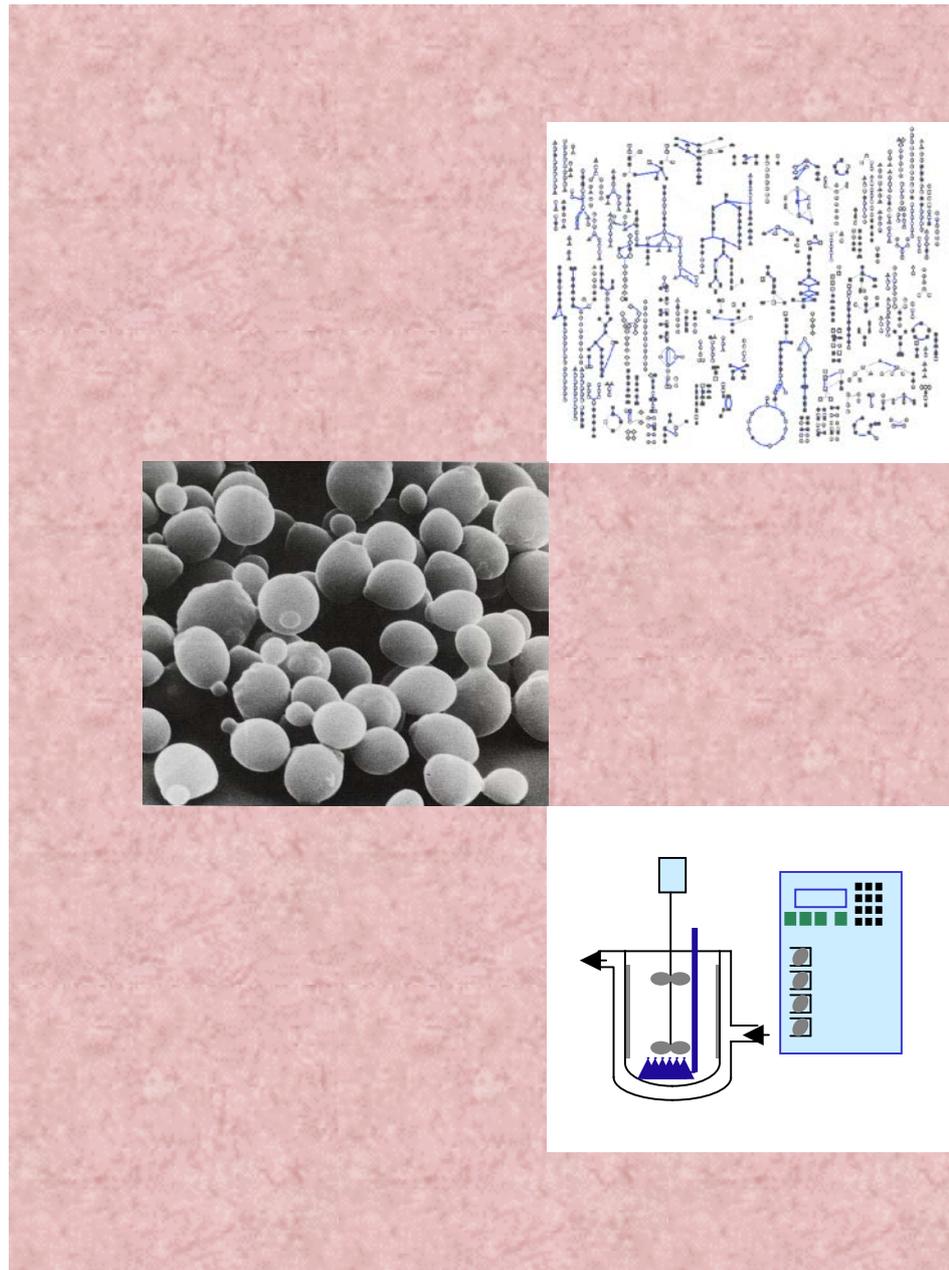


CONTROL DEL METABOLISMO DE *Saccharomyces cerevisiae* EN LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN



Ana María De Martín Barry

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana María de Martín Barry
D.L.: Gr. 1983 - 2005
ISBN: 84-338-3654-4



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Ingeniería Química

CONTROL DEL METABOLISMO DE
Saccharomyces cerevisiae
EN LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

Ana María De Martín Barry

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Granada 2005

MARÍA JESÚS GUARDIA ALBA, DOCTORA EN INGENIERÍA QUÍMICA
POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES, DEL
DEPARTAMENTO DE FERMENTACIÓN DE PULEVA BIOTECH S.A.
(GRANADA),

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente Memoria titulada
**“Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en
la síntesis de glutatión”**, ha sido realizado por D^a Ana
María De Martín Barry, bajo mi dirección, en este
Departamento y en colaboración con el Departamento de
Ingeniería Química de la Universidad de Granada, y reúne
todos los requisitos necesarios para su presentación como
Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presente en Granada a
veintinueve de Octubre de dos mil cinco.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido, además del trabajo realizado, una tesis de vida, en la cual he podido hacer balance y reafirmar que lo más importante es la gente que te rodea, que te quiere y a la que quieres. Por eso tengo que agradecer no sólo a aquellas personas que me han podido ayudar más directamente en el trabajo de investigación, sino también a todas las personas (y personitas) que con su existencia, apoyo y amistad me han tenido sobre sus manos y me han elevado en los momentos más difíciles. Así quiero agradecer,

A Tony, que con su amor ha logrado ser paciente conmigo, porque me llena, por ser mi hogar y por tantas y tantas alegrías que se derivan de su compañía....eres el amor de mi vida, TE QUIERO CARI. A los chiquitines Jesús y Juanma a los que he dejado sin ordenador durante un buen tiempo, pero que sin guardarme ningún rencor me han alegrado esos ratos libres llenos de puzzles y películas; habéis ocupado un buen trozo de mi corazón.

