíntesis del tripéptido, ya que, el producto de *CYS3*, cistationina  $\gamma$ -liasa, cataliza la síntesis de cisteína y  $\gamma$ -glutamilcisteinilsintetasa, el producto de *GSH1*, cataliza la formación del dipéptido, siendo ésta la etapa clave y limitante del proceso.

En cuanto a los otros dos aminoácidos precursores del GSH, L-glutamato y glicina, también se observó el incremento de expresión de algunos genes presentes en sus rutas de biosíntesis

**Tabla 4.5.** Variación ( $\geq 1,5$  veces) en el nivel de expresión de genes en medio YPD.

<b>Proceso biológico</b>	<b>Gen</b>	<b>Expresión*</b>		
<b>Biosíntesis aminoácidos</b>	<i>SUL2</i>	10,6		
	<i>MET14</i>	2,0		
	<i>MET16</i>	3,0		
	<b>metionina</b>	<i>MET2</i>	1,6	
		<i>MET6</i>	2,5	
	<b>S-adenosilmetionina</b>	<i>SAM1</i>	2,5	
		<i>SAM2</i>	-2	
	<b>cisteína</b>	<i>CYS3</i>	2	
		<i>CYS4</i>	1,6	
		<b>glutamato</b>	<i>GLN1</i>	2,3
		<b>glicina</b>	<i>SHM1</i>	2
			<i>SER2</i>	2,1
	<b>Biosíntesis GSH</b>	<b>glutation</b>	<i>GSH1</i>	2,8
<b>glutation</b>		<i>GSH2</i>	1,5	
<b>Transportador amonio</b>	<i>MEP1</i>	2,5		
<b>Permeasas (aa, péptidos)</b>	<i>MUP1</i>	2,8		
	<i>PTR2</i>	2		
	<i>HSP30</i>	-2,8		
<b>Resistencia metales y drogas</b>	<i>YCF1</i>	4		
	<i>ZRC1</i>	2		
	<i>FLR1</i>	22,6		
<b>Estrés Oxidativo</b>	<b>reguladores</b>	<i>SKN7</i>	4	
	<b>enzimas</b>	<i>GPX2</i>	4	
		<i>GRX1</i>	-4	
		<i>GTT1</i>	-2,8	
<b>Metabolismo alcohol</b>	<i>PDC5</i>	-4,9		

\*Indica el incremento (valor positivo) o disminución (valor negativo) de la transcripción obtenido a partir del ratio M4T123/CECT 1328.

Así, en el caso del glutamato, el gen *GLN1*, que codifica para la glutamina sintetasa, estaba sobreexpresado 2,3 veces. El gen *SER2*, que codifica la fosfoserina fosfatasa, la cual interviene en la síntesis de L-serina, mostró una expresión dos veces superior a su homólogo de la cepa control. Además, el gen *SHM1* cuyo producto cataliza la síntesis de glicina a partir de la serina, también mostró un nivel de expresión dos veces mayor con respecto a la cepa silvestre.

También se observó que varios de los genes implicados en la vía de asimilación de azufre (*SUL2*, *MET14*, *MET16*), y biosíntesis de aminoácidos azufrados, como la metionina (*MET2*, *MET6*) y S-adenosilmetionina (*SAM1*) se encontraban sobreexpresados.

El análisis de algunos genes importantes relacionados con el estrés oxidativo permitió observar que únicamente el regulador *SKN7* mostró un nivel de expresión mucho más alto en la cepa mutante. Otros reguladores implicados en la respuesta celular frente a la exposición a peróxidos o sales de cadmio como *YAP1* o *MET4* no mostraron cambios significativos.

Por otra parte, los resultados obtenidos para los genes que codifican las enzimas implicadas en contrarrestar procesos oxidativos fueron dispares mostrando tanto sobreexpresión, como el caso de la glutation peroxidasa (*GPX2*) como una fuerte represión, como por ejemplo, la glutation reductasa (*GRX1*) y la glutation transferasa (*GTT1*).

También se pudo apreciar que genes implicados en la resistencia a metales y drogas, como *YCF1*, *ZRC1* y *FLR1* aumentaban su expresión en la cepa mutante (**Tabla 4.5**). Este incremento fue especialmente relevante para *FLR1* en el que se detectó un nivel de expresión más de 20 veces superior con respecto a la cepa silvestre.

#### 4.2.2.2 Medio MFS

Los datos obtenidos al realizar las curvas de crecimiento en medio YPD y medio MFS mostraron que el comportamiento de ambas cepas era distinto, tanto en producción de biomasa como de GSH. Por ello, al igual que en el medio YPD, se realizó un análisis de la expresión génica en medio MFS.

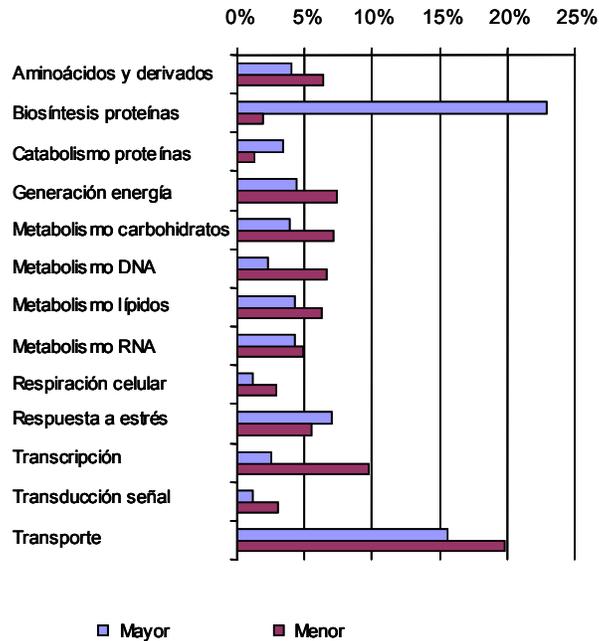
Se tomaron muestras a partir de cultivos de las dos cepas crecidas en medio MFS, a las 9 horas de incubación ya que a este tiempo la tasa de crecimiento de ambas cepas era similar ( $\mu = 0,12$ ).

Los resultados mostraron que el nivel de expresión de 1.130 secuencias génicas se había modificado más de 1,5 veces en la cepa M4T123 con respecto a la CECT 1328. Esto supone un 40% más de secuencias con su nivel de expresión modificado que en el medio YPD.

En la **Figura 4.5** se muestra el porcentaje de genes que mostraron dicha variación, agrupados según los procesos celulares en los que intervienen.

De todos ellos, destacan dos grupos: los genes implicados en la biosíntesis de proteínas y los que intervienen en el transporte de moléculas. La mayoría de los genes pertenecientes al primer grupo mostraron un nivel de expresión más elevado, mientras que entre los pertenecientes al segundo grupo, el número de genes que mostraron una sobreexpresión fue similar a los reprimidos.

Los genes directamente relacionados con la síntesis de GSH, *GSH1* y *GSH2*, no mostraron cambios significativos. Sin embargo, como se muestra en la **Tabla 4.6**, *CYS3*, implicado en la síntesis de cisteína, mostró un nivel de expresión de 2,29 veces superior al obtenido con la cepa silvestre.



**Figura 4.5.** Nivel de expresión (ratio M4T123/CECT 1328) en medio MFS. La agrupación de genes se realizó utilizando el programa "GO term finder" (<http://www.yeastgenome.org>).

En un estudio más detallado de los genes cuyo nivel de expresión se ha modificado (**Tabla 4.6.**) se observa que los genes relacionados con la síntesis de glutamato y glicina mostraron una mayor expresión en la cepa M4T123 que en la silvestre. Así, tanto el gen *GLN1* (glutamina sintetasa) como *GLT1* (glutamato sintasa), mostraron una expresión unas 1,7 y 1,8 veces más alta, respectivamente. En el caso de la glicina, al igual que se observó con el medio YPD, el gen *SER2* (fosfoserina fosfatasa) que sintetiza serina, utilizada como precursor de la glicina, también presentaba un nivel de expresión unas 4 veces más alto en la cepa mutante.

Se observó también, que varios de los genes implicados en la vía de asimilación de azufre (*SUL1*, *SUL2*, *MET3*) y biosíntesis de aminoácidos azufrados, como la metionina (*MET2*, *MET6*) y S-adenosilmetionina (*SAM2*), se encontraban reprimidos.

**Tabla 4.6.** Variación ( $\geq 1,5$  veces) en el nivel de expresión de los genes en medio MFS.

Proceso biológico		Gen	Expresión*
<b>Biosíntesis aminoácidos</b>		<i>SUL1</i>	-5,5
		<i>SUL2</i>	-1,5
		<i>MET3</i>	-1,9
<b>metionina</b>		<i>MET2</i>	-2,8
		<i>MET6</i>	-2,4
<b>S-adenosilmetionina</b>		<i>SAM2</i>	-1,8
<b>cisteína</b>		<i>CYS3</i>	2,29
<b>glutamato</b>		<i>GLN1</i>	1,7
		<i>GLT1</i>	1,8
		<i>GDH3</i>	-2
<b>glicina</b>		<i>SER2</i>	4
<b>Represión catabólica por Nitrógeno</b>			
<b>Transportadores amonio</b>		<i>MEP1</i>	3
		<i>MEP2</i>	73
		<i>MEP3</i>	2,4
<b>Catabolismo alantoína</b>		<i>DAL5</i>	14
<b>Degradación urea</b>		<i>DUR1,2</i>	48
		<i>DUR3</i>	36
<b>Permeasas (aa, péptidos)</b>		<i>GAP1</i>	8
		<i>PTR2</i>	36
		<i>HSP30</i>	7
		<i>CIS2</i>	2,8
		<i>URE2</i>	-1,5
<b>Resistencia metales y drogas</b>		<i>YCF1</i>	2
		<i>FLR1</i>	26
<b>Estrés Oxidativo</b>			
<b>Reguladores</b>		<i>MET4</i>	-1,5
		<i>MET32</i>	1,5
		<i>MET28</i>	-1,8
<b>Enzimas</b>		<i>TRX2</i>	2
		<i>GRX5</i>	2
		<i>TTR1</i>	2
		<i>GTT1</i>	-2
		<i>GTT2</i>	8,5
<b>Vía pentosas fosfato</b>		<i>ZWF1</i>	3,5
		<i>RPE1</i>	3,1
<b>Metabolismo alcohol</b>		<i>CDC19</i>	4,3
		<i>ENO2</i>	2,5
		<i>PDC5</i>	9,8

\*Indica el incremento (valor positivo) o disminución (valor negativo) de la transcripción obtenido a partir del ratio M4T123/CECT 1328.

Es importante destacar los cambios en los genes relacionados con la represión catabólica por nitrógeno (**Tabla 4.6**). Los transportadores de amonio (*MEP1*, *MEP2* y *MEP3*), los genes implicados en la degradación de urea (*DUR1,2* y *DUR3*), en el catabolismo de la alantoína (*DAL5*) y la permeasa general para aminoácidos (*GAP1*) mostraron unos niveles de expresión muy elevados con respecto a la cepa silvestre. Otro gen que también se presentaba una alta expresión fue *CIS2*, que codifica la  $\gamma$ -glutamiltanspeptidasa, implicada en la degradación de glutatión y que se induce bajo condiciones de limitación de nitrógeno.

Entre los reguladores relacionados con el estrés oxidativo, sólo el gen *MET32* mostraba una expresión más alta, mientras que en el caso de *YAP1*, *SKN7* y *MET31* no se apreciaron cambios, y *MET4* y *MET28* estaban reprimidos.

Al igual que en el medio YPD, se observó que dos genes cuyos productos están implicados en la resistencia a metales y drogas, *YCF1* y *FLR1*, aumentaron su expresión. El nivel de expresión del segundo, prácticamente idéntico en ambos medios de cultivo, fue el más elevado de todos los genes analizados, a excepción de los genes relacionados con la represión catabólica por nitrógeno.

Otro grupo de genes con un nivel de expresión alto, fueron los relacionados con el metabolismo del alcohol. El gen *CDC19* que codifica para la piruvato quinasa 1, enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato en la etapa final de la glicólisis, mostró una expresión cuatro veces más alta en relación a la cepa silvestre. Además, los genes implicados en la fermentación alcohólica, *ENO2*, que codifica la enolasa 2, enzima que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, y *PDC5* cuyo producto, la piruvato descarboxilasa, cataliza la conversión del piruvato a acetaldehído, también mostraron unos niveles de expresión muy elevados.

Es importante destacar también los cambios observados en algunos genes que participan en la ruta de las pentosas fosfato. Tanto el gen *ZWF1* que codifica para la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima clave para la síntesis de NADPH, como el gen *RPE1* que codifica la ribulosa-5-fosfato

epimerasa mostraron un aumento considerable en su expresión en la cepa mutante.

#### 4.2.3. Cuantificación de la expresión génica por RT-PCR

Con el fin de confirmar y analizar en mayor profundidad los resultados obtenidos con los microarrays en ambos medios de cultivo, se estudiaron los niveles de expresión de aquellos genes que estaban directa o indirectamente relacionados con la síntesis de glutatión. En función de estas características, se eligieron los diez genes que se muestran en la **Tabla 4.7**.

**Tabla 4.7.** Genes analizados mediante RT-PCR.

<b>Gen</b>	<b>Enzima</b>	<b>Proceso biológico</b>
<i>GSH1</i>	$\gamma$ -Glutamilcisteinil sintetasa	Biosíntesis de GSH
<i>GSH2</i>	Glutatión sintetasa	Biosíntesis de GSH
<i>CYS3</i>	Cistationina $\gamma$ -liasa	Biosíntesis de la cisteína
<i>CYS4</i>	Cistationina $\beta$ -sintasa	Biosíntesis de la cisteína
<i>MET2</i>	Homoserina-O-acetiltransferasa	Biosíntesis de metionina
<i>SER2</i>	Fosfoserina fosfatasa	Biosíntesis de serina
<i>ADH1</i>	Alcohol deshidrogenasa1	Fermentación glucosa
<i>CDC19</i>	Piruvato quinasa	Fermentación glucosa
<i>ENO2</i>	Enolasa 2	Fermentación glucosa
<i>PDC5</i>	Piruvato descarboxilasa	Fermentación glucosa

Para obtener resultados comparativos, se utilizó para el análisis una muestra de los RNA aislados para los experimentos de microarrays, tanto en medio YPD como en medio MFS. Se comprobó la especificidad de las

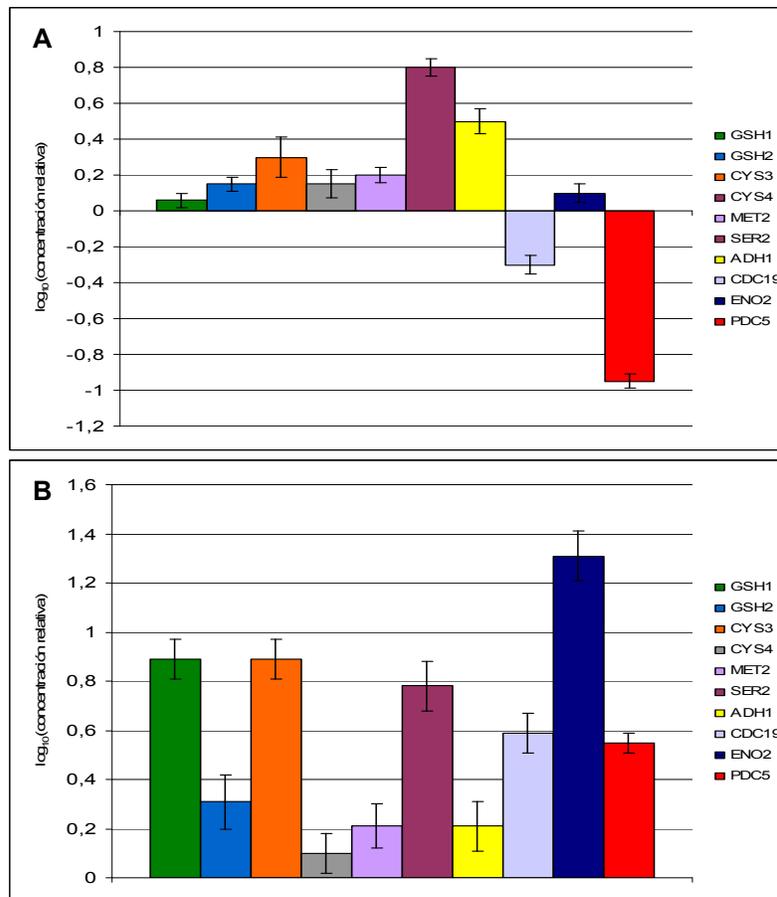
amplificaciones realizando las curvas de desnaturalización. Las curvas de desnaturalización de los diez genes cuantificados mostraron un solo pico, indicando la especificidad de las reacciones.

En la **Figura 4.6** se muestran los cambios de expresión de los genes analizados tanto en medio YPD (**Figura 4.6 A**) como en medio MFS (**Figura 4.6 B**).

Cabe destacar que los genes directamente responsables de la síntesis de glutatión (*GSH1* y *GSH2*) y los implicados en la síntesis de cisteína (*CYS3* y *CYS4*) estaban sobreexpresados en la cepa M4T123 con respecto a la cepa silvestre, en ambos medios. El nivel de expresión de estos genes fue más alto en el medio MFS y, especialmente relevante, en *CYS3* y *GSH1* para los que se observó un incremento de expresión en la cepa mutante de unas 3 y 7 veces, respectivamente (**Figura 4.6**).

Se detectó también una sobreexpresión en la cepa mutante de los genes *MET2* ( $\approx \times 1,6$ ) y *SER2* ( $\approx \times 6$ ) tanto en medio YPD como en MFS.

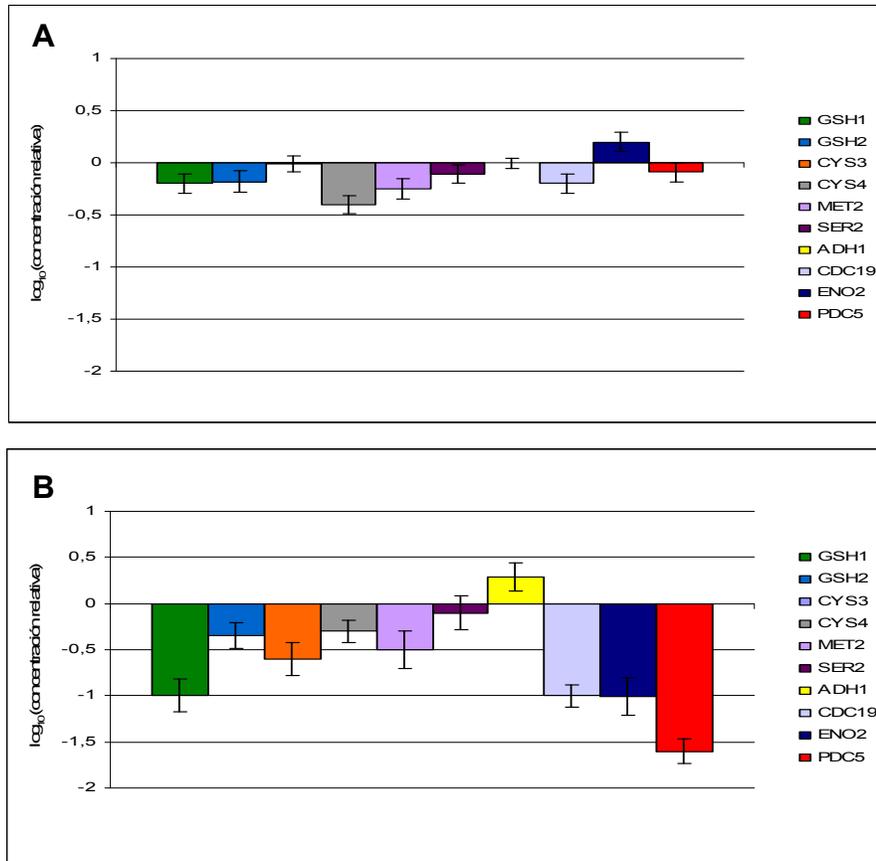
La expresión de los genes implicados en la fermentación de glucosa a etanol (*ADH1*, *CDC19*, *ENO2* y *PDC5*) mostró diferencias importantes dependiendo del medio de cultivo utilizado (**Figura 4.6**). Cuando el crecimiento se realizó en medio YPD, se observó un elevado nivel de expresión de los genes *ADH1* (aldehído deshidrogenasa 1) y, en menor medida, *ENO2* (enolasa 2) en la cepa mutante con respecto a la cepa control. Por el contrario, los genes *CDC19* (piruvato quinasa) y *PDC5* (piruvato decarboxilasa) mostraron un nivel de expresión muy bajo, sobre todo en el caso del segundo. El comportamiento en el medio MFS fue diferente: los genes *ADH1* y *ENO2* mostraron un nivel de expresión similar al medio YPD (**Figura 4.6B**), mientras que, por el contrario, los genes *CDC19* y *PDC5* alcanzaron un notable incremento en su nivel de expresión.



**Figura 4.6.** Análisis por RT-PCR. **A.** Medio YPD, **B.** Medio MFS. Los resultados representan el  $\log_{10}$  del ratio entre ambas cepas (M4T123/CECT 1328). Las medidas están normalizadas por la expresión del rDNA 18S. Los valores obtenidos son la media de tres réplicas.

El análisis comparativo del nivel de expresión de estos genes en cada cepa en los dos medios de cultivo, permitió observar que en la cepa mutante M4T123, apenas existían diferencias de expresión en ambos medios (**Figura 4.7A**). En todos los casos, excepto *CYS4*, el coeficiente de expresión relativa obtenido fue muy bajo ( $\leq 0,25$ ).

Por el contrario, en la cepa CECT 1328 (**Figura 4.7B**) sí existieron diferencias importantes en los niveles de expresión de los genes analizados dependiendo del medio de cultivo. En todos ellos, excepto *ADH1*, se observó una expresión menor en MSF que en YPD. La mayor disminución en el nivel de expresión se produjo en el caso del gen *GSH1* y de los genes relacionados con la fermentación alcohólica (*CDC19*, *ENO2* y *PDC5*).



**Figura 4.7.** Análisis de expresión por RT-PCR (ratio MSF/YPD) **A.** Cepa M4T123. **B.** Cepa CECT 1328.

La robustez de estos resultados se analizó comparando los datos obtenidos mediante RT-PCR con los obtenidos en los microarrays (**Tabla 4.8**).

En los genes directamente responsables de la síntesis de glutatión (*GSH1* y *GSH2*) y los implicados en la síntesis de cisteína (*CYS3* y *CYS4*), los resultados obtenidos en el medio YPD mostraron valores muy similares mediante ambas técnicas. En cambio, en el medio MFS, mientras que para *CYS3* se observó mayor expresión en la cepa mutante en los dos medios y por ambas técnicas, los otros tres genes (*GSH1*, *GSH2* y *CYS4*) mostraban un mayor nivel de expresión en los resultados obtenidos por RT-PCR, mientras que no se detectaron cambios significativos en los microarrays.

Con el gen *SER2*, implicado en la biosíntesis de serina, se obtuvieron resultados muy similares con ambas técnicas tanto en medio YPD como en medio MFS. En cambio, para *MET2* los resultados fueron similares en YPD pero divergentes en MFS ya que, mediante microarrays se observó un descenso en la expresión en la cepa mutante mientras que por RT-PCR se obtuvo un incremento apreciable.

Con los genes implicados en el catabolismo de la glucosa se observaron resultados similares en medio YPD para *ENO2* y *PDC5*, mientras que existían diferencias notables para los otros dos genes analizados (*ADH1* y *CDC19*). En el medio MFS todos los resultados, a excepción del obtenido para *ADH1* en los microarrays, mostraron la sobreexpresión de los genes en la cepa mutante. Los valores fueron prácticamente idénticos para *CDC19*, para *ENO2* el nivel de expresión fue diez veces mayor al medirlo por RT-PCR y, al contrario, en el caso de *PDC5* la expresión fue tres veces superior al utilizar microarrays.

**Tabla 4.8.** Resumen del análisis de la expresión génica mediante microarrays de cDNA y RT-PCR.

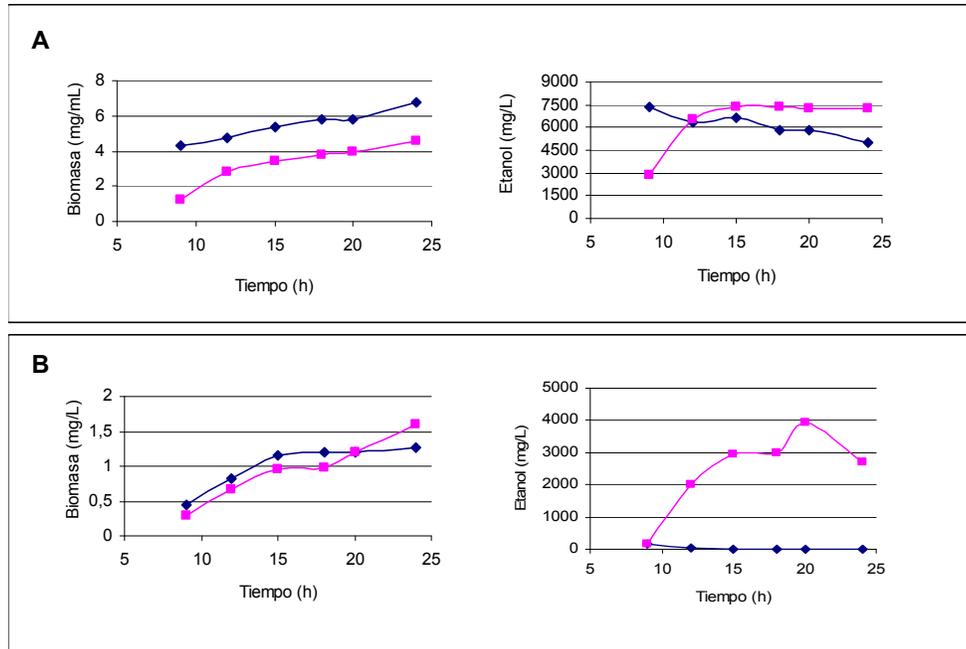
Gen	YPD*		MFS*	
	Array	RT-PCR	Array	RT-PCR
<i>GSH1</i>	2,8	1,15	sc	7,76
<i>GSH2</i>	1,5	1,41	sc	2,04
<i>CYS3</i>	2	2	2,29	7,76
<i>CYS4</i>	1,6	1,41	sc	1,26
<i>MET2</i>	1,6	1,58	-2,8	1,62
<i>SER2</i>	4	6,31	4	6,03
<i>ADH1</i>	sc	3,16	sc	1,62
<i>CDC19</i>	sc	-2	4,28	3,89
<i>ENO2</i>	1	1,2	2,46	20,42
<i>PDC5</i>	-4,9	-8,90	9,84	3,55

\*Indica el incremento (valor positivo) o disminución (valor negativo) de la transcripción obtenido a partir del ratio M4T123/CECT 1328. sc: sin cambio.

#### 4.2.4 Análisis de la concentración de etanol

Los resultados obtenidos tanto con microarrays como por RT-PCR mostraron importantes diferencias en los niveles de expresión de los genes relacionados con la fermentación alcohólica en ambas cepas en los dos medios de cultivo estudiados. Para verificar la materialización fenotípica de estas diferencias, se midió la concentración de etanol producido por ambas cepas en los cultivos utilizados para obtener los RNAs empleados en el análisis de expresión génica.

Como se muestra en la **Figura 4.8A**, la concentración de etanol producido por la cepa M4T123 en medio YPD fue mayor que el generado por la cepa silvestre, excepto al inicio de la fermentación (9 h). El valor máximo se alcanzó a las 14 horas de incubación y se mantuvo constante hasta, al menos, 24 h (7379 mg/L).



**Figura 4.8.** Producción de etanol. **A.** Medio YPD. **B.** Medio MFS.

■ M4T123 ◆ CECT 1328

En medio MFS, la cepa mutante mostró una producción de etanol inferior a la alcanzada en el medio YPD. A partir de las 12 h de incubación se obtuvieron concentraciones de 2000 mg/L hasta alcanzar los 4000 mg/L a las 20 h. (**Figura 4.8B**). En cambio, la cepa CECT 1328 mostró un comportamiento totalmente diferente al observado en el medio YPD ya que sólo se detectaron trazas de etanol a las 9 horas de fermentación.

Estas diferencias en los niveles de producción de alcohol se correlacionan con las diferencias ya mencionadas, en los niveles de expresión de los genes implicados en el metabolismo fermentativo de la glucosa (*ADH1*, *CDC19*, *ENO2* y *PDC5*). Así, la cepa mutante fue capaz de sintetizar etanol en ambos medios de cultivo ya que su patrón de expresión no sufrió apenas cambios en ambas condiciones (**Figura 4.7A**). Sin embargo, la cepa CECT 1328 sólo fue capaz de producir etanol en medio YPD coincidiendo con los resultados obtenidos por RT-PCR donde los genes *CDC19*, *ENO2* y *PDC5* mostraron unos niveles de

expresión negativos, indicando, por tanto, el bajo nivel de transcripción en medio MFS(**Figura 4.7B**).

### **4.3 Optimización de los parámetros de cultivo**

Debido a que la producción de GSH a nivel industrial no puede realizarse en medio YPD, ya que resultaría económicamente inviable, es necesario utilizar un medio complejo cuya composición se base en materias primas baratas como, por ejemplo, melazas, CSL, aceites vegetales o harinas.

Como ya se ha mostrado en el apartado 4.2.1, el mutante M4T123 mostró una producción específica de GSH mayor al utilizar el medio MFS. Sin embargo, la concentración obtenida fue menor a la lograda en medio YPD debido a la menor cantidad de biomasa alcanzada en medio MFS. Las condiciones de cultivo (% de inóculo, tiempo y porcentaje de los componentes del medio) que permiten alcanzar estos niveles de producción de GSH, fueron elegidos en base a datos bibliográficos, pero no necesariamente se ajustan a las mejores condiciones de cultivo de la cepa mutante. Con el fin de intentar mejorar estos resultados, se realizaron estudios para optimizar las condiciones de cultivo mediante el diseño de experimentos.

Para ello, se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) que permite determinar la influencia e importancia de los factores que intervienen en un proceso, así como las interacciones entre ellos, con un número mínimo de ensayos.

#### **4.3.1 Modelo de primer orden**

Como primer paso de la estrategia secuencial de la MSR, se planteó un experimento basado en un diseño factorial completo de dos niveles con cuatro variables independientes. En la **Tabla 4.9** se muestran las variables, su codificación y los niveles ensayados para cada una de ellas.

**Tabla 4.9.** Variables y niveles utilizados en el diseño factorial  $2^4$ .

Variable natural	Variable Codificada	Nivel		
		-1	0	+1
Melaza (%)	$X_1$	1,5	3,75	6
CSL (%)	$X_2$	0,5	2,25	4
Inóculo (% v/v)	$X_3$	1	3	5
Tiempo (h)	$X_4$	24	36	48

El diseño utilizado, un factorial  $2^4$ , consistió en 16 experimentos, al que se añadieron 6 puntos centrales (nivel 0), con el objeto de estimar el error experimental y permitir determinar el ajuste al modelo. Todos los cultivos se iniciaron a partir de un inóculo común de la cepa M4T123 crecido en medio YPD durante 24 horas a 28°C

En la **Tabla 4.10** se muestra la matriz para el diseño utilizado y los resultados obtenidos para la respuesta (mg GSH/L). Los resultados para los 6 puntos centrales fueron muy similares (media 16,91 mg GSH/L), indicando una buena reproducibilidad en el método de análisis y un bajo error experimental. Dos combinaciones, (experimentos 3 y 17) permitieron obtener los valores más altos de la respuesta: 39,04 y 49,97 mg GSH/L, respectivamente.

**Tabla 4.10.** Matriz experimental y valores obtenidos para la respuesta.

	<b>Melazas</b> X <sub>1</sub>	<b>CSL</b> X <sub>2</sub>	<b>Inóculo</b> X <sub>3</sub>	<b>Tiempo</b> X <sub>4</sub>	<b>Biomasa</b> (mg/mL)	<b>GSH</b> (mg/L)
<b>1</b>	0	0	0	0	4,24	16,68
<b>2</b>	-1	-1	-1	-1	0,65	2,82
<b>3</b>	-1	+1	+1	+1	6,03	39,04
<b>4</b>	-1	+1	-1	-1	0,89	0
<b>5</b>	0	0	0	0	3,68	17,31
<b>6</b>	-1	+1	+1	-1	1,68	4,17
<b>7</b>	+1	+1	-1	+1	3,73	7,58
<b>8</b>	+1	+1	+1	-1	2,47	5,27
<b>9</b>	+1	+1	-1	-1	0,78	2,98
<b>10</b>	0	0	0	0	3,73	17,25
<b>11</b>	0	0	0	0	4,08	16,5
<b>12</b>	+1	-1	-1	+1	0	0
<b>13</b>	-1	+1	-1	+1	5,95	38,68
<b>14</b>	-1	-1	+1	-1	1,42	10,72
<b>15</b>	+1	-1	+1	-1	0	0
<b>16</b>	+1	-1	-1	-1	0	0
<b>17</b>	-1	-1	+1	+1	2,52	49,97
<b>18</b>	+1	-1	+1	+1	0	0
<b>19</b>	-1	-1	-1	+1	2,06	29,93
<b>20</b>	0	0	0	0	3,78	16,78
<b>21</b>	+1	+1	+1	+1	5,74	19,04
<b>22</b>	0	0	0	0	2,74	16,94

El análisis del diseño experimental a partir de los resultados obtenidos permitió determinar la influencia de cada factor principal, así como sus interacciones, sobre la respuesta. Como se muestra en la **Tabla 4.11**, el análisis de varianza mostró que las melazas (A), el inóculo (C), el tiempo (D) y la interacción entre las melazas y el tiempo (AD) influyeron significativamente (todos mostraron un valor del estadístico de probabilidad,  $p < 0,05$ ) en la producción de GSH.

**Tabla 4.11.** Análisis de varianza (ANOVA) para la producción de GSH.

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrado	F	p
A: melazas	1339,01	1	1339,01	202,39	0,0000
B: CSL	29,7843	1	29,7843	4,50	0,0873
C: inóculo	148,535	1	148,535	22,45	0,0052
D: tiempo	1682,85	1	1682,85	254,36	0,0000
AB	141,908	1	141,908	21,45	0,0057
AC	28,7028	1	28,7028	4,34	0,0917
AD	1012,67	1	1012,67	153,06	0,0001
BC	4,03006	1	4,03006	0,61	0,4704
BD	36,3308	1	36,3308	5,49	0,0661
CD	25,2758	1	25,2758	3,82	0,1080
"Lack of fit"	129,439	6	21,5731	3,26	0,1078
Error puro	33,0801	5	6,61602		
Total (corr.)	4611,61	21			

$R^2 = 0,9647$ ;  $R^2$  (ajustado) = 0,9327.

En este caso el valor obtenido para el estadístico  $R^2$ , indicaba que una gran parte de la variabilidad en la respuesta, un 96%, era explicada por el modelo. Además, el test del fallo de ajuste (*lack of fit*) dio como resultado un valor mayor de 0,05 (**Tabla 4.11**), indicando que los resultados se ajustaban bien al modelo. El análisis de la matriz de correlación mostró que no existía ninguna correlación entre las variables y, por tanto, las estimaciones obtenidas para cada una de ellas no presentaban ningún patrón de confusión.

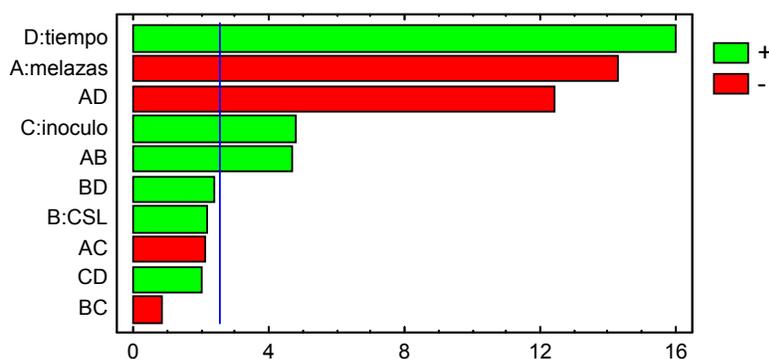
A partir de éste análisis se determinaron los coeficientes de regresión para cada factor y la ecuación que describe el modelo:

$$\text{GSH} = -34,3 + 5,73X_1 - 4,2X_2 + 1,07X_3 + 1,64X_4 + 0,75X_1X_2 - 0,29X_1X_3 - 0,29X_1X_4 - 0,14X_2X_3 + 0,07X_2X_4 + 0,05X_3X_4$$

Utilizando la función de este modelo de primer orden se calculó el máximo teórico para la respuesta que resultó ser de 52,28 mg GSH/L, para unos valores de concentración de melazas ( $X_1$ )=1,5%, concentración de CSL

( $X_2$ )=0,5%, porcentaje de inóculo ( $X_3$ )= 5% y tiempo de fermentación ( $X_4$ )=48 h.

La representación gráfica de este análisis mediante un gráfico de Pareto (**Figura 4.9**) muestra cómo las variables o sus interacciones influyen en la respuesta y, de forma proporcional, en la magnitud de dicha influencia.