A mis padres. Sin vosotros no hubiera podido llegar hasta donde he llegado; siempre estáis ahí cuando os necesito y me habéis brindado los mejores valores para poder desarrollarme como persona. Gracias papá por ese interés y por tus correcciones. A mis hermanas, Raquel, Sarah, Judy y Susy por su preocupación constante y por su comprensión.

A mis cuatro sobrinos, nacidos durante estos cuatro años, David, Ciara, Patrick y Amalia, que a pesar de la distancia que me entristece, están muy, pero que muy dentro de mi corazón. De ellos he aprendido el valor de la inocencia, y han llenado mi ordenador de los salvapantallas más bellos jamás conocidos.

A mi familia en general, a todos mis titos, y de forma especial a mi tito Pepe y a mi tita Elena.

A Yayo y a Antonio, por su gran amabilidad, cariño y atención, por esas comidas tan ricas que he podido disfrutar. A toda su familia. A Mayte, Julián, Jorge y Juanma.

A M^a Jesús, por la confianza que ha depositado en mí, por sus consejos, por enseñarme todo lo que sé de fermentación, por todo el tiempo dedicado.

A Fernando Camacho, por acceder a ser mi tutor, y por estar ahí cuando he acudido a él con la gran amabilidad que lo caracteriza.

A los directores de Puleva Biotech S.A. por brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis. En general a todos los miembros de Puleva Biotech, siempre atentos.

A Blanca, a la quiero pedir perdón por el poco tiempo que he podido estar con ella cuando más lo necesitaba, por ser mi ejemplo de valor y coraje ante la adversidad y por ser el motor que me ha impulsado en la recta final.

A mi gran amiga Layla, que ha estado a mi lado durante todo este tiempo, por sus magníficos consejos, por la fuerza que transmite. Gracias a ella me he podido levantar en cada tropiezo y mirar el mundo con mayor optimismo.

A Chema y a Malena, compañeros de tertulias y de laboratorio, amigos, contadores de grandes anécdotas. Malena, gracias por tu risa, por tu naturalidad, por ayudarme en parte de este trabajo como compañera del “gluteishion”, me has hecho reír mucho y eso te lo agradezco de corazón. Chema, eres una persona muy especial y de tu gran sabiduría me has empapado; me siento dichosa por haber podido conocer a alguien como tú. Guardaré muchos recuerdos de nuestros gazapos (y los de Layla).

A mis compañeros de Departamento y aquellos que lo fueron, Manolo, Alberto, Laura y Paz, por su capacidad de escucha, porque me han tenido que “soportar” estos cuatro años y porque de ellos he podido aprender a trabajar en un gran equipo, rodeado de biorreactores y bichitos. Todo lo que he recibido y recibo de vosotros es vuestra inmensa generosidad, amistad, ayuda, y otras tantas cosas igual de buenas y bonitas.

A las amigas que he podido conocer gracias a su paso por Puleva Biotech, Isa, Inés y Lourdes.

A Alberto Zafra y Antonio Garballo, grandes sabios del mundo de la cromatografía, que me han ayudado de manera inmensa con su trabajo constante en todo el análisis desarrollado en esta Tesis. Muchísimas gracias, sin vosotros esto no hubiera sido posible.

Al resto de componentes del Departamento de Biotecnología, en el cual empecé a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación y que desde que los conozco han estado siempre dispuestos a colaborar. A Oskar por sus muchos consejos, a Carmen Ronchel por los conocimientos transmitidos, a Javier y José por las dudas resueltas, a Carmen Membrilla por todo el trabajo de laboratorio que me ha aligerado, y a “MRS”.

A Miguel Ángel Moreno, por ser mi modelo de trabajo y superación. “Caminante no hay camino, se hace camino al andar”.

A mi grupo, por todos los viernes que compartimos, por todas las experiencias vividas: sois mi gran pilar.

A todos y cada uno de mis amigos, por las conversaciones, cervecillas, excursiones, risas, alegrías, tristezas, por ser parte importante en mi vida. A Ché, Ángel, Pedro, Jose, Navas, Fran, Cristina, Illescas, Belén, Paco, Abi, Jesús, Pilar, David, Isra y Tania.

Gracias Dios, porque siempre puedo dar gracias.