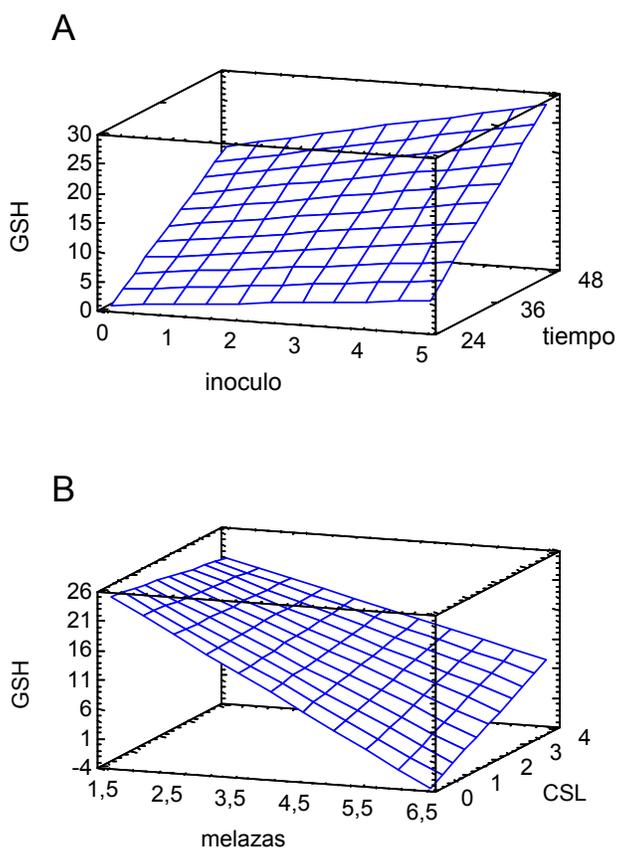


**Figura 4.9.** Gráfico de Pareto para GSH (mg/L). La línea azul indica el valor mínimo estadísticamente significativo. El tamaño de las barras es proporcional al efecto de la variable correspondiente sobre la respuesta. En verde se representa un efecto positivo y en rojo, negativo.

Por tanto, al igual que se mostró en la **Tabla 4.11**, el tiempo y el porcentaje de inóculo fueron los dos factores principales que afectaron, estadísticamente, de forma positiva a la producción de GSH. Además, la interacción de las melazas con el CSL también tuvo un efecto positivo sobre la respuesta. Por el contrario, las melazas y la interacción entre éstas y el tiempo (AD), influyeron de forma negativa sobre la respuesta.

La visualización de estos resultados mediante la representación de la superficie de respuesta ofrece una interpretación más sencilla (**Figura 4.10**). La

producción de glutation es mayor a medida que se incrementan el porcentaje de inóculo y, sobre todo, el tiempo de incubación (**Figura 4.10A**). Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de melazas, se observa un efecto negativo sobre la respuesta, mientras que un aumento de la concentración de CSL provoca un efecto positivo. La mejor respuesta se obtuvo al utilizar una baja concentración de CSL (0,5%) en combinación con una baja concentración de melazas (1,5%) (**Figura 4.10B**).



**Figura 4.10.** Gráfica de superficie de respuesta para GSH (mg/L). **A.** Efecto del inóculo frente al tiempo. **B.** Efecto de las melazas frente a CSL.

### 4.3.2 Método del ascenso más pronunciado

A partir de los resultados obtenidos con el primer diseño factorial, se decidió fijar el valor de las variables de melazas (1,5%) y de CSL (0,5%), ya que ambos, sobre todo las melazas, estaban inversamente relacionados con la producción de glutation. Con el objetivo de seguir avanzando de forma rápida hacia el óptimo, se utilizó el método del ascenso más pronunciado. Para ello, se realizaron siete pasos sobre la trayectoria trazada a partir del valor central sobre la superficie de respuesta donde se representa el efecto del inóculo frente al tiempo (**Figura 4.10A**). Se estableció un incremento ( $\Delta$ ) de 12 h para la variable tiempo ( $X_1$ ) y el valor del incremento para la variable inóculo ( $X_2$ ) se determinó a partir del valor central mediante el software Statgraphics v 5.0.

Siguiendo este diseño experimental, se cultivó la cepa M4T123 en las ocho condiciones que combinaban distintos porcentajes de inóculo y tiempos de fermentación. En la **Tabla 4.12** se muestran los valores codificados y sin codificar para ambas variables, así como los resultados obtenidos.

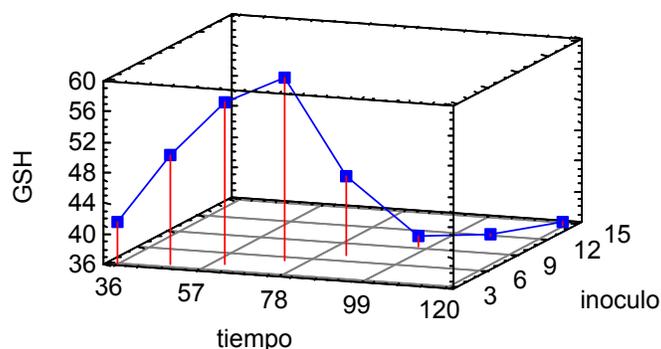
**Tabla 4.12.** Método del ascenso más pronunciado.

Pasos	Codificado		Sin codificar		Resultados	
	$X_1$	$X_2$	Tiempo (h)	Inóculo (%)	Biomasa (mg/mL)	GSH (mg/mL)
Origen	0	0	36	3	2,14	41,5
$\Delta$	12	*	12	*		
Origen + $\Delta$	12	0,6	48	3,6	2,37	50,2
Origen + 2 $\Delta$	24	0,6	60	4,3	2,7	57,1
Origen + 3 $\Delta$	36	1,2	72	5,4	2,91	59,9
Origen + 4 $\Delta$	48	1,7	84	7,2	2,99	46,3
Origen + 5 $\Delta$	60	2,3	96	9,5	3,28	37,3
Origen + 6 $\Delta$	72	2,5	108	12	3,48	36,1
Origen + 7 $\Delta$	84	2,5	120	14,5	3,54	36,5

\*Valores calculados mediante software Statgraphics v 5.0.

En todos los casos se incluyeron melazas (1,5%) y CSL (0,5%).

En los tres primeros pasos, la concentración de GSH se incrementó notablemente, hasta alcanzar un valor máximo de 59,9 mg GSH/L al utilizar 5,4% de inóculo y 72 h de incubación (**Tabla 4.12**). A partir de este punto, y como se muestra en la **Figura 4.11**, la respuesta obtenida disminuyó de forma progresiva en cada uno de los sucesivos pasos que se realizaron.



**Figura 4.11.** Trayectoria del ascenso más pronunciado para GSH.

### 4.3.3 Modelo de segundo orden

#### *Diseño central compuesto (DCC)*

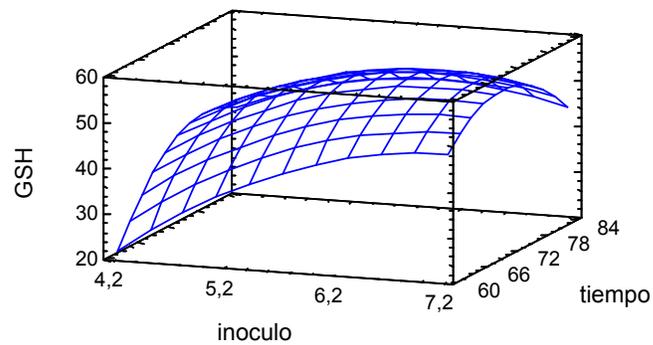
Una vez en la región del óptimo, se planteó un nuevo experimento con el fin de ajustar un modelo de segundo orden. Se utilizó un diseño central compuesto (DCC), que constaba de 12 experimentos de los cuales cuatro correspondían a un factorial  $2^2$  (% inóculo y tiempo), cuatro a los puntos centrales y cuatro a los puntos axiales. Como valor del punto central se tomaron las condiciones que permitieron alcanzar la mejor respuesta con el método del ascenso más pronunciado, es decir, 5,4% de inóculo y 72 horas de incubación. El diseño completo del DCC y las respuestas obtenidas tras la fermentación de la cepa M4T123 en las 12 condiciones establecidas se muestran en la **Tabla 4.13**.

**Tabla 4.13.** Diseño central compuesto.

Codificado	Sin codificar		Resultados			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Tiempo (h)	Inóculo (%)	Biomasa (mg/mL)	GSH (mg/mL)
<b>1</b>	-1	+1	60	7	2,61	46,8
<b>2</b>	0	0	72	5,4	2,56	53,4
<b>3</b>	0- $\alpha$	0	55	5,4	1,52	28,3
<b>4</b>	0	0	72	5,4	2,63	55,5
<b>5</b>	0	0+ $\alpha$	72	7,5	2,88	58,0
<b>6</b>	0	0- $\alpha$	72	3,7	1,74	32,7
<b>7</b>	0+ $\alpha$	0	89	5,4	2,70	45,8
<b>8</b>	-1	-1	60	4,2	1,46	24,1
<b>9</b>	0	0	72	5,4	2,36	51,2
<b>10</b>	+1	-1	84	4,2	2,07	36,4
<b>11</b>	+1	+1	84	7	2,66	39,9
<b>12</b>	0	0	72	5,4	2,37	54,9

En todos los casos se incluyeron melazas (1,5%) y CSL (0,5%).

Los resultados obtenidos mostraron que la respuesta máxima fue de 58 mg GSH/L, después de 72 h de incubación y utilizando un inóculo del 7,5%. La representación gráfica de la superficie de respuesta obtenida para estos resultados se muestra en la **Figura 4.12**.

**Figura 4.12.** Superficie de respuesta para GSH (mg/L).

El análisis de varianza para el DCC se muestra en la **Tabla 4.14**. Tanto los efectos principales, como su interacción mostraron un valor de p menor de 0,05, lo que indicaba que influían significativamente sobre la respuesta. El ajuste de los resultados al modelo fue bueno, ya que el test que determina la falta de ajuste (*Lack of fit*) fue mayor de 0,05. El modelo diseñado explicaba un 92%, ( $R^2 = 0,926$ ), de la variabilidad obtenida para la respuesta.

**Tabla 4.14.** Análisis de varianza (ANOVA) del DCC para GSH (mg/L).

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrado	F	p
A: inóculo	474,275	1	474,275	128,41	0,0015
B: tiempo	112,729	1	112,729	30,52	0,0117
AB	93,026	1	93,026	25,29	0,0152
"Lack of fit"	94,4589	3	31,4863	8,52	0,0559
Error puro	11,0803	3	3,6934		
Total (corr.)	1434,82	11			

$$R^2 = 0,926; R^2 \text{ (ajustado)} = 0,865$$

Además, el análisis de regresión permitió establecer los coeficientes de significación y la ecuación que describe el modelo de segundo orden:

$$\text{GSH} = -547,70 + 11,38 X_1 + 58,50 X_2 - 0,0654 X_1^2 - 0,29 X_1 X_2 - 2,83 X_2^2$$

Donde  $X_1$  = tiempo, y  $X_2$  = inóculo

A partir de esta función se calculó el punto estacionario, o máximo teórico, para la respuesta que resultó ser de 56 mg/L para un 6,6% de inóculo y 72 h de incubación.

Por tanto, la aplicación de la Metodología de Superficie de Respuesta a la mejora de las condiciones de cultivo de la cepa M4T123 permitió obtener de forma repetitiva una producción de 58-60 mg GSH/L después de 72 h de incubación en medio MFS lo que supone un incremento de unas 2 veces con respecto a los valores obtenidos inicialmente (30-32 mg GSH/L).

## 4.4 Obtención de cepas superproductoras de glutation mediante incremento de la dosis génica

Como se ha mencionado en la Introducción, el glutation se sintetiza mediante dos reacciones sucesivas catalizadas por las enzimas GSH1 y GSH2. La inhibición por producto final de GSH1 causada por el GSH, hace que esta primera reacción sea el paso limitante para la producción del tripéptido (Ohtake y col., 1988). El aumento en la expresión del gen *GSH1* o un incremento de su número de copias, mediante la utilización de vectores episómicos, han sido estrategias utilizadas para incrementar el contenido en GSH en *S. cerevisiae* (Yasuyuki y Seizou, 1991; Fan y col., 2004).

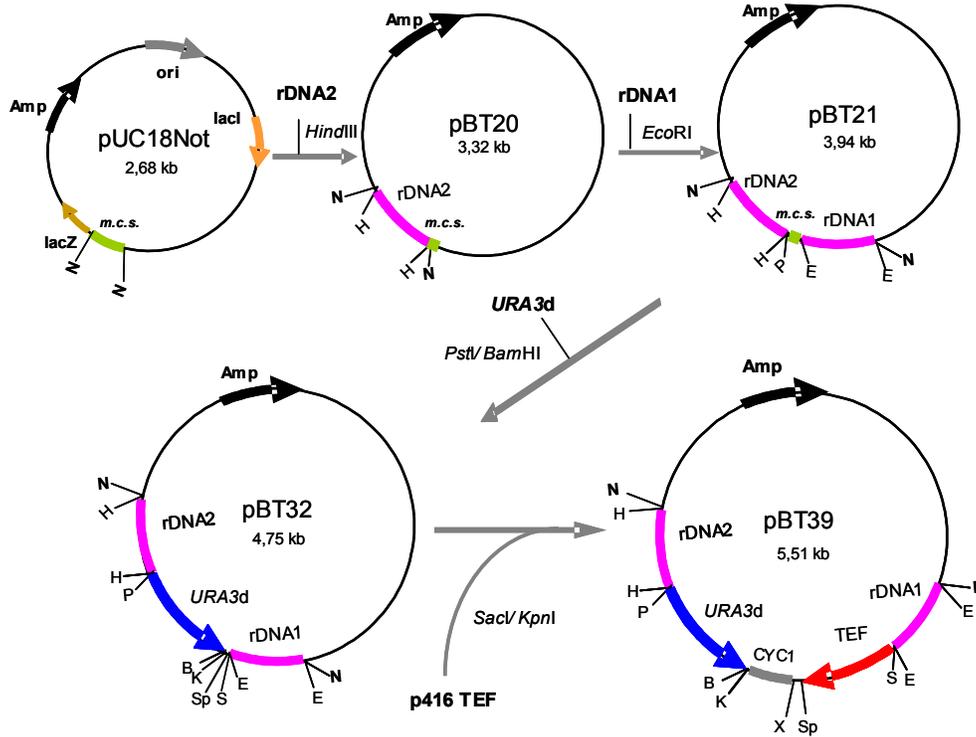
### 4.4.1 Construcción de un vector de expresión integrativo

La posible utilización en la industria alimentaria de un vector portando un casete de expresión integrativo, conlleva que, tras su recombinación, no se detecte la presencia de DNA exógeno o de marcadores de resistencia a antibióticos. Por lo tanto, el casete debe estar constituido en su totalidad por DNA de levadura.

Además, la obtención de altos niveles de expresión de una proteína implica, como normal general, que el gen de interés esté presente en un elevado número de copias (Lopes y col., 1989; Romanos y col., 1992).

Una de las estrategias para lograr ambos requisitos es dirigir la integración, por recombinación homóloga del gen diana, al *locus* del DNA ribosómico de las levaduras, constituido por una secuencia de 9 kb que se repite entre 100-120 veces (Petes, 1979; Warner, 1989).

El primer paso para realizar esta estrategia fue la construcción de un vector de expresión integrativo. En la **Figura 4.13** se muestra el proceso de construcción de dicho vector.



**Figura 4.13.** Construcción del plásmido de expresión integrativo pBT39. N: *NotI*, H: *HindIII*, E: *EcoRI*, B: *BamHI*, K: *KpnI*, X: *XhoI*, S: *SacI*, Sp: *SpeI*, P: *PstI*.

En primer lugar, utilizando los oligonucleótidos rDNA2-F y rDNA2-R y el DNA genómico de *S. cerevisiae* CECT 1328 como molde, se amplificó un fragmento del rDNA 25S que se llamó rDNA2. El fragmento de 626 pb amplificado se digirió con la enzima *HindIII* y se clonó en el plásmido pUC18Not, previamente digerido con la misma enzima. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* TOP 10F' y el plásmido resultante se denominó pBT20 (**Figura 4.13**).

El siguiente paso fue la clonación de otro fragmento del locus 25S del rDNA. Utilizando los oligonucleótidos rDNA1-F y rDNA1-R se amplificó un fragmento que se denominó rDNA1. El fragmento de 617 pb resultante se digirió

con la enzima de restricción *EcoRI* y se clonó en el plásmido pBT20 dando lugar al plásmido pBT21 (**Figura 4.13**).

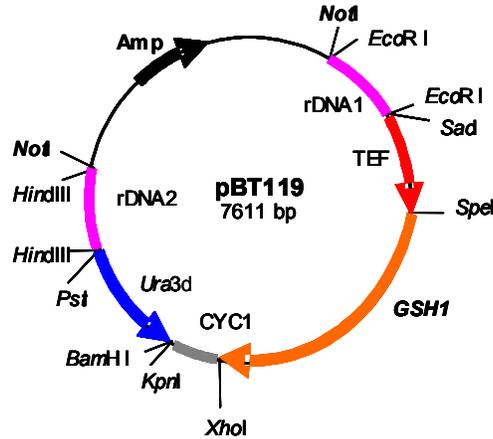
Debido a que no es posible utilizar marcadores de confieran resistencia a antibióticos, se utilizó como marcador de selección el gen *URA3* que codifica para la orotidin-5'-P-descarboxilasa y complementa la auxotrofia para el uracilo. El gen *URA3* se amplificó mediante PCR y uno de los oligonucleótidos utilizados, URA3-F, complementario del extremo 5', contenía un sitio de restricción *PstI*. De esta manera, el producto de la amplificación carecía de 16 pb en su región promotora. Este fragmento de 865 pb se clonó en el plásmido pBT21 obteniéndose el plásmido pBT32 (**Figura 4.13**). La secuencia del gen *URA3d* se comprobó mediante la secuenciación de tres clones conteniendo el plásmido pBT32.

Como promotor para la expresión del gen de interés se eligió el promotor constitutivo *TEF* (Translation elongation factor). A partir del plásmido p416TEF (Mumberg y col., 1995) se obtuvo un fragmento *SacI-KpnI* de 811 pb que incluía, además del promotor, el sitio de clonación múltiple (mcs) del plásmido pBluescript y el terminador *CYC1* de *S. cerevisiae*. Dicho fragmento se clonó en pBT32 obteniéndose, finalmente, el vector de expresión integrativo pBT39 (**Figura 4.13**).

#### 4.4.2 Clonación del gen *GSH1*

El gen *GSH1* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos GSH1-F y GSH2-R diseñados a partir de una secuencia depositada en GenBank (Nº Acceso X85021). Los extremos del fragmento de 2,09 Kb obtenido se rellenaron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I y se clonó en el plásmido pUC19, previamente digerido con la enzima *SmaI*. El plásmido resultante se denominó pBT1. La secuencia del gen *GSH1* se confirmó a partir de la secuenciación de tres clones, y posterior comparación con la secuencia original.

Por último, el gen *GSH1* se subclonó en el plásmido de expresión pBT39, dando lugar al plásmido pBT119 (**Figura 4.14**).



**Figura 4.14.** Vector de expresión integrativo pBT119.

#### 4.4.3 Transformación de *S. cerevisiae*

A partir de una preparación a gran escala, el vector pBT119 se digirió con la enzima de restricción *NotI*. De esta forma, se obtuvo un casete de expresión conteniendo el gen *GSH1* flanqueado por las secuencias homólogas al locus rDNA 25S, eliminando el DNA bacteriano y el marcador de resistencia a ampicilina presentes en el plásmido (**Figura 4.14**).

A continuación se transformaron células competentes de la cepa *S. cerevisiae* CECT 1645 (*ura3-A*, *trp1*, *leu2-3*, *leu2-112*) con, aproximadamente, 10 µg del fragmento *NotI* obtenido a partir del plásmido pBT119. Las células se sembraron en medio mínimo suplementado con triptófano y leucina, obteniéndose un total de 50 transformantes.

#### 4.4.4 Análisis de la concentración de glutathion

Se realizaron cultivos de los 50 transformantes obtenidos de la cepa CECT 1645 y de la cepa utilizada como control (CECT 1645 transformada con pBT39, que no porta *GSH1*) en los que se analizó la producción de biomasa y GSH.

En una primera ronda de análisis se descartaron 44 transformantes que mostraron un contenido en GSH menor que la cepa control. Las seis cepas restantes se sometieron a un segundo análisis que confirmó que todas presentaban una producción específica de GSH entre un 6% (TBT3) y un 32% (TBT6) mayor que la cepa control (**Tabla 4.15**).

**Tabla 4.15.** Producción de GSH en los transformantes seleccionados.

Cepa	[GSH] μM	Biomasa (mg/mL)	[GSH] (mg/g)	[GSH] (mg/L)
<b>CECT 1645</b>	125,89 ± 0,4	2,35 ± 0,090	4,94	11,90
<b>Control*</b>	197,29 ± 0,85	4,63 ± 0,020	3,95	18,28
<b>TBT1</b>	311,36 ± 1,78	4,71 ± 0,030	6,09	28,70
<b>TBT3</b>	235,33 ± 5,66	5,18 ± 0,060	4,19	21,70
<b>TBT5</b>	303,59 ± 4,27	4,82 ± 0,070	5,81	27,99
<b>TBT6</b>	208,22 ± 3,82	2,43 ± 0,005	7,88	19,20
<b>TBT13</b>	334,10 ± 2,89	5,05 ± 0,030	6,10	<b>30,80</b>
<b>TBT25</b>	207,60 ± 1,41	4,74 ± 0,030	4,04	19,13

\* CECT 1645 transformada con el plásmido pBT39.

Media de dos experimentos analizados por HPLC (por duplicado).

La integración del gen *URA3* tuvo un efecto positivo sobre la producción de biomasa, ya que tanto el control como cinco de las cepas mostraron unos valores que duplicaban al obtenido con la cepa parental sin transformar (**Tabla 4.15**). Sólo la cepa TBT6 presentó un crecimiento menor que el resto de las cepas, siendo la cantidad de biomasa similar a la obtenida con la cepa de colección.

El efecto combinado de la mayor producción específica y la mayor producción de biomasa permitió incrementar la producción volumétrica de GSH (mg/L) de entre un 5% (TBT6) y un 68% (TBT13).

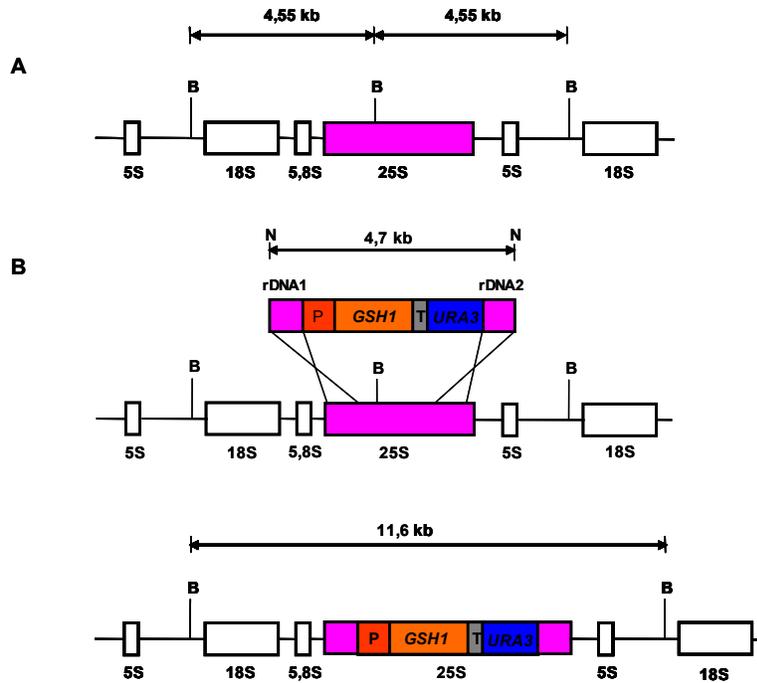
#### 4.4.5 Análisis molecular de las cepas seleccionadas

Las seis cepas transformantes seleccionadas se analizaron mediante hibridación para confirmar la integración del casete en el genoma. Para ello, el DNA genómico de cada cepa se digirió con *Bg/II* y se hibridó utilizando como sondas los distintos elementos del casete integrado.

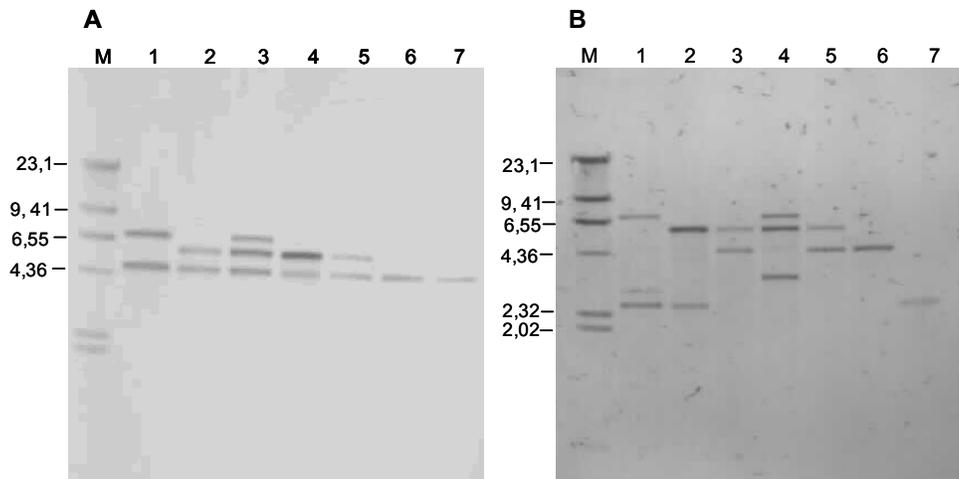
Debido a que cada unidad de rDNA de *S. cerevisiae* tiene tres dianas *Bg/II* (**Figura 4.15A**) la integración del casete de expresión mediante doble recombinación homóloga, conllevaría la pérdida de la diana *Bg/II* localizada en el locus rDNA 25S. De esta forma, al digerir el DNA genómico de los transformantes, en aquellos en los que se hubiese producido dicha integración, se obtendría un fragmento de aproximadamente, 11,6 kb (**Figura 4.15B**).

La hibridación de las muestras de DNA utilizando como sonda el gen *GSH1* de la cepa control mostró, en todos los casos, una banda de unas 4,5 kb perteneciente a la copia endógena del gen (**Figura 4.16A**). Además, en cuatro cepas (TBT3, TBT5, TBT6 y TBT13) se observó la presencia de una banda de 5,5 kb y en otras dos (TBT1 y TBT3) una banda de unas 7 kb, que no se correspondían con el patrón esperado. De hecho, en ningún caso se obtuvo la banda teóricamente prevista de 11,6 kb, lo que parecía indicar que durante el proceso de integración del casete de expresión se habían producido recombinaciones inespecíficas.

Con el objetivo de intentar determinar qué elementos podían estar implicados en estas recombinaciones, se realizaron hibridaciones utilizando como sonda el fragmento rDNA1. Los resultados obtenidos fueron idénticos que los logrados al utilizar como sonda el gen *GSH1*.



**Figura 4.15.A.** Organización genética de una unidad de rDNA en *S. cerevisiae*. **B.** Predicción de la integración del casete de expresión por recombinación homóloga. B, *Bgl*II; N, *Not*I; P, promotor; T, terminador.



**Figura 4.16.** Hibridación de los transformantes 1. TBT1; 2.TBT3; 3.TBT5; 4.TBT6; 5.TBT13; 6. TBT25; 7. *S. cerevisiae* CECT1645 (control sin transformar); M:  $\lambda$  *Hind*III. **A.** Sonda *GSH1*-DIG. **B.** Sonda *URA3*-DIG.

La hibridación utilizando como sonda el gen *URA3*, reveló en la cepa control una banda de unas 2,5 kb correspondiente a la copia endógena presente en el genoma (**Figura 4.16B**). Sólo en el caso de los transformantes TBT1 y TBT3, estaba presente esta banda. En todas las cepas, incluidas las dos anteriores, se observaron bandas de entre 3,5 kb y 7 kb. Las bandas de 4,5 kb, 5,5 kb y 7 kb coincidían con las obtenidas en la hibridación con *GSH1*, mientras que en la cepa TBT6, apareció una nueva banda de 3,5 kb. Ninguna de las cepas mostró el patrón de fragmentos de hibridación esperado teóricamente.

#### 4.4.5 Estabilidad mitótica

Para determinar si la existencia de recombinaciones inespecíficas podía plantear problemas de estabilidad del casete de expresión integrado o de partes del mismo, se incubaron las cepas en medio no selectivo (YPD) durante, aproximadamente, 75 generaciones.

En la **Tabla 4.16** se muestran los resultados obtenidos para las distintas cepas después de analizar la presencia del marcador que complementa la auxotrofia para el uracilo (*URA3*).

**Tabla 4.16.** Estabilidad mitótica.

Cepa	P <sub>1</sub>	g	P <sub>2</sub>	m*
<b>TBT1</b>	99,13	77	98,24	0,0117
<b>TBT3</b>	99,51	76	99	0,0067
<b>TBT5</b>	98,97	80	93,52	0,0707
<b>TBT6</b>	99,03	77	98,34	0,0090
<b>TBT13</b>	98,83	77	97,3	0,0202
<b>TBT25</b>	98,15	78	97,1	0,0137

P<sub>1</sub>= % células que presentan plásmido a tiempo cero.

P<sub>2</sub>= % células que presentan plásmido después de g generaciones.

g= generaciones transcurridas.

$$* m = \text{tasa de segregación}; m = 1 - e^{-\frac{\ln(P_2/P_1)}{g}} \times 100$$

La réplica de las colonias crecidas en medio no selectivo sobre medio mínimo permitió obtener, aproximadamente, el mismo número de colonias viables. El cálculo de la tasa de segregación a partir de estos resultados confirmó, por tanto, la alta estabilidad del marcador *URA3*, o fragmentos del casete portando este gen, integrados en el genoma de estas cepas.

Además, el análisis de la concentración de GSH de las cepas crecidas durante 75 generaciones, permitió obtener valores muy similares a los obtenidos a partir de los cultivos crecidos durante las primeras generaciones (g=6-8) en el medio no selectivo.



## **5. Discusión**

## 5.1 Glutation: importancia biológica y usos

El GSH es el tiol no proteico más abundante en todos los organismos y predominantemente, en células eucariotas (Meister y Anderson, 1983; Meister 1988; Penninckx y Elskens, 1993; Sies 1999). El GSH cumple con varias funciones en la célula, está involucrado en el control del estrés por su papel como antioxidante (Grant y col., 1996), en la detoxificación de xenobióticos (Fang y col., 2002; Pastore y col., 2003) y en el caso de plantas y algunas levaduras, participa en la inactivación de metales pesados tóxicos (Mendoza-Cózatl y col., 2005). La deficiencia de GSH en humanos está relacionada con diversas enfermedades como la cirrosis hepática, enfermedades pulmonares, cataratas, infecciones por VIH, enfermedades neurodegenerativas y con el envejecimiento (Anderson, 1998; Townsed y col., 2003; Wu y col., 2004). Estudios muestran que la ingesta de GSH disminuye la absorción de peróxidos lipídicos (Kowalski y col., 1990). Además, el consumo de glutatión se ha asociado con la protección contra algunos tipos de cáncer, como el cáncer de boca y de faringe (Trickler y col., 1993; Flagg y col., 1994).

El glutatión se incorpora en la dieta mediante el consumo de frutas y verduras (Jones y col., 1995), absorbiéndose intacto a través del intestino delgado (Hagen y col., 1990; Vincenzini y col., 1992). La ingesta por vía oral de suplementos de GSH en forma de mono y diésteres (Levy y col. 1993; Anderson y col., 1994) también se utiliza para incrementar la concentración del tripéptido en sangre y tejidos, tanto en ratas (Hagen y col, 1990) como en humanos (Hagen y Jones, 1989). El GSH está presente en diversos compuestos farmacéuticos, que se administran, por vía oral, intravenosa o intramuscular, para el tratamiento en la formación de trombos (Molloy y col., 1998), reduciendo los efectos secundarios e incrementando la eficacia de drogas quimioterapéuticas (Smyth y col., 1997).

Debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, la producción de GSH a nivel industrial tiene un elevado interés comercial, utilizándose en compuestos farmacéuticos, como aditivo en la industria cosmética en la composición de cremas faciales (Nakajima y Fukuda, 1997; Shinmoto y col.,

2002) y en la industria alimentaria, como aditivo en productos para alimentación infantil (Tamura y col., 2003; Yamauchi y col., 2003) y para la conservación de alimentos, entre otros (Troller, 1966).

## **5.2 Obtención de cepas superproductoras de glutatión**

La obtención de metabolitos de interés se realiza preferentemente a partir de microorganismos en vez de utilizar plantas, células animales, o la síntesis química. La gran variedad de reacciones que son capaces de llevar a cabo, la facilidad de adaptarse a distintos ambientes, ser capaces de crecer en medios de cultivos baratos, su fácil manipulación genética y la simplicidad de procesos de selección, que permiten analizar miles de posibles candidatos en poco tiempo, son algunas de las ventajas por las que se utilizan (Adrio y Demain, 2005). Sin embargo, no todos los microorganismos tienen un interés industrial, y sólo aquellos capaces de producir específicamente determinados metabolitos, con gran rendimiento, son seleccionados para tal fin.

Con el fin de lograr esa elevada especialización, los procesos industriales utilizan cepas mutantes para la producción de enzimas, aminoácidos, antibióticos y numerosos metabolitos de interés comercial (Vincy y Byng, 1999; Parekh y col., 2000; Adrio y Demain, 2006). De todos los mutágenos utilizados, la nitrosoguanidina (NTG) es, probablemente, el agente mutagénico más eficaz y por ello ha sido utilizado en numerosos trabajos, tanto en bacterias (Cerdá-Olmedo y Ruíz-Vázquez, 1979; Balz, 1986), como en diferentes especies de levaduras (Kistler y col., 1986; Sakai y col., 1991).

Debido a su uso como modelo en el análisis de los mecanismos involucrados en la respuesta a estrés oxidativo, a su fácil manipulación, a la disponibilidad de la secuencia de su genoma y a su elevado contenido intracelular de glutatión, la levadura *S. cerevisiae* es la fuente microbiana de elección a la hora de realizar estudios relacionados con este tripéptido, incluida su posible producción a escala industrial.

Aunque las funciones fisiológicas del GSH en *S. cerevisiae* han sido descritas y estudiadas de manera extensa (Carmel-Harel y Storz, 2000; Penninckx, 2000; Penninckx, 2002), son muy escasos los estudios o referencias bibliográficas sobre la producción biotecnológica de este tripéptido a partir de esta levadura, siendo la mayoría, ejemplos descritos en patentes japonesas (Li y col. 2004).

La exposición de células de levaduras frente a peróxidos y a metales pesados como el cadmio, inducen estrés oxidativo (Collinson y Dawes, 1992; Brennan y Schiestl, 1996), lo que provoca un aumento en la expresión del gen *GSH1* (Stephen y col., 1995; Stephen y Jamieson, 1997) que conlleva a un incremento en los niveles de GSH en las células.

Debido a que *S. cerevisiae* responde al estrés originado por peróxidos de distinta manera que al causado por exposición al cadmio (Lee y col., 1999), se diseñó una estrategia basada en la selección de células previamente mutadas en presencia de estos compuestos con el fin de incrementar la posibilidad de obtener una cepa capaz de producir elevadas concentraciones de tripéptido.

Como cepa inicial se utilizó *S. cerevisiae* CECT 1328, ya que al ser una cepa diploide, permite, por una parte, minimizar el efecto que mutaciones secundarias tendrían en una cepa haploide y, por otra, las cepas diploides de esta levadura son más estables que las haploides desde el punto de vista genético (Hicks y Herskowitz, 1976).

Las dos primeras rondas de selección se realizaron en presencia de peróxidos ( $H_2O_2$  y TBOOH), obteniéndose la cepa MT32 cuyo contenido en glutathion había aumentado 1,6 veces con respecto a la cepa de colección. La presencia de  $Cd^{2+}$  en las placas de selección de la tercera ronda, permitió aislar la cepa MTC45. En esta cepa, se observó el incremento de la concentración específica del tripéptido más importante, un 50% superior al de su cepa parental, MT32. Quizás, este aumento tan grande se debió a la, ya mencionada, diferente respuesta celular ante este metal pesado. La exposición al cadmio causa estrés oxidativo en la célula mediante peroxidación lipídica, desplazando los iones  $Fe^{2+}$  de las proteínas, permitiendo así, que dicho metal se encuentre

libre para participar en las reacciones de Fenton, provocando un aumento del radical libre OH<sup>-</sup> (Vido y col., 2001). Además, el cadmio reacciona con los grupos tioles y carboxilos, favoreciendo la proteólisis (Mendoza-Cózatl y col., 2005).

De hecho, la utilización de TBOOH en esta ronda, no permitió lograr ninguna mejora, probablemente debido a que *S. cerevisiae*, activa la misma respuesta frente al estrés causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o por TBOOH (Thorpe y col., 2004).

La cuarta y última ronda de mutación se seleccionó en presencia de TBOOH. La cepa obtenida, M4T123, fue capaz de producir casi cuatro veces más glutatión (un 1,7% de su peso seco) que la cepa parental CECT1328 (0,4% de su peso seco) y cinco veces más en cuanto a la concentración final (**Tabla 4.4**). Este incremento es similar al señalado por otros autores (Li y col., 2004). Sin embargo, hay que tener en cuenta que todos esos resultados están incluidos en patentes japonesas, lo que hace difícil su comparación.

### 5.3 Análisis de expresión génica

La investigación a nivel molecular está viviendo un cambio espectacular en los últimos años pasando de trabajos basados en el estudio individual, o de unos pocos genes, al análisis de los genomas en su totalidad. Gracias a los avances tecnológicos, la secuenciación del genoma de diferentes microorganismos es cada vez más frecuente. Asociada a esta explosión de datos y conocimientos han aparecido nuevas tecnologías que, soportadas en la bioinformática, permiten analizar todos estos resultados de forma global.