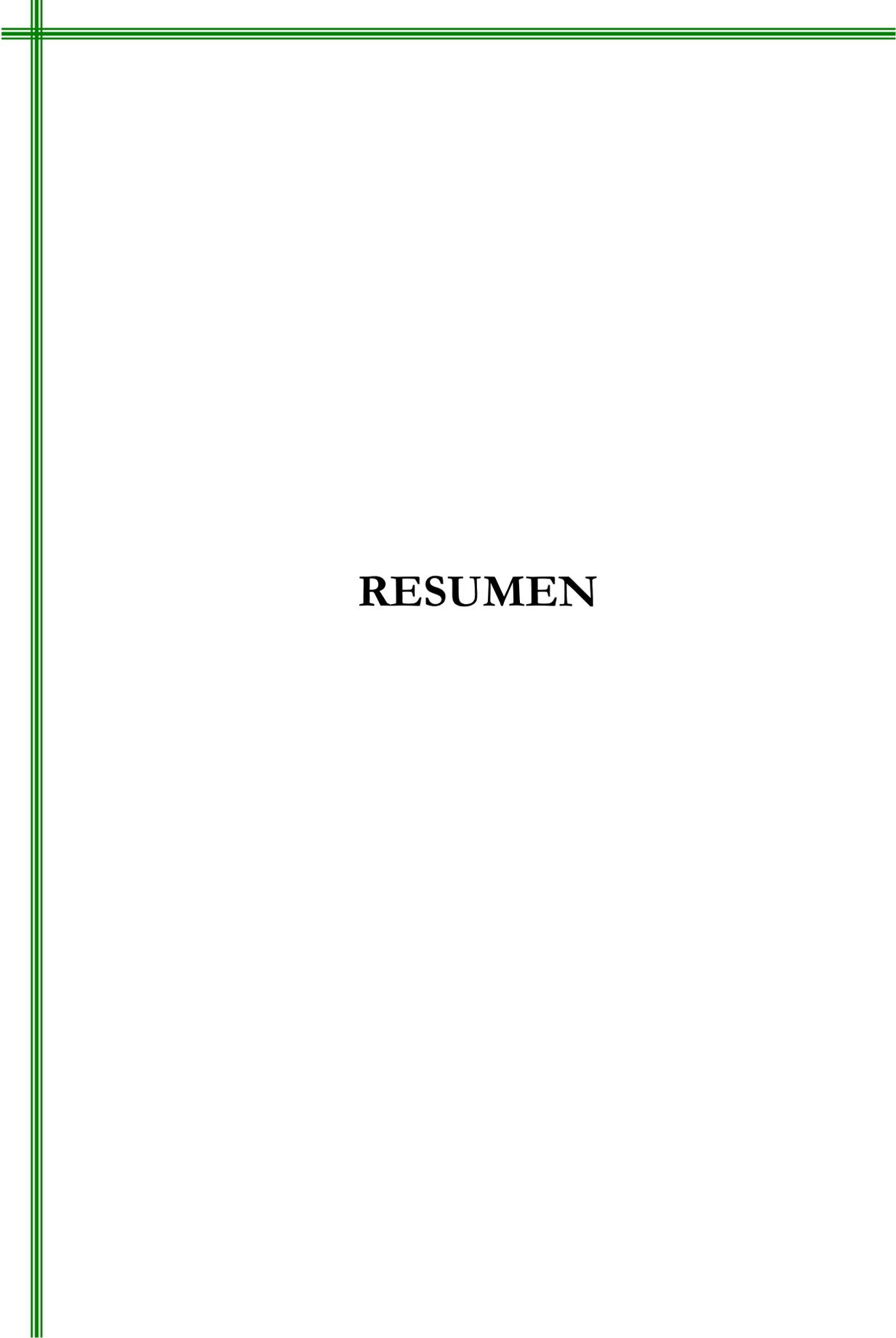
A mis padres

A Tony

A Blanca

“Vivimos en el mundo cuando amamos. Sólo una vida vivida para los demás merece la pena ser vivida”

Albert Einstein



RESUMEN

RESUMEN

Los radicales libres son átomos o moléculas con electrones desapareados y altamente reactivos e inestables. Normalmente son moléculas de oxígeno, por lo que los radicales libres se suelen denominar especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species). Son capaces de oxidar muchas moléculas biológicas, como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. Los organismos vivos han desarrollado sistemas de defensa antioxidantes para retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos.

Este trabajo se centra en el estudio del metabolismo del glutatión (GSH), uno de los antioxidantes intracelulares más importantes en los organismos, que además de actuar en la protección contra el daño oxidativo causado por los radicales libres, tiene numerosas funciones, como por ejemplo, el mantenimiento de los grupos tiol de las proteínas y de la forma reducida de la cisteína, coenzima A y ácido ascórbico, la formación de ácidos desoxirribonucleicos, y la protección contra compuestos tóxicos. El glutatión es un tripéptido formado por cisteína, glutamato y glicina, a partir de dos reacciones consecutivas.

El objetivo final de la producción biotecnológica de GSH es conseguir una elevada concentración de GSH (mg/L), por el aumento del contenido intracelular (mg GSH / g biomasa), de la densidad celular, o mediante ambos métodos. En este trabajo se quiere optimizar el proceso de producción de glutatión por fermentación utilizando una cepa mutada de *Saccharomyces cerevisiae* y mediante alimentación de sus aminoácidos constituyentes, cisteína, glutamato y glicina.