La tecnología más conocida y, probablemente, la que está generando más datos en estos momentos es la técnica de hibridación mediante microarrays (Doménech-Sánchez y Vila, 2004). La tecnología de microarrays ha permitido cuantificar la expresión de todo el genoma de *S. cerevisiae* (Wodicka y col., 1997), ofreciendo la posibilidad de caracterizar diferencias en el nivel de transcripción entre diferentes cepas y/o entre la misma cepa en distintas condiciones de cultivo (Ter Linde y col., 1999; Kuhn y col., 2001; Momose e

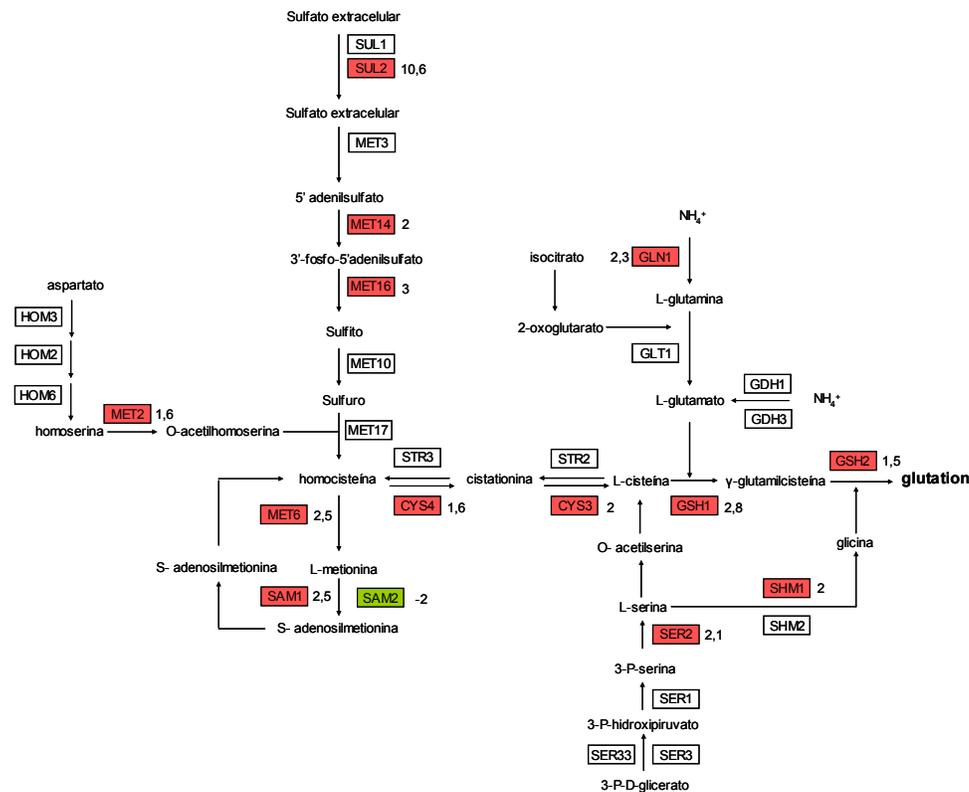
Iwahashi, 2001; Walhbom y col., 2003; Boer y col., 2003; Shima y col., 2005; Zuzuarregui y col., 2006).

La regulación de la respuesta adaptativa al estrés generado por oxidantes y metales pesados en *S. cerevisiae* ocurre mayoritariamente a nivel transcripcional (Jamieson, 2002; Folch-Mallol y col., 2004). Por ello, con objeto de estudiar los cambios generados a lo largo de las rondas de mutación en la cepa M4T123, se analizaron los cambios en la expresión génica mediante la tecnología de microarrays. Además, debido a que la composición del medio de fermentación puede afectar a la producción de determinados metabolitos (Kennedy y Krouse, 1999), y debido al comportamiento relativamente diferente de la cepa mutante en los dos medios de cultivo utilizados, se realizó un análisis del nivel de transcripción en ambas condiciones.

Los resultados obtenidos en medio YPD mostraron que en la cepa mutante había unos 750 genes cuya expresión génica variaba más de 1,5 veces con respecto a la cepa silvestre. Un grupo de genes cuyo nivel de expresión había aumentado eran aquellos relacionados con la biosíntesis de aminoácidos azufrados (*CYS3*, *CYS4*, *SUL2*, *MET14*, *MET16*, *MET2* y *MET6*) (**Figura 5.1**). Estudios basados en genómica y proteómica han demostrado que, en respuesta a la exposición al cadmio, existe un incremento de la expresión de algunos de los genes presentes en esta ruta produciendo un aumento de la síntesis de GSH (Vido y col., 2001; Momose e Iwahashi, 2001; Lafaye y col., 2005).

Bajo condiciones normales, el azufre, en forma de sulfato, es asimilado por *S. cerevisiae* a través de la ruta de transulfuración, en forma de metionina, cisteína y glutatión (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Sin embargo, en presencia de cadmio, la célula reprograma su metabolismo, reduciendo la cantidad de metionina y cisteína sintetizados, en favor de la síntesis de glutatión (Fauchon y col., 2002). Este hecho podría afectar negativamente a la síntesis de proteínas conteniendo estos aminoácidos azufrados, pero sin embargo, el análisis de las 54 proteínas más expresadas, reveló que las células se reprograman y reprimen la síntesis de algunas proteínas ricas en azufre, reemplazándolas por otras

isoformas con bajo contenido en el mismo (**Figura 5.2**) (Fauchon y col., 2002).

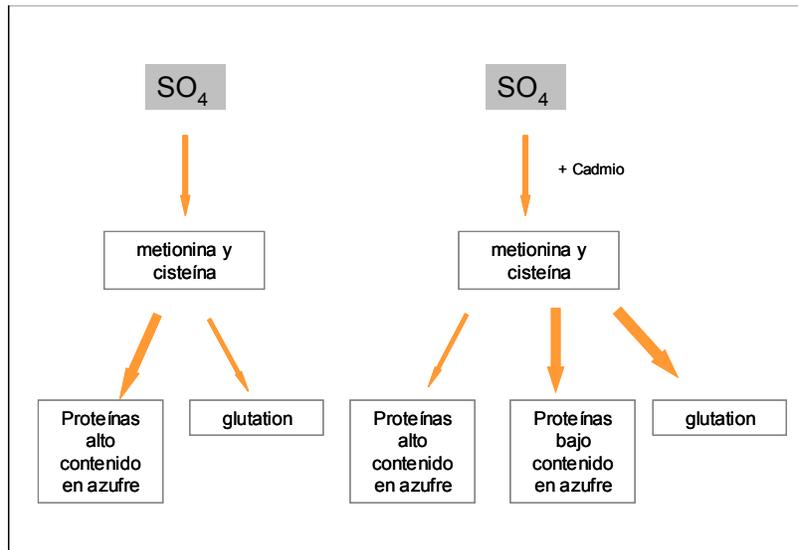


**Figura 5.1.** Cambio de expresión (ratio cepas M4T123/ CECT 1328) en medio YPD. Se representan los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos azufrados y de GSH. Los genes que mostraron un incremento ( $\geq 1,5$  veces) se indican en color rojo, los genes que presentaron un decrecimiento ( $\geq 1,5$  veces) se muestran en color verde.

Este "ahorro" de azufre, sin embargo, no se induce al agotar las reservas de este elemento, si no que parece ser específico para aquellas condiciones medioambientales, como por ejemplo, la exposición al cadmio, que requieren un elevado nivel de glutatión. De hecho, este tripéptido actúa como fuente de azufre en condiciones de limitación o agotamiento de éste (Elskens y col., 1991).

Los genes *SAM1* y *SAM2* codifican para dos formas distintas de S-adenosilmetionina sintetasa en *S. cerevisiae* (Thomas y col., 1988), ambos genes están regulados transcripcionalmente por exceso de metionina en el medio de cultivo de forma opuesta. La regulación de *SAM1* es similar a la de los genes *MET2* o *MET6* implicados en la biosíntesis de metionina, lo que coincide con los resultados obtenidos, ya que mostró un incremento de expresión en la cepa mutante al igual que los dos genes citados (**Figura 5.1**).

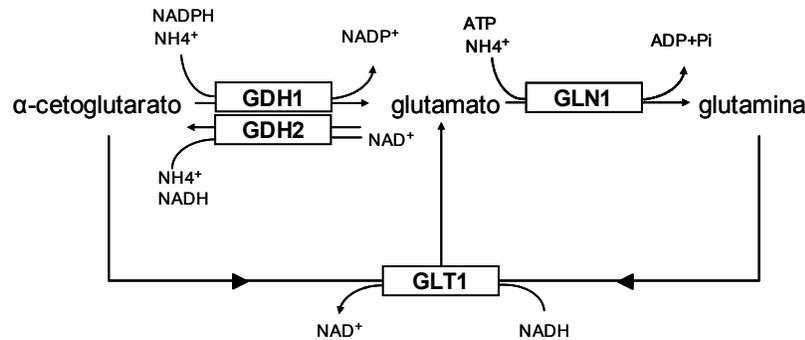
Como cabría esperar, en base a la mayor producción del tripéptido producido por la cepa mutante en este medio (**Figura 4.2**), se observó también un aumento en la expresión de los dos genes directamente relacionados con la biosíntesis de glutatión, *GSH1* y *GSH2* (**Figura 5.1**).



**Figura 5.2.** Cambios del metabolismo celular en *S. cerevisiae* por exposición al cadmio (Jamieson, 2002).

La expresión de algunos genes presentes en las rutas de biosíntesis de los otros dos aminoácidos precursores del GSH (L-glutamato y glicina) también mostraron cambios en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre. En

presencia de altos niveles de amonio en el medio, *S. cerevisiae* incorpora nitrógeno a partir de la síntesis de glutamato realizada por la enzima GDH1 (glutamato deshidrogenasa) y mediante la reacción entre el amonio y  $\alpha$ -cetoglutarato (Bertram y col., 2000; Magasanik y Kaiser, 2002). Posteriormente, el glutamato sintetizado reacciona con amonio dando lugar a glutamina, reacción catalizada por la enzima GLN1 (glutamina sintetasa) (**Figura 5.3**). La glutamina es el mayor donador de aminas en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y varios aminoácidos. Como se muestra en la **Figura 5.1**, en la cepa mutante en medio YPD, no se observó ningún cambio en la expresión de *GDH1*, mientras que se observó un aumento de expresión de *GLN1*.



**Figura 5.3.** Síntesis de glutamato y glutamina en *S. cerevisiae* (Ter Schure y col., 2000).

Sin embargo, en los resultados obtenidos a partir de células crecidas en medio MFS, se observó que sólo *CYS3* aumentaba su expresión en la cepa mutante, mientras que el resto de genes (*SUL1*, *SUL2*, *MET2*, *MET3* y *MET6*) mostraron un nivel de expresión menor con respecto a la cepa CECT1328. Además, como se muestra en la **Figura 5.4**, no se observó cambio significativo (mayor de 1,5 veces) en la transcripción de los genes *CYS4*, *GSH1* y *GSH2* con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, el análisis por RT-PCR sí puso de manifiesto la sobreexpresión de estos tres últimos genes, en especial *GSH1*



Cuando la disponibilidad de amonio en el medio es baja, la reacción catalizada por GDH1 no es eficiente y la GLN1 se convierte en la única reacción para asimilar amonio, debido a la mayor afinidad de GLN1 por este compuesto (**Figura 5.3**) (Ter Schure y col., 2000). Debido a que la reacción catalizada por GLN1 consume glutamato, existe un mecanismo alternativo para la obtención del mismo que está regulado por la GLT1 (glutamato sintasa) a través de la aminación del  $\alpha$ -cetoglutarato (Magasanik y Kaiser, 2002).

Como era previsible, los resultados obtenidos en medio MFS, mostraron un incremento en la expresión de GLN1 y *GLT1* (**Figura 5.4**) debido a la baja concentración de nitrógeno en este medio de cultivo. Además, la enzima GDH3 (glutamato deshidrogenasa 3) que constituye una vía alternativa para la síntesis de glutamato, mostró una fuerte represión como resultado de la regulación negativa que ejerce GLT1 sobre la misma (Avendaño y col., 1997).

Como se ha mencionado a lo largo de la memoria, en *S. cerevisiae* los factores de transcripción YAP1 y SKN7 regulan la respuesta adaptativa al estrés oxidativo (Morgan y col., 1997; Toone y Jones, 1999). El análisis de los resultados de la cepa mutante crecida en medio YPD reveló que, sólo SKN7 mostraba cambios en su nivel de expresión (**Tabla 4.5**).

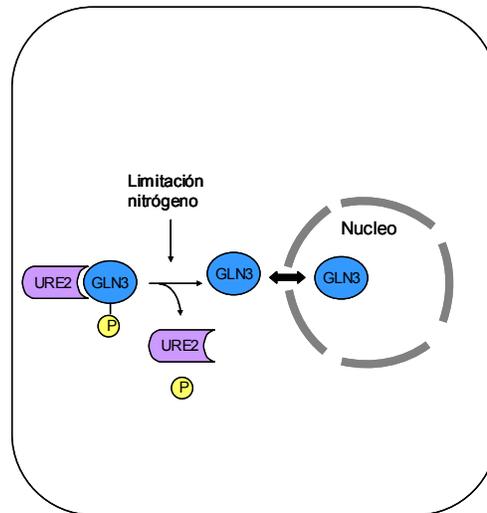
Además de YAP1, la inducción de la expresión de *GSH1* debido a la exposición de células de *S. cerevisiae* a cadmio esta regulada por la presencia de metionina en el medio, y esta regulación depende de las proteínas MET4, CBF1, MET31 y MET32 (Dormer y col., 2000; Fauchon y col., 2002; Wheeler y col., 2003; Lafaye y col., 2005). Los resultados obtenidos en medio MFS, mostraron cambios en el perfil de expresión de estos reguladores. Así, SKN7 no presentó variación a diferencia de lo observado en YPD. Sin embargo MET4, el principal regulador de la vía de los aminoácidos azufrados, y MET28 mostraron un nivel de expresión más bajo en la cepa mutante. Por el contrario, el gen MET32, cuyo producto también interviene en la regulación de esta ruta de asimilación del azufre, presentó una expresión más alta.

En ambos medios de cultivo se observó un altísimo nivel de expresión del gen *FLR1* en la cepa mutante. Este gen está regulado por YAP1 y codifica para una proteína de membrana que pertenece a la familia de permeasas multidrogas (Alarco y col., 1997; Nelissen y col., 1997; Tenreiro y col., 2001). Estudios sobre esta proteína han demostrado que una sobreexpresión de la misma confiere resistencia a ciertos oxidantes y modula la respuesta celular frente al estrés oxidativo (Nguyen y col., 2001). Otro gen regulado por YAP1 y con un elevado nivel de expresión en la cepa M4T123, en ambos medios de cultivo, fue *YCF1*. YCF1 es un transportador que confiere resistencia al cadmio y a compuestos tóxicos transportándolos al interior de la vacuola en forma de complejos o conjugados con glutatión (Li y col., 1996; Mendoza-Cózatl y col., 2005). El mayor nivel de expresión de ambos genes podría mediar en la capacidad de la cepa mutante para crecer tanto en presencia de las elevadas concentraciones de peróxidos o de cadmio utilizadas durante la selección como en el medio MFS.

Las levaduras poseen un sofisticado sistema transcripcional que regula la expresión de genes responsables del transporte y degradación de compuestos nitrogenados en respuesta a distintas fuentes de nitrógeno (Bertram y col., 2000). La represión catabólica por nitrógeno es el mecanismo diseñado para asimilar nitrógeno en ausencia de una fuente que suministre este elemento, aumentando la expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis de glutamato, glutamina y de las permeasas responsables de la captación de aminoácidos para su uso como fuente de nitrógeno (Magasanik y Kaiser, 2002).

El análisis de las muestras procedentes del medio MFS mostró una mayor expresión, en la cepa M4T123, de los genes implicados en la regulación catabólica por nitrógeno (**Tabla 4.6**) coincidiendo con los resultados obtenidos al crecer *S. cerevisiae* en medios con limitación de nitrógeno (Boer y col., 2003; Tai y col., 2005). Los genes que codifican para los transportadores de amonio *MEP1*, *MEP2* y *MEP3*, los implicados en la degradación de urea *DUR1,2*, *DUR3* y del catabolismo de la alantoína *DAL5*, están regulados por GLN3. Esta proteína, en presencia de una fuente de nitrógeno, se encuentra inhibida por otro regulador, URE2 (**Figura 5.5**). En condiciones de limitación de nitrógeno, GLN3

se libera de URE2 mediante defosforilación, dirigiéndose al núcleo y activando la transcripción de los genes implicados en la represión catabólica por nitrógeno (Cooper 2002; Magasanik y Kaiser, 2002). En nuestros resultados, el gen *URE2*, presenta un nivel de expresión reducido en la cepa mutante respecto de la cepa silvestre en el medio MFS (**Tabla 4.6**) facilitando, por tanto, la expresión de los genes regulados por GLN3.



**Figura 5.5.** Represión catabólica por nitrógeno.

Los genes *GAP1* (permeasa general de aminoácidos) y *PRT2* (transportador de péptidos) también están regulados por GLN3 (Marzluf, 1997; Stanbrough y Magasanik, 1995; Magasanik y Kaiser, 2002; Cai y col., 2006) y codifican para una proteína transportadora de todo tipo de aminoácidos, así como de di/tripéptidos, respectivamente. El mayor nivel de expresión de ambos genes (**Tabla 4.6**), además de los implicados en la regulación por limitación de nitrógeno en el medio MFS, podría contribuir al mayor crecimiento de la cepa M4T123 con respecto a la cepa CECT 1328, en la que no se observó un alto nivel de expresión de estos genes (**Figura 4.3A**).

La carencia de nitrógeno provoca un desplazamiento del GSH desde el citoplasma hacia la vacuola central, donde se acumula. De esa manera, se consigue un aumento en la concentración de GSH, ya que dicho desplazamiento consigue eliminar la inhibición de la actividad GSH1 por GSH, provocando la síntesis del mismo (Mehdi y Penninckx, 1997). Debido a la falta de nitrógeno, el GSH almacenado en la vacuola central es hidrolizado por la proteína  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ -GT) y la cisteinilglicina dipeptidasa, liberándose los tres aminoácidos constituyentes (Elkens y col., 1991; Garril, 1994; Mehdi y Penninckx, 1997). En los resultados obtenidos en los microarrays en medio MFS se observó en la cepa mutante un aumento en la expresión de *CIS2*, que codifica para  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ -GT). Este podría ser otro de los motivos que justificaría, por qué la cepa M4T123 crece mejor que la cepa CECT 1328 en este medio.

Las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*ZWF1*), transcetolasa (*TKL1*) y ribulosa-5-fosfato epimerasa (*RPE1*) son cruciales para la producción de poder reductor celular en la forma de NADPH (Folch-Mallol y col., 2004). Este poder reductor es utilizado por la enzima glutathion reductasa y la tiorredoxina reductasa para reducir el glutathion y la tiorredoxina oxidada (Costa y Moradas-Ferreira, 2001). Los genes *ZWF1* y *RPE1*, presentaron un mayor nivel de expresión en la cepa mutante en medio MFS (**Tabla 4.6**) coincidiendo con resultados obtenidos por otros autores en respuesta a la exposición a sales de cadmio y  $H_2O_2$  (Godon y col., 1998; Momose e Iwahashi, 2001).

Algunos de los genes cuyos productos son las enzimas implicadas en los mecanismos de defensa antioxidantes, también vieron modificados sus perfiles de expresión en función del medio de cultivo. En el medio YPD sólo se observó un cambio significativo de expresión de tres genes (**Tabla 4.5**). Sólo *GPX2* (glutathion peroxidasa) mostró un incremento de expresión aunque esta enzima se induce fundamentalmente por agotamiento de la glucosa (Ioue y col., 1999) y sin embargo, no se detectó un aumento de su expresión en medio MFS, donde la concentración de glucosa era menor. Los otros dos genes, *GRX1* (glutathion reductasa) y *GTT1* (glutathion s-transferasa) presentaron mayores niveles de

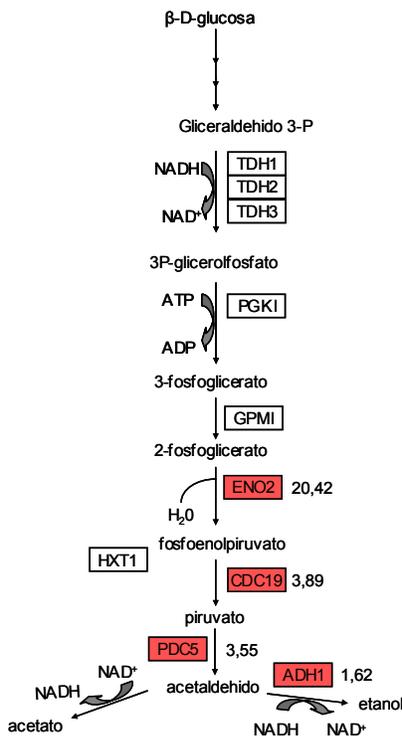
expresión en la cepa silvestre (ratios negativos). En el caso de *GTT1*, los resultados son coherentes ya que esta enzima se induce durante cambio diauxico y a lo largo de la fase estacionaria.

En el medio MFS se observó un comportamiento similar para *GTT1*, mientras que *GTT2*, que codifica para otra glutathion transferasa asociada a la membrana del retículo endoplasmático, alcanzó un nivel de expresión muy alto (**Tabla 4.6**). Esta enzima protege a las células frente al estrés oxidativo generado por metales pesados y por peróxidos (Inoue y col., 1999; Momose e Iwahashi, 2001; Fauchon y col., 2002). Los otros tres genes que mostraron cambios significativos están implicados en el mantenimiento del estado redox de las proteínas. Dos de los productos, GRX5 y TTR1 (GRX2), son dos glutarredoxinas pertenecientes a dos subfamilias diferentes (Rodríguez-Manzaneque y col., 1999). El tercer gen con un nivel de expresión más elevado fue *TRX2*, que codifica una de las isoenzimas del sistema de la tiorredoxina, y protege a las células tanto frente al estrés oxidativo como reductor, siendo requerida para el transporte entre el retículo endoplasmático y el golgi y el mantenimiento de la vacuola central.

En condiciones aeróbicas, si la concentración de glucosa sobrepasa un valor límite crítico (superior a 0,16 g/L), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede fermentar la glucosa a etanol (Van Dijken y Scheffers, 1986), lo que se conoce como *efecto Crabtree* (Verduyn y col., 1984). Cuando *S. cerevisiae* crece en un medio rico, como en el caso del medio YPD, consume la glucosa como fuente de carbono formándose etanol como subproducto. Al final de la fase fermentativa se produce un cese del crecimiento, en el cual, el cambio en la expresión génica permite a las células crecer de modo respiratorio (*cambio diáuxico*), utilizando el etanol acumulado en la fase anterior como fuente de carbono (Lillie y Pringle, 1980; Werner-Washburne y col., 1993; Folch-Mallol y col., 2004). Tanto la cepa CECT1328 como la cepa M4T123 produjeron más etanol en medio YPD que en medio MFS debido a la mayor concentración de glucosa en el primer medio (**Figura 4.8**).

A partir de las 12 h de incubación, en medio YPD, en la cepa CECT 1328, comenzó a disminuir la concentración de etanol a lo largo del tiempo, posiblemente, debido a su utilización como fuente de carbono (**Figura 4.8A**). Sin embargo, la cepa M4T123 mantuvo un valor constante de etanol a lo largo del tiempo. Por el contrario, en el medio MFS, la cepa silvestre apenas produjo etanol, mientras que la cepa M4T123 mostró el mismo perfil de producción que en medio YPD (**Figura 4.8B**).

Los experimentos realizados tanto con microarrays como de RT-PCR ofrecieron resultados que permiten explicar las diferencias en la producción de etanol observada en ambas cepas en los dos medios de cultivo (**Figura 5.6**).



**Figura 5.6.** Análisis (RT-PCR) en medio MFS de los genes implicados en la fermentación alcohólica. Los genes que mostraron un incremento ( $\geq 1,5$  veces) de su expresión, como (ratio M4T123/CECT 1328) se muestran en color rojo.

Así, en medio YPD, la expresión de *CDC19* y *PDC5* en la cepa CECT 1328 fue mayor que en la cepa mutante (**Figura 4.6**) lo que justificaría que, a las 9-10 h, la cepa silvestre produjera más etanol. El análisis comparativo de los cambios de expresión de estos genes en la cepa CECT1328, reveló que existía menos expresión en el medio MFS (**Figura 4.7B**) dando lugar a ratios negativos.

Por otra parte, la cepa M4T123, independientemente de la concentración y tipo de fuente de carbono, fue capaz de producir etanol en ambos medios (**Figura 4.8**). El análisis a nivel genético reveló que no existían diferencias de expresión de los genes *ADH1*, *CDC19*, *ENO2* y *PDC5* (**Figura 4.7A**) en las dos condiciones. Por tanto, el notable incremento en la expresión de estos genes (**Figura 5.6**) no se debería a su sobreexpresión, si no a la bajísima expresión de los mismos en la cepa CECT 1328. Además, se observó, como durante 10-20 h la concentración de etanol permaneció casi constante, sin afectarle durante este tiempo la falta de glucosa en el medio.

### 5.4 Optimización de la producción de glutathion

Un aspecto importante en la optimización de un medio de cultivo de interés industrial no es sólo el conseguir una formulación racional del mismo, sino también la posible inclusión de materias primas de bajo coste que hagan rentable el proceso. Ello ha llevado a la búsqueda de subproductos de bajo valor comercial que puedan sustituir componentes costosos y que puedan ser utilizados como fuentes de carbono o nitrógeno (Crueger y Crueger, 1989; Dreyer y col., 2000).

Los carbohidratos son tradicionalmente las fuentes de energía en la industria de fermentación (Crueger y Crueger, 1989). Para medios de cultivo a nivel industrial, se utilizan como fuente de carbono glucosa, sacarosa, dextrinas, fructosa, glicerol, lípidos, melazas y etanol (Strobel y Sullivan, 1999). Las melazas, un subproducto de la producción del azúcar, es un excelente compuesto para el crecimiento de levaduras, no sólo por ser una de las fuentes

más baratas de carbohidratos, sino por contener, además de azúcar, vitaminas y minerales (Peppler, 1979; Cleasby 1963; An y col., 2001; Vorha y Satyanarayana, 2004).

Como fuente de nitrógeno, se utilizan habitualmente sales de amonio, hidrolizados de caseína, urea y harinas de soja (Strobel y Sullivan, 1999). Otra fuente de nitrógeno que es metabolizada eficientemente es el líquido de maceración del maíz (corn steep liquor; CSL), que se forma durante la producción de almidón a partir de maíz (Winston y Koffler, 1948; Kennedy y col., 1955). El extracto concentrado, con aproximadamente 4% de nitrógeno, contiene numerosos aminoácidos, como alanina, arginina, ácido glutámico, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, metionina y cisteína (Crueger y Crueger, 1989).

La selección y concentración de nutrientes del medio de cultivo se ha utilizado en diversos estudios para analizar el efecto sobre la síntesis de biomasa y contenido intracelular de GSH en *S. cerevisiae* (Udeh y Achremowicz, 1994; Wei y col., 2003; Cha y col., 2004). Las estrategias se basaban en observar el efecto de distintas fuentes de carbono, nitrógeno, sales y aminoácidos al incluirlos o eliminarlos de manera individual en la formación de los medios.

Una de las estrategias más eficientes para la optimización de procesos es la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), la cual tiene como objetivo principal determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación (Montgomery, 2003).

Los diseños experimentales se han utilizado, aunque no con relativa frecuencia, en la optimización de medios de cultivo para, por ejemplo, la producción de lisina (Udeh y Achremowicz, 1993), lisozima (Gheshlaghi y col., 2005) o la producción de polisacáridos (Hsieh y col., 2005). Existen trabajos donde se ha utilizado la MSR para la optimización de la producción de GSH. La realización de un diseño factorial Box-Behnken permitió aumentar la producción de GSH de 66 mg GSH/L a 115 mg GSH/L (Liu y col., 1999). Udeh y Achremowicz (1997), mediante un diseño central compuesto, consiguieron

aumentar la concentración del tripéptido casi el doble (de 87 mg a 160 mg de GSH/L). Sin embargo, es importante resaltar que todos estos resultados se lograron a nivel de laboratorio mediante el uso de medios de cultivo conteniendo ingredientes de gran pureza como glucosa, peptona, vitamina B1 y cisteína, que son caros para una producción a escala industrial.

Mientras que en cultivos crecidos en medio YPD, la cepa mutante M4T123 produjo, aproximadamente, 70 mg GSH/L en el medio MFS alcanzó una concentración de tan sólo 32 mg GSH/L (**Figuras 4.2 y 4.3**). Con el fin de aumentar la concentración de glutatión en este último medio y conseguir valores próximos a los obtenidos en medio YPD, decidimos intentar mejorar la producción mediante la utilización de la MSR.

Como punto de partida de esta estrategia secuencial, utilizamos la composición del medio MFS desarrollado en el laboratorio. Como primer diseño se utilizó un factorial de dos niveles y cuatro factores (melazas, CSL, inóculo y tiempo) que permitió obtener, en una de las combinaciones ensayadas, un valor de 49 mg de GSH/L. El análisis de varianza, a partir de los resultados obtenidos, permitió determinar que tres factores (melazas, inóculo y tiempo) y la interacción entre las melazas y el tiempo influían de forma muy significativa en la producción del tripéptido (**Tabla 4.11**). Sin embargo, la representación de la superficie de respuesta permitió observar un efecto inversamente proporcional entre la relación melazas-CSL y la producción de glutatión (**Figura 4.10B**), de manera que al incrementar la concentración de melazas y, en menor medida, la de CSL la producción de GSH se veía muy reducida.

Con el objetivo de seguir avanzando hacia el óptimo, se utilizó la metodología del ascenso más pronunciado. Se decidió fijar el valor de las variables melazas (1,5%) y CSL (0,5%), debido a su efecto negativo sobre la producción de glutatión. El tercer paso sobre la trayectoria trazada a partir del valor central permitió incrementar la concentración de GSH hasta alcanzar un valor máximo de 59,9 mg GSH /L utilizando 5,4% de inóculo y 72 h de incubación (**Tabla 4.12**). Los valores obtenidos en los sucesivos pasos no

mostraron ninguna mejora, indicando que la respuesta obtenida en el tercer paso se encontraba cerca del óptimo.

Por tanto, una vez en la región próxima al óptimo, se planteó un nuevo experimento con el fin de ajustar los resultados a un modelo de segundo orden. Se utilizó un diseño central compuesto (DCC) que consistió en un diseño factorial de dos niveles y dos factores (% inóculo y tiempo) y cuatro puntos axiales. La presencia de estos puntos axiales le confiere curvatura al modelo, de forma que se puede visualizar y localizar gráficamente la presencia de máximos o mínimos en la superficie de respuesta.

Como mejor resultado, se consiguió un valor de 58 mg GSH/L en un medio compuesto por melazas (1,5%) y CSL (0,5%), utilizando un 7,5% (v/v) de inóculo y 72 h de incubación. Este valor fue muy similar al logrado en el máximo del método del ascenso. De hecho, sólo se modificó un valor de un factor, el porcentaje de inóculo. La representación gráfica de la respuesta, mostró una superficie tipo "teja" (**Figura 4.12**), que reveló la existencia de un máximo, aunque no de forma muy evidente, ya que la curvatura en los extremos no fue muy pronunciada.

Los valores alcanzados (58-60 mg/L) supusieron un incremento del 80% con respecto a la concentración inicial (32 mg/L), aproximándose bastante a los valores logrados con el medio de laboratorio YPD. Dicho aumento se debe, en parte, a un incremento de la biomasa, aunque los resultados obtenidos en el experimento del método del ascenso más pronunciado (**Tabla 4.16**) mostraron que este incremento no siempre está directamente relacionado con un aumento en la concentración de glutatión. De hecho, mientras que la biomasa fue mayor en los cuatro últimos pasos de la trayectoria de ascenso, no se logró mejorar la producción del tripéptido. Otros autores también han observado este efecto y así, el aumento en la concentración de peptonas en el medio de cultivo incrementó la producción de biomasa en un 10%, mientras que el contenido de GSH disminuyó en un 5% (Liu y col., 1999). Por el contrario, una disminución de la biomasa puede conllevar un incremento en la concentración de glutatión, tal y como sucede durante la adición de cisteína al medio de cultivo (Alfafara y col.,

1992; Udeh y Achremowicz, 1997). La pérdida de biomasa debido a sus efectos tóxicos se ve compensada con el aumento en la síntesis del tripéptido, al ser este el aminoácido limitante del proceso (Tateishi y col., 1974).

## **5.6 Obtención de cepa superproductora mediante aumento de la dosis génica**

La inhibición por producto final de GSH1, hace que la reacción catalizada por dicha enzima sea el paso limitante para un aumento en la producción del tripéptido (Ohtake y col., 1988). En base a este hecho, varios estudios determinaron que el aumento del número de copias del gen *GSH1*, tanto en levaduras (Kimura y Murata; 1983; Ohtake y col., 1988), como en otros microorganismos (Gushima y col., 1983; Li y col., 2005), permitía aumentar la concentración de la proteína logrando un incremento en la síntesis del antioxidante.

En uno de los escasísimos trabajos en los que fue posible obtener su documentación bibliográfica, la clonación y expresión del gen *GSH1* en una cepa de *S. cerevisiae*, utilizando un plásmido episómico (Fan y col., 2004), permitió incrementar de la concentración de GSH unas 1,5 veces con respecto a la cepa parental (de 8,7 mg/g a 13 mg/g).

Los vectores de *S. cerevisiae* más estables, utilizados para la producción de proteínas, son los vectores integrativos (Lopes y col., 1989; Lopes y col., 1991; Romanos y col., 1992; Nieto y col., 1999) cuya tasa de pérdida por generación es menor del 0,1% en condiciones no selectivas. En esta levadura, los procesos de recombinación *in vivo*, se producen de forma muy eficiente siendo suficiente la presencia de pequeños fragmentos homólogos para que tengan lugar estos procesos (Manivasakam y col., 1995).

Con el objetivo de desarrollar un sistema estable, evitando la presencia de secuencias de origen bacteriano y de marcadores de resistencia a

antibióticos, se planificó la construcción de un vector conteniendo un casete de expresión integrativo. De esta forma se cubrían dos requisitos: ser compatible con su utilización en la industria alimentaria y, al ser un proceso de autoclonaje, la cepa resultante no se considera un Microorganismo modificado genéticamente (GMM) de acuerdo con la directiva comunitaria 90/219/EEC.

Para conseguir un elevado nivel de expresión del gen *GSH1*, la integración se dirigió al locus del DNA ribosómico, ya que presenta más de 100 copias susceptibles de recombinarse (Romanos y col., 1992). Varios grupos han utilizado esta estrategia para producir, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Nieto y col., 1999), o la  $\alpha$ -acetolactato decarboxilasa de *Enterobacter aerogenes* (Fujii y col., 1990) o de *Acetobacter aceti ssp. xylinum* (Yamano y col., 1994), entre otros.

La integración se logró utilizando un fragmento lineal cuyos extremos contenían dos secuencias de unos 600 pb homólogos con la subunidad 25S. Como marcador de selección se utilizó el gen *URA3* al que se eliminaron 16 pb en el promotor. La eliminación de estas zonas en la región promotora hace que el nivel de expresión del gen sea menor, lo que provoca, bajo presión selectiva, un aumento del número de copias del marcador con el objetivo de poder compensar el menor nivel de expresión (Lopes y col., 1989, 1991).

Las seis cepas seleccionadas mostraron una producción específica del tripéptido entre un 6%-32% mayor que la cepa control, aumentando entre un 6% y un 68% la concentración final (**Tabla 4.15**). Este aumento de la concentración final con respecto a la cepa parental se debe, en parte, a un aumento en la biomasa de los transformantes por la integración del gen *URA3d* y la complementación de la auxotrofia al uracilo. Sin embargo, la cepa TBT6, con un crecimiento casi igual al de la cepa sin transformar, mostró el mayor incremento en el contenido específico de GSH (1,5 veces). Este aumento es, aproximadamente, similar al conseguido por otros autores (Fan y col., 2004) mediante el uso de vectores episómicos.

La hibridación del DNA genómico con las sondas de los distintos elementos del fragmento integrado reveló la aparición de bandas de tamaños muy diferentes a los esperados, confirmando la existencia de recombinaciones inespecíficas. Estos resultados coinciden con los obtenidos al utilizar el mismo plásmido para la producción de la glucosa oxidasa (GOX) de *Aspergillus niger* (Valdivieso y col., sometido para su publicación). La hibridación del DNA genómico con la sonda de la glucosa oxidasa, reveló la aparición de bandas debidas a recombinaciones inespecíficas aunque además, en este caso, sí se obtuvieron las bandas del tamaño teóricamente calculado. La funcionalidad de la estrategia se comprobó tanto por la actividad de la enzima heteróloga producida, como por la estabilidad del casete integrado.

Además, la utilización de otro sistema de expresión utilizando la levadura *P. pastoris* (Ronchel, comunicación personal), también permitió lograr con éxito, la expresión del gen *GSH1* de *S. cerevisiae*. Quizás, el hecho de intentar expresar un gen propio de *S. cerevisiae*, o la localización de los fragmentos en la subunidad 25S incrementen la probabilidad de que se produzcan estas recombinaciones inespecíficas.

La estabilidad mitótica del casete de expresión integrado, o alguna de sus partes, confirmó una alta estabilidad después de mantener las cepas en crecimiento exponencial durante, aproximadamente, 75 generaciones en medio no selectivo. Un altísimo porcentaje (>99%) de las colonias analizadas fueron capaces de retener el marcador *URA3d* y crecer de forma normal en placas de medio mínimo. Las tasas de segregación obtenidas se situaron todas por debajo de 0,1%, coincidiendo con los valores esperados para este tipo de vectores (Lopes y col., 1991; Nieto y col., 1999).

El análisis de la concentración de GSH también reveló que, aparentemente, no se habían producido alteraciones que afectasen a la síntesis del tripéptido, ya que los valores obtenidos tanto en los cultivos iniciales, como en aquellos crecidos de forma exponencial durante días, fueron muy similares.