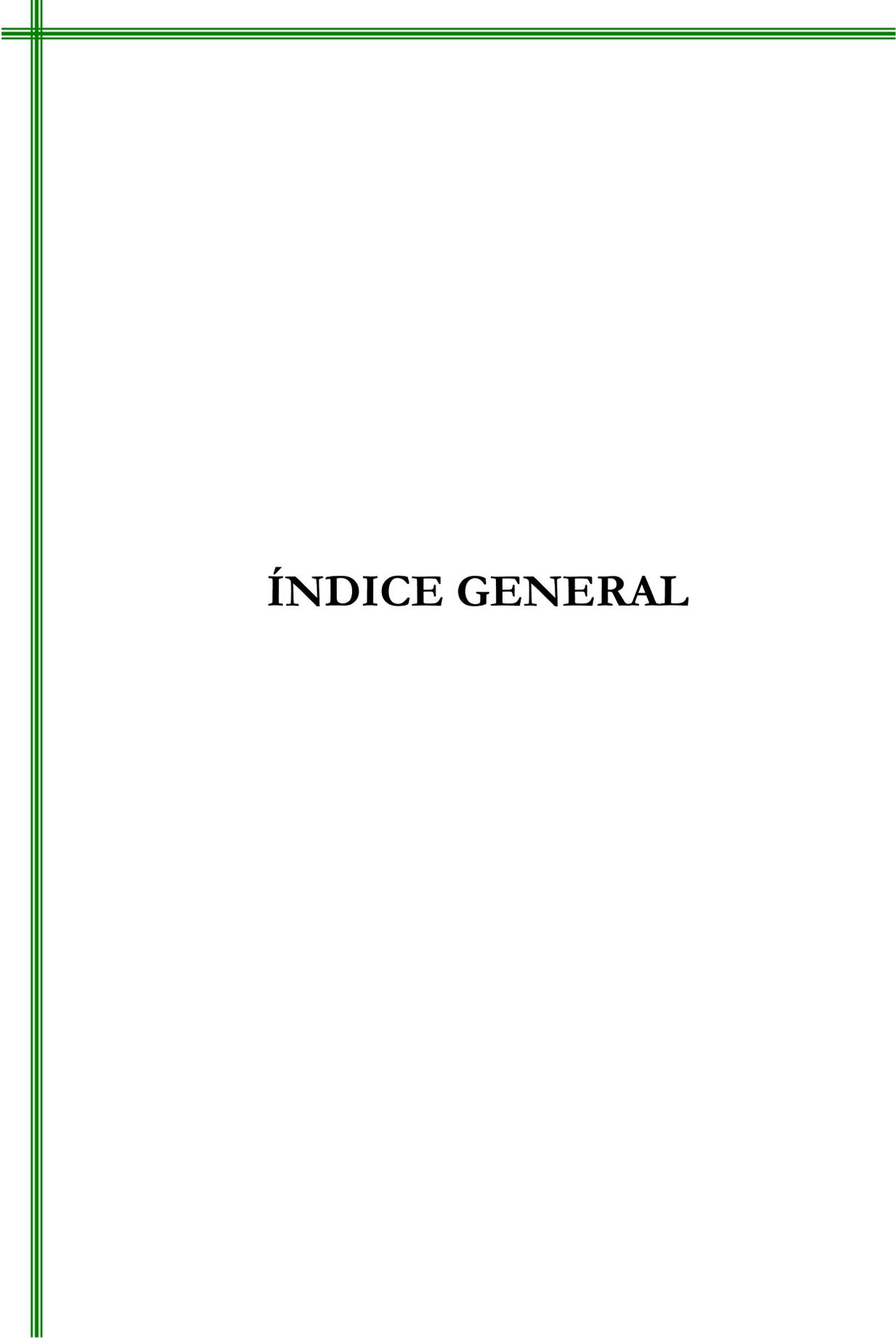
Son pocos los trabajos relacionados con este tema y se realizan fundamentalmente en matraz; además, se centran exclusivamente en la concentración de biomasa y en la concentración específica de glutatión. Nosotros queremos proporcionar una visión más completa del efecto de los aminoácidos en el metabolismo de *S. cerevisiae*, dirigiendo principalmente nuestra estrategia hacia el incremento de la concentración específica de GSH, y, a ser posible, de gamma-glutamilcisteína (gGC), que es el producto de la primera reacción y que puede actuar también como antioxidante.

En el diseño de cualquier proceso hay que tener en cuenta el factor económico. Esto nos lleva a realizar un estudio sobre el medio de cultivo a utilizar y analizamos también otras fuentes más baratas que pudieran dar lugar a los aminoácidos constituyentes del glutatión, como puede ser el sulfato amónico.

La supervivencia de un organismo y su evolución, dependen de su capacidad de adaptación a cambios en las condiciones intra y extracelulares. Puesto que el glutatión es el principal antioxidante celular frente al estrés oxidativo, interesa conocer cómo puede evolucionar su producción ante dicho estrés.

El análisis de flujos metabólicos (MFA) es una técnica que se utiliza para determinar los flujos (velocidades de reacción) a través de diversas rutas intracelulares, y permite descubrir y analizar las rutas que pueden verse modificadas frente a cambios en alguna de las condiciones de cultivo. La aplicación de esta técnica nos puede ser de utilidad para nuestro objetivo porque facilita el desarrollo de estrategias de cultivo.

En conclusión, con este trabajo queremos proporcionar más datos sobre el metabolismo de síntesis de glutatión en una cepa mutada de *S. cerevisiae*. Proponemos una estrategia de control que permita incrementar la concentración intracelular y total de GSH. Damos una explicación de los efectos de cada uno de los aminoácidos constituyentes del glutatión basándonos en nuestros resultados experimentales y en los aspectos del metabolismo de *S. cerevisiae* que se conocen en la actualidad. Se establece la base para posteriores trabajos dirigidos a minimizar el coste de producción.



ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN	5
1. ESTRÉS OXIDATIVO	6
2. RADICALES LIBRES	6
2.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE	6
2.2. PRINCIPALES RADICALES LIBRES	8
3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	9
4. IMPORTANCIA DEL GLUTATIÓN	11
4.1. BIOSÍNTESIS DEL GLUTATIÓN	12
4.2. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE GLUTATIÓN	14
4.2.1. Síntesis enzimática de Glutatión	15
4.2.2. Síntesis microbiana de Glutatión	15
5. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
5.1. RESPUESTA ADAPTATIVA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	23
6. OBJETIVOS	25
7. REFERENCIAS	26

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMO Y SUSTRATO	39
1.1. CEPA	39
1.2. MEDIO DE CULTIVO	39
2. EQUIPOS	41
2.1. BIORREACTOR	41
2.2. EQUIPOS AUXILIARES	44
3. PROTOCOLO DE FERMENTACIÓN	46
3.1. PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO	46
3.2. DISOLUCIONES CORRECTORAS DEL pH	46
3.3. PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR	46
3.4. SISTEMA DE MONITORIZACIÓN Y CONTROL EN LÍNEA	47
3.5. MONITORIZACIÓN EN LÍNEA DE LOS GASES DE ENTRADA Y SALIDA	48
3.6. TOMA DE MUESTRAS	49
4. MEDIDAS BIOLÓGICAS	49
4.1. DETERMINACIÓN DEL PESO SECO DE BIOMASA	49
4.2. ANÁLISIS DE ALCOHOLES MEDIANTE GC-FID	50
4.2.1. Principio del método	50