## **6. Conclusiones**



1. Después de cuatro rondas de mutación al azar y selección en medio sólido en presencia de oxidantes o cadmio, se ha obtenido la cepa *S. cerevisiae* M4T123 con una capacidad de producción específica de glutathione cuatro veces superior a la cepa silvestre CECT 1328.
2. El análisis de la expresión génica de la cepa mutante, mostró un aumento en la expresión de los genes implicados en la síntesis de glutathione con respecto a la cepa silvestre.
3. La sobreexpresión en la cepa mutante de los genes que participan en la regulación por limitación de nitrógeno podría explicar, en parte, el mejor crecimiento de esta cepa en el medio MFS.
4. Se ha observado, en la cepa M4T123, un aumento importante en la expresión de los genes *FLR1* y *YCF1* relacionados con la resistencia a metales pesados y compuestos tóxicos. El crecimiento de esta cepa en los medios conteniendo elevadas concentraciones de peróxidos y cadmio, así como en el medio MFS, podría explicarse, en parte, por la sobreexpresión de ambos genes.
5. Utilizando la metodología de superficie de respuesta se ha conseguido una concentración de 58 mg GSH/L, lo que representa un incremento del 80% con respecto al valor inicial.
6. Se ha construido un vector que porta un casete de expresión integrativo para *S. cerevisiae*. Este casete permite dirigir la integración del gen de interés en el locus 25S del DNA ribosómico de la levadura.
7. La utilización de este casete de expresión, portando el gen *GSH1*, ha permitido obtener cepas que mejoran la producción específica de glutathione en la cepa *S. cerevisiae* CECT 1645 entre un 6% y un 32%, mientras que la concentración final aumentó entre un 60% y un 258%.

Esta mejora se debió, al menos en parte, al incremento en la biomasa debido a la complementación de la auxotrofia al uracilo.

8. Se ha confirmado, mediante análisis por hibridación, la integración en el genoma de los genes presentes en el casete de expresión. Dicha integración reveló la existencia de procesos de recombinación inespecífica.
9. La estabilidad del casete integrado, o partes del mismo, fue muy elevada. Más del 99% de las células crecidas durante 75 generaciones en medio no selectivo fueron capaces de crecer en medio mínimo y de producir glutatión a la misma concentración que en los cultivos iniciales.

## **7. Bibliografía**



- 
- **Adrio JL y Demain AL** (2005). Microbial cells and enzymes. A century of progress. En: Methods in Biotechnology. Barredo JL (Ed). Humana Press, Inc., Totowa, NJ, pp:1-27.
  - **Adrio JL y Demain AL** (2006). Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**; 187-214.
  - **Aikens J y Dix TA** (1991). Perhidroxil radical (HOO·) initiated lipid peroxidation : the role of fatty acid. *Airs Pharmaceutica.* **39**; 5-18.
  - **Alarco AM, Balan I, Talibi D, Mainville N y Raymond M** (1997). AP1 mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the mayor facilitator superfamily. *J. Biol. Chem.* **272**; 19304-19313.
  - **Alfajara CG, Miura K, Shimizu H, Shioya S y Suga K** (1992). Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**; 141-146.
  - **Alfajara CG, Miura K, Shimizu H, Shioya S, Suga K y Suzuki K** (1993). Fuzzy control of ethanol concentration and its application to maximum glutathione production in yeast fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **41**; 493-501.
  - **An GH, Jang BG y Cho MH** (2001). Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J. Biosci. Bioeng.* **92**; 121-125.
  - **Anderson ME** (1997). Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv. Pharmacol.* **38**; 65-68.
  - **Anderson ME** (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biol. Interact.* **111**; 1-14.

- **Anderson ME, Levy E y Meister A** (1994). Preparation and use of glutathione monoesters. *Methods Enzymol.* **234**; 492-499.
- **Ankrah NA, Appiah-Opong R y Dzokoto C** (2000). Human breastmilk storage and the glutathione content. *J. Trop. Pediat.* **46**; 111-113.
- **Apontoweil P y Berends W** (1975). Isolation and characterization of glutathione-deficient mutants of *Escherichia coli* K<sub>12</sub>. *Biochem. Biophys. Acta.* **399**; 10-22.
- **Avendaño A, Deluna A, Olivera H, Valenzuela L y Gonzalez A** (1997). *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **179**; 5594-5597.
- **Baltz, RH** (1986). Mutagenesis in *Streptomyces*. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain AL y Solomon NA (Eds). ASM press. Washington D.C., pp: 184-190.
- **Baltz, RH** (1999). Mutagenesis. En: Encyclopedia of Bioprocessing Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Separation. Flickinger MC y Drew SW (Eds). Wiley, New York, pp 1819-1822.
- **Benitez T, Del Castillo L, Aguilera A, Conde J y Cerdá-Olmedo E** (1983). *Appl. Environm. Microbiol.* **45**; 1429-1436.
- **Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF y Zheng XF** (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p and phosphatases. *J. Biol. Chem.* **275**; 35727-35733.
- **Bloch K** (1949). The synthesis of glutathione in isolated liver. *J. Biol. Chem.* **179**; 1245-1254.
- **Boer VM, Winde JH, Pronk JT y Piper MD** (2003). The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in

---

aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus or sulfur. *J. Biol. Chem.* **278**; 3265-3274.

- **Boveris A y Cadenas E** (1975). Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**; 311-314.
- **Boveris A y Cadenas E** (2000). Mitochondrial of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubisemiquinone. *IUBMB life.* **50**; 245-250.
- **Bowman L y Geiger E** (1984). Optimisation of fermentation conditions for alcohol production. *Biotechnol. Bioeng.* **26**; 1492-1497.
- **Box GEP y Draper NR** (1987). Empirical model-building and response surfaces. Wiley, New York.
- **Brennan RJ y Schiestl RH** (1996) Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.* **356**; 171-178.
- **Briviba K y Sies H** (1994). Natural antioxidants in human health and disease. Frei B (Ed). San Diego, Academic Press, pp: 107-128.
- **Broach JR** (1983). Construction of high copy vectors using 2µm circle sequences. *Methods Enzymol.* **101**; 307-325.
- **Burton G y Traber M** (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.* **10**; 357-382.
- **Busciglio J y Yankner BA** (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature.* **378**; 776-779.
- **Busto O, Miracle M, Guasch J y Borrull F** (1997). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with on-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr. A.* **757**: 311-318.

- **Cai H, Kauffman S, Naider F y Becker JM** (2006). Genome-wide screen reveals a wide regulatory network for di/tri-peptide utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **172**; 1459-1476.
- **Capdevila L, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Masters BB y Estabrook RW** (1981). The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**; 1357-1362.
- **Carmel-Harel O y Storz G** (2000). Roles of glutathione and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**; 439-461.
- **Cerdá-Olmedo E y Ruiz-Vázquez** (1979). Nitrosoguanidine mutagenesis. En: Genetics of Industrial Microorganisms. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp 15-20.
- **Cereser C, Guichard J, Draï J, Bannier E, García I, Boget S, Parvaz P y Revol A** (2001). Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **752**; 123-132.
- **Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A y Lefebure PJ** (1991). Antioxidants show an anti-hypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin. Sci.* **81**; 739-742.
- **Cha JY, Park JC, Jeon BS, Lee YC y Cho YS** (2004). Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. *J. Microbiol.* **42**; 51-55.
- **Chen HC** (1996). Optimizing the concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus in a citric acid fermentation with response surface method. *Food Biotechnol.* **10**; 13-27.
- **Chignell CF** (1979). Spin labelling in pharmacology. En: Spin Labeling. New York, Academic Press. pp 223-228.

- 
- **Choe M, Jackson C y Yu BP** (1995). Lipid peroxidation contributes to age related membrane rigidity. *Free Rad. Biol. Med.* **18**; 977-984.
  - **Christianson T, Sikorski R, Dante M, Shero J y Hieter P** (1992). Multifunctional yeasts high-copy-number vectors. *Gene.* **110**; 119-122.
  - **Cleasby TG** (1963). The feeding value of molasses. *South African Sugar J.* **47**; 360-379.
  - **Collinson LP y Dawes IW** (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J. Gen. Microbiol.* **138**; 329-335.
  - **Collinson LP y Dawes IW** (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, *GLR1*, encoding glutathione reductase. *Gene.* **156**; 123-127.
  - **Cooper TG** (2002). Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**; 223-238.
  - **Costa V y Moradas-Ferreira P** (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* **22**; 217-246.
  - **Crueger W y Crueger A** (1989). Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia S.A.
  - **Curtin LV** (1983). Molasses: General considerations. En: Molasses in animal nutrition, National Feed Ingredients Association, Iowa.
  - **De Martin A** (2005). Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en la síntesis de glutatión. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
  - **Delaunay A, Isnard AD y Toledano MB** (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**; 5157-5166.

- **Doménech-Sánchez A y Vila J** (2004). Fundamentos, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en la microbiología médica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**; 46-54.
  
- **Donnerstag B, Ohlenschläger G, Cinatl J, Amrani M, Hofmann D, Flindt S, Treusch G y Trager L** (1996). Reduced glutathione and S-acetyl glutathione as selective apoptosi-inducing agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **110**; 63-70.
  
- **Donnerstag B, Ohlenschläger G, Cinatl J, Amrani M, Hofmann D, Flindt S, Treusch G y Trager L** (1996). Reduced glutathione and S-acetyl glutathione as selective apoptosis-inducing agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **110**; 63-70.
  
- **Dormer UH, John Westwater J, Niall F. McLaren NF, Kent NA, Mellor J y Jamieson DJ** (2000). Cadmium-inducible expression of the yeast *GSH1* gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. *J. Biol. Chem.*, **275**; 32611-32616.
  
- **Dreyer A, Coello N y Montiel E** (2000). Utilización de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de un medio de cultivo para la producción de L-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. *Agronomía Tropical* **50**; 167-188.
  
- **Elskens MT, Jaspers CH y Penninckx MJ** (1991). Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **137**; 637-644.
  
- **Embuscado ME, Marks JS y Bemiller JN** (1994). Bacterial cellulose. II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response surface methodology. *Food Hydrocolloids.* **8**; 419-430.
  
- **Fahey RC, Brown WC, Adams WB y Worsham MB** (1978). Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* **133**; 1126-1129.

- **Fan X, He X, Guo X, Qu N, Wang C y Zhang B** (2004). Increasing glutathione formation by functional expression of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **26**; 415-417.
- **Fang YZ, Yang S y Wu G** (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* **18**; 872-879.
- **Fauchon M, Lagniel G, Aude JC, Lombardia L, Soularue P, Petat C, Marguerie G, Sentenac A, Werner M y Labarre J** (2002). Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *J. Mol. Cell.* **9**; 713-723.
- **Fernandes L, Rodrigues-Pousada C y Struhl K** (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell Biol.* **12**; 6982-93.
- **Finkel T** (1998). Oxygen radicals and signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**; 248-253.
- **Flagg EW, Coates RJ, Jones DP, Byers TE, Greenberg RS, Gridley G, McLaughlin JK, Blot WJ, Haber M y Preston-Martin S** (1994). Dietary glutathione intake and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Am. J. Epidemiol.* **139**; 453-465.
- **Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F y Covarrubias Robles AA** (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 46; 24-46.
- **Foster RR y Estabrook RW** (1993). Is oxygen an essential nutrient? *Annu. Rev. Nutr.* **13**; 383-403.
- **Freeman BA y Crapo J** (1982). Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agentes. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **1** ; 401-415.
- **Fridovich I** (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* **201**; 875-880.

- **Fujii T, Kondo K, Shimizu F, Sone H, Tanaka J y Inoue T** (1990). Application of a ribosomal DNA integration vector in the construction of a brewer's yeast having alpha-acetolactate decarboxylase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**; 997-1003.
- **Fujio T F, Hayashi Mi, Tomiyoshi Y y maruyama A** (1985). Production of glutathione. JP patent 60027397.
- **García-Ayuso LE, Luque-García JL y de Castro MD** (2000). Approach for independent-matrix removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from solid samples based on microwave-assisted Soxhlet extraction with on-line fluorescence monitoring. *Anal. Chem.* **72**; 3627-3634.
- **Garril A** (1994). Transport. En: The growing fungus. Gow NA y Gadd GM (Eds). Chapman and Hall, London, pp: 163-181.
- **Gerola N y Cerdá-Olmedo E** (1975). Distribution of mutations induced by ethyl methanesulfonate and ultraviolet radiation in the *Escherichia coli*. *Gene* **45**;149-158.
- **Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P y Fenn WO** (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science.* **119**; 623-626.
- **Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, Douglas PL** (2005). Medium optimization for hen egg white lysozyme production by recombinant *Aspergillus niger* using statistical methods. *Biotechnol. Bioeng.* **90**; 754-760.
- **Gilbert DL** (1981). Oxygen and living processes. An Interdisciplinary approach. Springer-Verlag, NY.
- **Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB y Labarre J** (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**; 22480-22489.

- **Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H y Oliver SG** (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**; 563-567.
- **Grant CM, MacIver FH y Dawes IW** (1996). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**; 511-515.
- **Greenberg JT y Demple B** (1986). Glutathione in *Escherichia coli* is dispensible for resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gamma radiation. *J. Bacteriol.* **168**; 1026-1029.
- **Griffith OW y Mulcahy RT** (1999). The enzymes of glutathione synthesis:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Adv. in Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **73**; 209-267.
- **Gunge N** (1983). Yeast DNA plasmid. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**; 253-276.
- **Gushima H, Miya T, Murata K y Kimura** (1983). Construction of glutathione- producing strains of *Escherichia coli* B by recombinant DNA techniques. *J. Appl. Biochem.* **5**; 43-52.
- **Haaland PD** (1989). Experimental design in biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York, NY.
- **Hagen TM y Jones** (1989). Role of glutathione transport in extrahepatic detoxication. En: Glutathione centennial: molecular and clinical implications. Sakamoto Y, Higashi T, Taniguchi T y Meister A (Eds). San Diego Academic Press, pp: 423-438.
- **Hagen TM, Wierzbicka GT y Sillau AH** (1990). Bioavailability of dietary glutathione: effect on plasma concentration. *Tract. Am. J. Physiol.* **256**; G530-G535.

- **Halliwell B y Gutteridge JM** (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press.
  
- **Hamers FP, Brakkee HJ, Cavalletti E, Tedeschi M, Marmonti L, Pezzoni G, Neijt P J y Gispen HW** (1993). Reduced glutathione protects against Cis-platin induced neurotoxicity in rats. *Cancer Res.* **53**; 544-549.
  
- **Harington CR y Mead TH** (1935). Synthesis of glutathione. *Biochem. J.* **29**; 1602-1611.
  
- **Harshman KD, Moye-Rowley WS y Parker CS** (1988). Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell.* **53**; 321-330.
  
- **Harzer G, Sawatzki G, Schweikhardt y Georgi G** (1991). Protein, peptide, and amino acid mixtures with optimized amino acid composition for use as human milk supplements. EP Patent 418593.
  
- **Herrero M, De Lorenzo V y Timmis KN** (1990). Transposon vectors containing non antibiotic-resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**; 6557-6567.
  
- **Hicks JB y Herskowitz I** (1976). Intercorversion of yeast mating types.I. Direct observation of the action of the homothalism (HO) gene. *Genetics.* **83**;245-258.
  
- **Hinnen A y Meyhack B** (1982). Vectors for cloning in yeast. *Curr. Top. Microbiol. Inmunol.* **96**; 101-117.
  
- **Hirakawa K, Nomura K y Kato M** (1985). Lactic acid for high yield glutathione production by yeasts. JP patent 60244284.
  
- **Holmes DS y Quigley M** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal. Biochem.* **114**; 193-197.

- 
- **Holmgren A** (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**; 13963-13966.
  - **Hopkins FG** (1921). *J. Biochem.* **15**; 286-305.
  - **Hsieh C, Tsai MJ, Hsu TH, Chang DM y Lo CT** (2005). Medium optimization for polysaccharide production of *Cordyceps sinensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **120**; 145-157.
  - **Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama K, Izawa S y Kimura A** (1999). Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**; 27002-27009.
  - **Isoyama T, Murayama A, Nomoto A y Kuge Y** (2001). Nuclear import of the yeast AP-1-like transcription factor Yap1p is mediated by transport receptor Pse1p, and this import step is not affected by oxidative Stress *J. Biol. Chem.*, **276**; 21863-21869.
  - **Jain A, Martensson J, Einar E, Auld PAM y Meister A** (1991). Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**; 1913-1917.
  - **Jamieson J** (2002). Saving sulfur. *Nature Genet.* **31**; 228-230.
  - **Jensen PK** (1966). Antimycin insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in electron transport particles. *Biochem. Biophys. Acta.* **122**; 157-161.
  - **Jones DP, Coates RJ, Flagg FW, Eley JW, Block G, Greenberg RS, Gunter EW y Jackson B** (1995). Glutathione in foods listed in the National Cancer Institutes Health Habits and History Food Frequency Questionnaire. *Nutr. Cancer.* **17**; 57-75.
  - **Kamel Z y Al-Zahram SH** (1985). Optimization of a growth medium for antibiotic production by *Streptomyces anandii var taifiensis*. *Acta Pharmaceutica Turcica.* **27**; 21-29.

- **Katano R y Watanabe C** (1989). Antioxidant compositions containing vitamin E and glutathione for cosmetics. JP patent 1256586.
- **Kennedy HE, Speck ML y Aurand LW** (1955) Studies on a growth stimulant from corn steep using *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol.* **70**; 70-77.
- **Kennedy M y Krouse D** (1999). Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**; 456-475.
- **Kimura A y Murata K** (1983). Microorganisms of the genus *Escherichia*, hybrid DNA for use in their production and the use of the microorganisms in the preparation of glutathione. EP patent 71486.
- **Kimura H, Inoe Y y Kobayashi S** (1996). Glutathione manufacture with recombinant *Saccharomyces*. JP patent 8070884.
- **Kinoshita K, Machida M, Oka S, Yamamoto Y y Tomikanehara H** (1986). Manufacture of yeast cells containing high glutathione. JP patent 61192282.
- **Kistler M, Maier K y Eckardt-Schupp F** (1990). Genetic and biochemical analysis of glutathione-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis* **5**; 39-44.
- **Kistler M, Summer KH y Eckardt F** (1986). Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* **173**; 117-120.
- **Kowalski DP, Feeley RM y Jones DP** (1990). Use of exogenous glutathione for metabolism of peroxidized methyl linoleate in rat small intestine. *J. Nutr.* **120**; 1115-1121.
- **Krinsky N y Denecke S** (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* **69**; 205-209.

- 
- **Kubo K y Takashashi M** (2001). Cosmetics containig liquids similar to human body fluids and antioxidants. JP patent 2001199868.
  - **Kuge S, Jones N y Nomoto** (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* **17**;10-20.
  - **Kuhn KM, Derisi JL, Brown PO y Sarnow P** (2001). Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a non fermentable carbon source. *Mol. Cell. Biol.* **21**; 916-927.
  - **Lafaye A, Junot C, Pereira Y, Lagniel G, Tabet JC, Ezan E y Labarre J** (2005). Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**; 24723-24730.
  - **Langer R S, Hamilton B K y Gardner C R** (1976). Enzymatic regeneration of ATP. *AIChE J.* **22**; 1079-1090.
  - **Lawrence CW** (1991). Classical mutagenesis techniques. En: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. Guthrie C y Fink G (Eds). *Methods Enzymol.* **194**; 273-281.
  - **Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J y Toledano MB** (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in Yeast. *J. Biol. Chem.* **274**; 16040-16046.
  - **Levy EJ, Anderson ME y Meister A** (1993). Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**; 9171-91-75.
  - **Li S, Ault A , Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ y Fassler JS** (1998b). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* **17**; 6952-6962.

- **Li Y, Chen J, Mao YY, Lun SY y Koo YM** (1998a). Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **33**; 709-714.
- **Li Y, Hugenholtz J, Sybesma W, Abee T y Molenaar D** (2005). Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**; 83-90.
- **Li Y, Wei G y Chen J** (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**; 233-242.
- **Li ZS, Szczypka M, LuYP, Thiele DJ y Rea PA** (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugates pump. *J. Biol.Chem.* **271**; 6509-6517.
- **Lillie SH y Pringle JR** (1980). Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143**; 1384-1394.
- **Liu CH, Hwang C y Liao CC** (1999). Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* **34**; 17-23.
- **Lomaestro B M y Malone M** (1995). Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann. Pharmacother.* **29**; 1263-1273.
- **Lopes TS, Hakkaart GJ, Koerts BL, Raue HA y Planta RJ.** (1991). Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **105**; 83-90
- **Lopes TS, Klootwijk J, Veenstra AE, Van der Aar PC, Van Heerikhuizen H, Raué HA y Planta RJ** (1989). High-copy-number integration into ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae* : a new vector for high-level expression. *Gene.* **79**; 199-206.
- **Ma H, Kunes S, Schatz PJ y Botstein D** (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene.* **58**; 201-216.

- 
- **MacDiarmid CW, Milanick MA y Eide DJ** (2002). Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**; 39187-39194.
  - **Maddox I y Richert S** (1977). Use of response surface methodology for the optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.* **43**; 197-204.
  - **Magasanik B y Kaiser C** (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **290**; 1-18.
  - **Manivasakam P, Weber SC, McElver J y Schiestl RH** (1995). Microhomology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **23**; 2799-2800.
  - **Marklund SL** (1984). Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.* **74**; 1398-1403.
  - **Martensson J, Jain A, Stole E, Frayer W, Auld P y Meister A** (1991). Inhibition of glutathione synthesis in the new born rat: A model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**; 9360-9364.
  - **Martínez-Cayuela M** (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* **77**; 147-161.
  - **Marzluf GA** (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**; 17-32.
  - **Mason RP y Fisher V** (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. En: Free radicals biology. Pryor WA (Eds). New York, Academic Press.
  - **May J, Mendiratta S, Hill K y Burk RF** (1997). Reduction of hydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* **272**; 22607-22610.

- **McCord JM y Fridovich I** (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**; 6049-6055.
- **Mehdi K, Thierie J y Penninckx MJ** (2001).  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. *Biochem. J.* **359**; 631-637.
- **Mehdi K y Penninckx M** (1997). An important role for glutathione and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**; 1885-89.
- **Meister A** (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **263**; 17205-17208.
- **Meister A** (1995). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* **251**; 3-13.
- **Meister A y Anderson ME** (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**; 711-60.
- **Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A y Moreno-Sanchez R** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**; 653-671.
- **Meydani S y Meydani M** (2000). Immune stimulating dietary supplement and methods of use thereof. WO Patent 2000067596.
- **Miller JH** (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY, pp: 352-355.
- **Miwa N** (1976). Glutathione. JP patent 51144789.
- **Miwa N** (1978). Production of glutathione by fermentation. JP patent 53094090.

- 
- **Miyamoto I y Miwa N** (1977). Production of glutathione by immobilized glutathione synthetase. JP patent 52051089.
  - **Molloy J, Martin JF, Baskerville PA, Fraser SA y Markus HS** (1998). S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. *Circulation*. **98**; 1372-1375.
  - **Momose Y e Iwahashi H** (2001). Bioassay of cadmium using a DNA microarray: genome-wide expression patterns of *Saccharomyces cerevisiae* response to cadmium. *Env. Toxicol. Chem.* **20**; 2353-2360.
  - **Montgomery D** (2003) 2ª Ed. Diseño y análisis de experimentos. Ed. Limusa, Mexico.
  - **Moradas-Ferreira P y Costa V** (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report* **5**; 277-285.
  - **Morgan BA, Banks GR, Toone WN, Raitt D, Kuge S y Johnston LH** (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**; 1035-1044.
  - **Mumberg D, Muller R y Funk M** (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**; 119-122.
  - **Murata K, Miya T y Gushima H** (1983). Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *Escherichia coli* B. *Agric. Biol. Chem.* **47**; 1381-1383.
  - **Murata K, Tani K, Kato J y Chibata I** (1981). Glycolytic pathway as an ATP regeneration system and its application to the production of glutathione and NADP. *Enzyme Microb. Technol.* **3**; 233-242.

- **Murphy TD, Hokes J, Green TC y Cundell AM** (1999) The application of response surface methodology to sterilization process development and validation of a water cascade autoclave. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **53**; 83-94.
- **Myers RH y Montgomery DC** (1995). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.
- **Nakajima A y Fukuda M** (1997). Skin moisturizers containig amine compounds, antioxidants and amino acids. JP patent 9175983.
- **Nelissen B, De Wachter R y Goffeau A** (1997). Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**; 113-34.
- **Netto L, Chae H, Kang S, Rhee S G y Stadtman E R** (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J. Biol. Chem.* **271**; 15315-15321.
- **Nguyen DT, Alarco AM y Raymond M** (2001). Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J. Biol. Chem.* **276**; 1138-1145.
- **Nieto A, Prieto JA y Sanz P** (1999). Stable high-copy-number integration of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.* **15**; 459-466.
- **Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H y Gotoh N** (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**; 1322-1326.
- **Niki E, Yamamoto Y, Komuro E y Sato E** (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**; 2015-2055.

- 
- **Niki M, Kaneuchi M, Yoshioka Y y Iwazaki Y** (1970). JP Patent 35021606.
  - **Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, Ogata T, Yabuuchi S, Murata K y Kimura A** (1989). Expression of glutathione synthetase gene of *Escherichia coli* B in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **68**; 390-399.
  - **Ohtake Y, Watanabe K, Tezuka H, Ogata T, Yabuuchi S, Murata K y Kimura A** (1988). The expression of gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Escherichia coli* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **52**; 2753-2762.
  - **Orr-Weaver TL, Szostak JW y Rothstein RJ** (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**; 6354-6258.
  - **Ostergaard S, Olsson L y Nielsen J** (2000). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**; 34-50.
  - **Packer J, Slater T y Wilson R** (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* **278**; 737-738.
  - **Packer L** (1994). Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **738**; 257-264.
  - **Parekh S, Vinci VA y Strobel RJ** (2000). Improvement of microbial strains and fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**; 287-301.
  - **Pastore A, Federici G, Bertini E y Piemonte F** (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chem. Acta.* **333**; 19-39.
  - **Patel GB, Khan Aw y Roth CA** (1978). Optimum levels of sulphate and iron for the cultivation of pure cultures of methanogens in synthetic media. *J. Appl. Bact.* **45**; 347-356.

- **Penninck MJ y Elskens MT** (1993). Metabolisms and functions of glutathione in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **34**; 239-301.
- **Penninckx M** (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, enviromental and oxidative stresses. *Enzyme Microbiol. Technol.* **26**; 737-742.
- **Penninckx M** (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2**; 295-305.
- **Peppler HJ** (1979). Production of yeasts and yeast products. En: Microbial technology. Peppler HJ y Perlman D (Eds). Academic Press, London. pp: 157-185.
- **Petes TD** (1979). Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**; 410-414.
- **Rodriguez-Manzanaque MT, Ros J, Cabiscol E, Sorribas A y Herrero E** (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**; 8180-90.
- **Romanos MA, Scorer CA y Clare JJ** (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* **8**; 423-488.
- **Rothstein R** (1990). Targeting, disruption, replacement and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* **185**; 281-301.
- **Sakato K y Tanaka H** (1992). Advanced control of glutathione fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **40**; 904-912.
- **Sakai Y, Kazarimoto T, Tani Y** (1991) Transformation system for an asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii*: cloning of the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene (URA3), isolation of uracil auxotrophic mutants, and use of the mutants for integrative transformation. *J Bacteriol.* 1173; 7458-63

- 
- **Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  - **Sander P, Grunewald S, Bach M, Haase W, Reilander H y Michel H** (1994). Heterologous expression of the human D2S dopamine receptor in protease-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Eur J Biochem.* **226**; 697-705.
  - **Saunders VA y Saunders JR** (1987). Microbial genetics applied to biotechnology. Croom H (Ed). London & Sydney.
  - **Saval S, Pablos L y Sanchez S** (1993). Optimization of a culture medium for streptomycin production using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* **43**; 19-25.
  - **Sawa Y, Shindo H, Nishimura S y Ochiai H** (1986). Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells. *Agric. Biol. Chem.* **50**; 1361-1363.
  - **Scandalios JG** (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* **38**; 995-1014.
  - **Schmidt MG y Konetzka WA** (1986). Glutathione overproduction by selenite resistant *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **32**; 825-827.
  - **Schmitt M, Brown A y Trumpower L** (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acids Res.* **10**; 3091-3092.
  - **Sen CK** (1997). Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutr. Biochem.* **8**; 660-672.
  - **Sen CK** (1998). Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **55**; 1747-1758.

- **Seo HY, Chung YJ, Kim SJ, Park CU y Kim KS** (2003). Enhanced expression and functional characterization of the human ferritin H- and L-chain genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**; 57-63.
- **Sevanian A, Davies K, Hochstein P** (1985). Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**; 117-124.
- **Shacter E** (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* **32**; 307-326.
- **Shaker HM, Farid MA y El-Diwany A** (1985). Optimization of the composition of the nutrient medium for cellulase and protein biosynthesis by thermophilic *Aspergillus spp.* *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.* **9**; 1-5.
- **Shima J, Kuwazaki S, Tanaka F, Watanabe H, Yamamoto H, Nakajima R, Tokashiki T y Tamura H** (2005). Identification of genes whose expressions are enhanced or reduced in baker's yeast during fed-batch culture process using molasses medium by DNA microarray analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **102**; 63-71.
- **Shimizu H, Araki K, Shioya S y Suga K** (1991). Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* **38**; 196-205.
- **Shimosaka M, Fukuda Y, Murata K y Kimura A** (1982). Application of hybrid plasmids carrying glycolysis genes to ATP production by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**; 98-103.
- **Shinmoto Y, Sakata O y Arakane K** (2002). Skin preparations containing peroxynitrite inhibitors. JP patent 2002326922.
- **Sies H** (1985). Oxidative stress. San Diego. Academic Press.
- **Sies H** (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* **27**; 916-921.

- 
- **Simpson IN y Caten CE** (1979). Induced quantitative variation for penicillin titre in clonal populations of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen Microbiol.* **110**; 1-12.
  - **Slot JW, Geuze HJ, Freeman BA y Crapo JD** (1986). Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells. *Lab. Invest.* **55**; 363-371.
  - **Smyth JF, Bowman A, Perren T, Wilkinson P, Prescott RJ y Tedeschi M** (1997). Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: results of a double-blind, randomised trial. *Ann. Oncol.* **8**; 569-573.
  - **Som T, Armstrong KA, Volkert FC y Broach JR** (1988). Autoregulation of 2µm circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell.* **52**; 27-37.
  - **Stanbrough y Magasanik B** (1995). Transcriptional and posttranslational regulation of the general aminoacid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**; 94-102.
  - **Starke DW, Chen Y, Bapna CP, Lesnefsky EJ y Mielal JJ** (1997). Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **23**; 373-384.
  - **Stephen D y Jamieson DJ** (1997). Amino acid-dependent regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *GSH1* gene by hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **23**; 203-210.
  - **Stephen DW, Rivers SL y Jamieson DJ** (1995). The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **16**; 415-423.
  - **Storz G, Christman MF, Sies H y Ames BN** (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**; 8917-21.

- **Strobel RJ y Sullivan GR** (1999). Experimental design for improvement of fermentations. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain AL y Davies JE (Eds). Washington DC, ASM Press, pp. 80-93.
- **Struhl K, Stinchcomb DT, Scherer S y Davis RW** (1979). High frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**; 1035-1039.
- **Suzuki M y Kurata M** (1992). Effects of ATP level on glutathione regeneration in rabbit and guinea pig erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* **103**; 859-862.
- **Tai SL, Boer VM, Daran-Lapujade P, Walsh MC, De Winder JH, Daran JM y Pronk JT** (2005). Two-dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures: combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**; 437-447.
- **Tamura Y, Takase M, Kajikawa M, Mikio K y Horie R** (2003). Glutathione and docosahexaenoic acid for baby formula. JP 2003009818.
- **Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A y Sakamoto Y** (1974). Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem.* **75**; 93-103.
- **Tenreiro S, Fernandes AR y Sa-Correia I** (2001). Transcriptional activation of *FLR1* gene during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth with benomyl: role of Yap1p and Pdr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**; 216-222.
- **Ter Linde JJ, Liang H, Davis RW, Steensma HY, Van Dijken JP y Pronk JT** (1999). Genome-Wide Transcriptional Analysis of Aerobic and Anaerobic Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**; 7409-7413.

- 
- **Ter Schure EG, Van Riel NA y Verrips CT** (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**; 67-83.
  - **Testa B, Mesolella M y Testa D** (1995). Glutathione in the upper respiratory tract. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **104**; 117-119.
  - **Tezuka H, Otake Y, Yabuchi S y Kimura H** (1987). A novel *Saccharomyces* promoter and its use in glutathione biosynthesis. JP patent 62275685.
  - **Thomas D y Surdin-Kerjan Y** (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**; 503-532.
  - **Thomas D, Rothstein R, Rosemberg N y Surdin-Kerjan Y** (1988). SAM2 encodes the second methionine S-adenosyl transferase in *Saccharomyces cerevisiae*: Physiology and regulation of both enzymes. *Mol. Cel. Biol.* **8**; 5132-5139.
  - **Thorpe GW, Fong CS, Nazif Alic Higgins VJ y Dawes IW** (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**; 6564-6569.
  - **Toone WM y Jones N** (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**; 55-61.
  - **Townsend DM, Tew KD y Tapiero H** (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* **57**; 145-155.
  - **Trickler D, Shklar G y Schwartz J** (1993). Inhibition of oral carcinogenesis by glutathione. *Nutr. Cancer.* **20**; 139-144.
  - **Troller J** (1966). Sulfhydryl containing potentianing agents of food preservatives. US Patent 3276881.

- **Turrens JF y Boveris A** (1980). Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**; 421-424.
- **Udeh K y Achremowicz B** (1993). Optimization of cultivation medium composition of an L-lysine producing mutant: The use of response surface methodology. *Acta Microbiol. Pol.* **42**; 171-180
- **Udeh K y Achremowicz B** (1994). Production of yeast biomass with elevated content of glutathione. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **44**; 93-100.
- **Udeh K y Achremowicz B** (1997). High-glutathione containing yeast *Saccharomyces cerevisiae*: optimization of production. *Acta Microbiol. Pol.* **46**; 105-114.
- **Valencia E, Marin A y Hardy G** (2001a). Glutathione-nutritional and pharmacologic viewpoints: Part I. *Nutrition.* **17**; 783-784.
- **Valencia E, Marin A y Hardy G** (2001b). Glutathione-nutritional and pharmacologic viewpoints: Part IV. *Nutrition.* **17**; 783-784.
- **Van Dijken JP y Scheffers WA** (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**; 199-224.
- **Verduyn C, Zomerdijk TP, Van Kijkens JP y Scheffers WA** (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**; 181-185.
- **Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano M y Labarre J** (2001). A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**; 8469-8474.
- **Vincenzini MT, Favilli F e Iantomasi T** (1992). Intestinal uptake and transmembrane transport systems of intact GSH ; characteristics and possible biological roles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1113**; 13-23.

- 
- **Vinci VA y Byng G** (1999). Strain improvement by nonrecombinant methods. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain AL y Davies JE (Eds). ASM press, Washington DC, pp: 103-113.
  - **Vohra A y Satyanarayana T** (2004). A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*. *J. Appl. Microbiol.* **97**; 471-476.
  - **Wahlbom CF, Cordero RR, Van Zyl WH, Hahn-Hägerdal B y Jönsson LJ** (2003). Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xilose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xilose metabolism and the pentose phosphate pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**; 740-746.
  - **Warner J** (1989) Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **53**; 256-271.
  - **Watanabe K, Yamano Y, Murata K y Kimura A** (1986). Glutathione production by *Escherichia coli* cells with hybrid plasmid containing tandemly polymerized genes for glutathione synthetase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**; 375-378.
  - **Webster NR y Nunn JP** (1988). Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.* **60**; 98-108.
  - **Wei G, Li Y y Chen J** (2003). Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Biochem.* **38**; 1133-1138.
  - **Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ y Moye-Rowley WS** (1994). Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J. Biol. Chem.* **269**; 32592-32597.

- **Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC y Singer RA** (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **57**; 383-401 .
- **Wheeler GL, Trotter EW, Dawes IW y Grant CM** (2003). Coupling of the transcriptional regulation of biosynthesis to the availability of glutathione and methionine via the Met4 and Yap1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* **278**; 49920-49928.
- **White RP** (1990). Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agentes. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **1**; 401-415.
- **Williams LD Y Shaw BR** (1987). Protonated base pairs explain the ambiguous pairing properties of O<sup>6</sup>-methylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **84**; 1779-1783.
- **Winston R y Koffler H** (1948). Corn steep liquor in microbiology. *Bacteriol. Rev.* **12**; 297-311.
- **Wiseman H y Halliwell B** (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**; 17-29.
- **Wodicka L, Dong M, Mittmann M, Ho H y Lockhart J** (1997). Genome wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol.* **15**; 1359-1367.
- **Wu G, Fang Y, Yang S, Lupton JR y Turner ND** (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* **134**; 489-492.
- **Yamano S, Kondo K, Tanaka J y Inoue T** (1994). Construction of a brewer's yeast having  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase gene from *Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* integrated in the genome. *J. Biotechnol.* **32**; 173-178.
- **Yamaoka Y y Takimura O** (1990). Manufacture of glutathione with green algae *Dunaliella*. JP patent 2234691.

- **Yamauchi A, Konishi A, Minakami T, Izumi A, Matsubara S, Shimamoto I y Sato I** (2003). Glutathione supplement baby formula. JP patent 2003024011.
- **Yasuyuki O y Seizou Y** (1991). Molecular cloning of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene (*GSH1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **7**; 953-961.
- **Yokozeaki K, Takeuchi H y Hirose Y** (1985). Glutathione. JP Patent 60160894.
- **Yoshio T, Michiyo H, Hiroyuki H, Hisatoki K, masaki Y y Nobuo M** (2005). Method for producing glutathione. JP patent 2005245390.
- **Yoshitake S, Nanri H, Fernando MR y Minakami S** (1994). Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J. Biochem.* **116**; 42-46.
- **Yu B** (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**; 139-162.
- **Zuzuarregui A, Monteoliva L, Gil C y Del Olmo M** (2006). Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**; 836-847.