4.2.2. Reactivos y patrones	50
4.2.3. Aparatos	51
4.2.4. Descripción del proceso	51
4.2.4.1. Condiciones instrumentales	51
4.2.4.2. Desarrollo	52
4.2.4.3. Expresión de los resultados	53
4.3. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC-IR	53
4.3.1. Principio del método	53
4.3.2. Reactivos y patrones	53
4.3.3. Aparatos	54
4.3.4. Descripción del proceso	54
4.3.4.1. Condiciones instrumentales	54
4.3.4.2. Desarrollo	55
4.3.4.3. Expresión de los resultados	56
4.4. ANÁLISIS DE AMONIO	56
4.4.1. Preparación de patrones	56
4.4.2. Preparación del sistema	56
4.4.3. Medida de la concentración de amonio de una muestra real	57
4.5. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC-FLUORESCENCIA	57
4.5.1. Principio del método	57
4.5.2. Reactivos y patrones	57
4.5.3. Aparatos	58
4.5.4. Descripción del proceso	58
4.5.4.1. Condiciones instrumentales	58
4.5.4.2. Desarrollo	59
4.5.4.3. Expresión de los resultados	61
4.6. ANÁLISIS DE GSH Y gGC MEDIANTE HPLC-FLUORESCENCIA	61
4.6.1. Principio del método	61
4.6.2. Reactivos y patrones	62
4.6.3. Aparatos	63
4.6.4. Descripción del proceso	63
4.6.4.1. Condiciones instrumentales	63
4.3.4.2. Desarrollo	64
4.3.4.3. Expresión de los resultados	65
5. VELOCIDADES ESPECÍFICAS Y RENDIMIENTOS	65
6. OXÍGENO ABSORBIDO Y DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO	69
6.1. CAUDALES DE AIRE A LA ENTRADA Y A LA SALIDA	69
6.2. CAUDAL DE O ₂ ABSORBIDO Y CO ₂ DESPRENDIDO	70
6.3. OXÍGENO TOTAL ABSORBIDO Y DIÓXIDO DE CARBONO TOTAL DESPRENDIDO	71
7. REFERENCIAS	71

CAPÍTULO 3 COMPORTAMIENTO DE LA CEPA SALVAJE Y MUTADA EN DISTINTAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1. INTRODUCCIÓN	77
2. METODOLOGÍA	78
2.1. CEPAS	78
2.2. CONDICIONES DE OPERACIÓN	78
2.3. MEDIOS DE CULTIVO	79
3. ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA SALVAJE	
<i>S. cerevisiae</i> 1328	80
3.1. VELOCIDADES ESPECÍFICAS: μ , q_s , q_E	80
3.2. RENDIMIENTOS: $Y_{X/S}$, $Y_{E/X}$	82
3.3. MEDIO DE CULTIVO ELEGIDO	83
4. COMPARACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE LA CEPA SALVAJE	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1328 Y EL DE LA MUTADA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
MT-32	83
4.1. CRECIMIENTO EN MATRAZ DE <i>S. cerevisiae</i> 1328 Y <i>S. cerevisiae</i> MT-32	84
4.2. CRECIMIENTO EN BIORREACTOR DISCONTINUO DE LA CEPA SALVAJE (<i>S. cerevisiae</i>	
1328) Y DE LA MUTADA (<i>S. cerevisiae</i> MT-32)	86
4.3. CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTADA <i>S. cerevisiae</i> MT-32 BAJO LIMITACIÓN DE	
OXÍGENO	88
5. CONTROL Y MONITORIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
MT-32 Y PRODUCCIÓN DE GSH EN MEDIO DE MELAZAS Y CORN STEEP	
LIQUOR, EN REACTOR DISCONTINUO	90
5.1. CONSUMO DE OXÍGENO Y PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO	90
5.2. CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO	91
5.3. CONTROL DE pH: ADICIÓN DE BASE Y ÁCIDO	92
5.4. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL METABOLISMO DE <i>S. cerevisiae</i> MT-32 SIN LIMITACIÓN	
DE O ₂	93
6. REFERENCIAS	94

CAPÍTULO 4 INFLUENCIA DEL ESTADO METABÓLICO INICIAL DE LA CÉLULA EN LA PRODUCCIÓN DE GLUTATIÓN

1. INTRODUCCIÓN	99
2. ESTUDIO DE LAS VELOCIDADES DE ALIMENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS	
.....	99

3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS EN DIFERENTES FASES DEL CRECIMIENTO	101
3.1. FASES DEL CRECIMIENTO ANALIZADAS	101
3.2. RESPUESTA EN EL CRECIMIENTO DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS	103
3.3. SÍNTESIS DE DIPÉPTIDO Y GLUTATIÓN EN FUNCIÓN DEL MOMENTO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS	106
3.4. ANÁLISIS DEL ESTADO INICIAL DE LA CÉLULA	108
4. REFERENCIAS	110

CAPÍTULO 5 EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN LA FISIOLOGÍA DE LA CEPA MUTADA *Saccharomyces cerevisiae* MT-32

1. INTRODUCCIÓN	115
2. METODOLOGÍA	116
3. UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES	117
3.1. INFLUENCIA EN EL RENDIMIENTO DE BIOMASA	118
3.2. EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES EXTRACELULARES	119
4. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO	121
5. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO UTILIZADA EN LA SÍNTESIS DE GSH	123
6. DISCUSIÓN	124
7. REFERENCIAS	126

CAPÍTULO 6 EFECTO DE LA FUENTE DE AZUFRE EN LA FISIOLOGÍA DE LA CEPA MUTADA *Saccharomyces cerevisiae* MT-32

1. INTRODUCCIÓN	133
2. METODOLOGÍA	134
3. UTILIZACIÓN DE AZUFRE Y VELOCIDAD DE CONSUMO A PARTIR DE CISTEÍNA	135

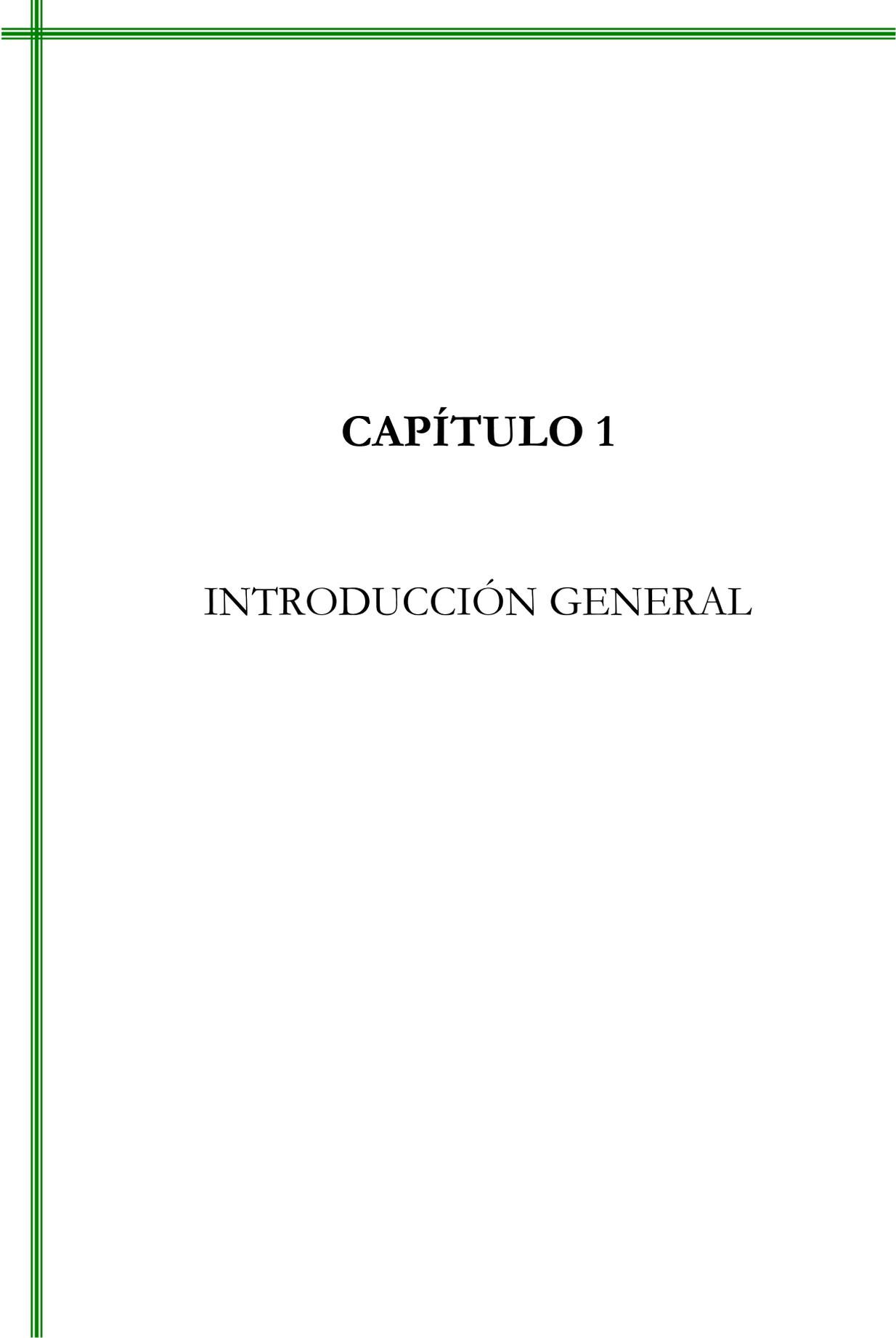
4. RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LA SÍNTESIS DE BIOMASA, DIPÉPTIDO Y GSH	136
5. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE AZUFRE EN EL METABOLISMO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y EN LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	137
5.1. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EN PRESENCIA DE SULFATO AMÓNICO Y CISTEÍNA	137
5.2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS	141
6. CONCLUSIÓN	142
7. REFERENCIAS	142

CAPÍTULO 7 ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 CON ALIMENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS

1. INTRODUCCIÓN	149
2. ESTUDIO DEL MODO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS	149
2.1. ALIMENTACIÓN CONTINUA DE CISTEÍNA	150
2.2. ALIMENTACIÓN DE CISTEÍNA EN PULSOS	152
3. EFECTO DE LA PRESENCIA DE CISTEÍNA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	155
3.1. EVOLUCIÓN DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE CISTEÍNA	160
4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLUTAMATO EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	162
4.1. EVOLUCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE GLUTAMATO	165
5. EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLICINA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	167
5.1. EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE GLICINA	169
6. INTERPRETACIÓN DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE CISTEÍNA, GLUTAMATO Y GLICINA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	172
6.1. DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS	175
6.2. DEFINICIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL PARA LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS HACIA LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	179
7. REFERENCIAS	183

**CAPÍTULO 8 EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN LA SÍNTESIS DE
ANTIOXIDANTES EN *Saccharomyces cerevisiae*
MT-32**

1. INTRODUCCIÓN	189
2. ADICIÓN DE H ₂ O ₂ EN FED-BATCH AL COMIENZO DE LA FERMENTACIÓN	190
3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE H ₂ O ₂ Y CISTEÍNA	191
4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE H ₂ O ₂ Y GLICINA	192
5. DISCUSIÓN	195
6. REFERENCIAS	196
NOMENCLATURA	197
APÉNDICES	203
CONCLUSIONES	211



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN	5
1. ESTRÉS OXIDATIVO	6
2. RADICALES LIBRES	6
2.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE	6
2.2. PRINCIPALES RADICALES LIBRES	8
3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	9
4. IMPORTANCIA DEL GLUTATIÓN	11
4.1. BIOSÍNTESIS DEL GLUTATIÓN	12
4.2. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE GLUTATIÓN	14
4.2.1. Síntesis enzimática de Glutatión	15
4.2.2. Síntesis microbiana de Glutatión	15
5. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
5.1. RESPUESTA ADAPTATIVA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> A LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	23
6. OBJETIVOS	25
7. REFERENCIAS	26

INTRODUCCIÓN

El oxígeno es indispensable para la vida. El éxito de los organismos aerobios reside en el hecho de que gracias al oxígeno pueden extraer más energía de los alimentos que los organismos anaerobios, mediante procesos que se dan en el interior de la célula y que se conocen como beta-oxidación, glucólisis, ciclo de Krebs y respiración celular. Estos procesos permiten la liberación de toda la energía contenida en los alimentos; así, nuestras células canalizan la energía extraída de los nutrientes hacia ciertas moléculas, entre las que destaca el trifosfato de adenina (ATP), que se utiliza en la síntesis posterior de macromoléculas.

Para obtener, por tanto, estas moléculas energéticas que son imprescindibles en un buen número de reacciones metabólicas, es preciso oxidar los nutrientes. En el caso de los carbohidratos el proceso se inicia en el citoplasma de la célula donde, mediante la glucólisis, se transforma cada molécula de glucosa (de seis átomos de carbono) en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico. El oxígeno es esencial en la siguiente cadena de reacciones que tienen lugar en las mitocondrias, de las que se obtienen moléculas energéticas a partir del ácido. En estos orgánulos celulares, el ácido pirúvico es oxidado totalmente hasta dióxido de carbono, liberándose toda la energía de los hidratos de carbono que es almacenada en forma de ATP.

En ausencia de oxígeno, el piruvato no produce dióxido de carbono, sino otros compuestos como el ácido láctico o el etanol. Se trata de la fermentación, un proceso para la obtención de energía, propia de organismos anaerobios, que no es tan efectiva como la respiración.

En ambos procesos, fermentación y respiración, una molécula cualquiera debe ser reducida, es decir debe aceptar electrones, para que los carbohidratos y las grasas sean degradados. El oxígeno es la molécula perfecta en este sentido porque, en principio, se reduce hasta producir un residuo absolutamente inocuo, el agua.

Por tanto, el oxígeno es esencial; pero en este camino metabólico en el que el oxígeno es reducido, es decir, en el que va aceptando electrones, surgen las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón, por ejemplo, el producto generado es un radical libre con carga negativa, el anión superóxido, de una gran capacidad oxidativa. La aceptación de un segundo electrón produce otra especie reactiva de gran potencia, el peróxido de hidrógeno.

Existen un buen número de fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno, pero hay un porcentaje, en torno al 5% del oxígeno utilizado en las reacciones de la respiración celular, que da lugar a este tipo de especies reactivas. Hay más especies reactivas de oxígeno, aparte de las ya mencionadas, como pueden ser el radical hidroxilo, extremadamente reactivo y el radical peroxilo, formado por la adición de una molécula de oxígeno a un radical de carbono.

La acción de estas especies reactivas provoca daños a nivel molecular, atacando a los ácidos grasos poliinsaturados y las proteínas e incluso al ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas oxidaciones a nivel celular pueden derivar en patologías de etiología muy variada: desde unas cataratas, a trastornos cardiovasculares como la arterioesclerosis, e incluso algunos tipos de cáncer.

En los millones de años de evolución en presencia de oxígeno, los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de defensa frente a las ROS. Se trata de compuestos y enzimas antioxidantes. Los enzimas antioxidantes catalizan la desactivación selectiva de cada una de las ROS generadas. Además existen enzimas de degradación que eliminan los componentes que las ROS han dañado. El proceso celular que permite que las estructuras y materiales dañados sean eliminados o sintetizados nuevamente, es esencial para evitar la acumulación de material inservible que podría provocar graves disfunciones. Disponemos además de compuestos antioxidantes de naturaleza no enzimática entre los que se encuentran vitaminas esenciales (vitaminas E y C), algunos carotenoides y el glutatión.

1. ESTRÉS OXIDATIVO

La producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS), entre ellas radicales libres, es un proceso natural, inevitable y constante. Todas las células, sin importar su tipo, están constantemente produciendo especies reactivas, moléculas con electrones desapareados. El daño que los radicales libres provocan en los diferentes tejidos depende del balance entre las especies reactivas del oxígeno y las defensas antioxidantes de que dispone el organismo humano.

El balance entre los agentes oxidantes y antioxidantes determinará el estado redox, estableciendo una “homeostasis redox” o estado de equilibrio de las condiciones de oxidación-reducción. El desequilibrio de este estado redox tiene consecuencias bioquímicas que alteran ciertas vías de transmisión de señales cuya consecuencia es la activación de mecanismos compensatorios para restablecer la “homeostasis redox”.

El sistema antioxidante provee al organismo de defensas contra la acción dañina de los radicales libres. Estas defensas son variadas y operan en diferentes niveles y momentos. La salud de las personas se relaciona con el adecuado balance oxidativo. Es decir, que radicales libres y antioxidantes se equilibren en modo tal que se minimice el daño y se retarde la aparición de enfermedades.

El denominado estrés oxidativo, sin embargo, ocurre en los organismos que, por mala nutrición, enfermedad u otras causas, pierden el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes. *Estrés oxidativo* se define como una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución de los sistemas de defensa, lo que resulta en una mayor concentración, en estado estacionario, de ROS. Es en esta situación de estrés oxidativo en la que se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres. Éstos reaccionan químicamente con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN del interior de las células, y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular.

Numerosas enfermedades han sido vinculadas a estrés oxidativo. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes está asociado a la fisiopatología de arterioesclerosis, cáncer, porfirias, cataratas, sobrecarga de hierro y cobre, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, diabetes, malaria, artritis, enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas y otras. Asimismo, el proceso biológico del envejecimiento se acelera en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo.

2. RADICALES LIBRES

2.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE

Para que un átomo o molécula sea estable debe tener todos sus electrones apareados. Los átomos o moléculas que poseen electrones desapareados son llamados *radicales libres*, y son muy inestables y altamente reactivos. Pueden participar en gran variedad de reacciones químicas y bioquímicas; es decir, pueden reaccionar con muchas de las moléculas que componen nuestras células y oxidarlas.

Un radical libre es una molécula o un átomo que posee un electrón desapareado. Los electrones desapareados aumentan la reactividad química de dicha molécula o átomo, que tienden a conseguir el estado más favorable energéticamente mediante el emparejamiento con otro electrón con

sentido de rotación opuesto, formando un nuevo puente entre dos átomos portadores de un electrón desapareado. Así pues, muchas reacciones radical-radical, o radical-molécula, tienen lugar tan pronto como las dos moléculas se encuentran. El tiempo que una reacción tarda en completarse depende de dos parámetros, la constante específica de la reacción, y la concentración de las especies que reaccionan. En los seres vivos, la concentración del radical libre es normalmente muy baja, y raramente adquiere valores lo suficientemente altos como para provocar una reacción radical-radical que desbanque a una reacción entre el radical y una molécula, ya que éstas están normalmente presentes a una concentración mucho mayor en su proximidad. Así pues, cualquier reacción radical-radical es menos frecuente, aunque se da, como en el caso de la reacción del óxido nítrico con el radical superóxido, pero la reacción con una molécula se ve favorecida por la mayor concentración de la molécula que va a reaccionar, en comparación con la concentración del radical (Witmer et al., 1991). La alta reactividad de los radicales libres hace que su vida media sea muy breve, del orden de milisegundos, variando según el radical del que se trate.

En los sistemas biológicos, los radicales libres son habitualmente moléculas de oxígeno o formadas en parte por éste, lo cual hace que a este grupo de radicales libres se les denomine en conjunto especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS). Existen también radicales libres nitrogenados o especies de nitrógeno reactivas (RNS) y radicales libres centrados en otras moléculas, como el azufre.

Cada una de nuestras células respira, dando como producto dióxido de carbono y agua. Para convertir el oxígeno que respiramos a agua, es necesaria una transferencia de electrones al oxígeno, y durante este proceso es normal que se produzcan radicales libres intermedios que tienen una vida muy corta y no se difunden al resto de la célula, quedando atrapados en el sitio donde se lleva a cabo la respiración hasta que ésta finaliza. El proceso ocurre como se explica a continuación (Giordano, 2005):

1. Donación de un solo electrón al oxígeno, formándose el radical superóxido (O_2^-), la carga negativa es debida a ese electrón de más.
2. Donación de un segundo electrón al radical superóxido O_2^- ya formado, generando el radical peróxido; enseguida se une un hidrógeno formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es una especie muy reactiva y tóxica para la célula.
3. La transferencia de un tercer electrón al H_2O_2 da como resultado el radical hidroxilo ($\cdot OH$), que presenta un electrón desapareado. Este radical es muy reactivo y puede reaccionar con casi todas las moléculas existentes en la naturaleza.
4. La donación de un cuarto electrón al radical hidroxilo ($\cdot OH$), genera agua (H_2O), uno de los productos de la respiración.

Como todas las células de nuestro cuerpo respiran, los pasos anteriores suceden en todos los tejidos de nuestro organismo. Además de ser producidos durante el proceso de respiración, los radicales libres también se generan por varios enzimas de nuestro cuerpo.

A altas concentraciones, los radicales libres son perjudiciales y producen alteraciones dañinas en las macromoléculas. Sin embargo, a concentraciones moderadas juegan un importante papel como reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra e intercelular.

Los radicales libres tienen efectos beneficiosos en los seres vivos, que fundamentalmente son los siguientes:

- a) desencadenan respuestas tendentes al restablecimiento del equilibrio del estado "redox" (homeostasis redox)
- b) desencadenan respuestas fisiológicas beneficiosas para el organismo
- c) participan en las cascadas de señalización que regulan distintas funciones y vías metabólicas

2.2. PRINCIPALES RADICALES LIBRES

Los radicales libres pueden producirse a través de diversos procesos químicos, tanto dentro como fuera del organismo. Una misma célula tiene potencialmente más de una fuente de producción de radicales libres. Atendiendo al origen de su producción, podemos clasificar las fuentes en exógenas y endógenas (Freeman y Crapo, 1982).

Entre las fuentes exógenas destacan los agentes antineoplásicos (Dedon y Goldberg, 1992) y algunos antibióticos (Doroshov y Hochstein, 1982); radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielski y Gebieki, 1977); y factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos (Mason y Fisher, 1982).

Entre las fuentes endógenas más importantes estarían la autooxidación de pequeñas moléculas (Baccarini, 1978); enzimas solubles y proteínas que generan radicales libres durante su ciclo catalítico; la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Turrens y Boveris, 1980); los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico y membrana nuclear (Capdevila et al., 1981; Chignell, 1979; Dolphin, 1988; Foster y Estabrook, 1993); peroxisomas; y enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como lipooxigenasa y ciclooxigenasa (White, 1990).

Existen muchas clases de radicales libres, como son:

a) Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Es una especie relativamente poco reactiva, pero potencialmente tóxica, ya que puede iniciar reacciones que originen otros ROS que a su vez sí son muy reactivos. Este anión puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris et al., 1972).

b) Radical hidroxilo ($\cdot OH$)

Es la especie más reactiva, con una vida media de alrededor del 10^{-9} segundos (Liocher y Fridovich, 1994). A nivel biológico, el proceso de formación del radical hidroxilo más importante es la reacción de Fenton. También puede formarse por la reacción de Haber-Weiss a partir de agua oxigenada y del radical superóxido.

c) Radical peroxilo ($ROO\cdot$)

Son probablemente los radicales más abundantes en los sistemas biológicos, con una vida media relativamente larga, del orden de segundos, y no son tan reactivos como otras especies de ROS. Se originan a partir de la adición del oxígeno a prácticamente cualquier radical hidrocarbonado.

d) Óxido nítrico ($\cdot NO$)

Es un gas lipofílico e hidrosoluble, de una vida media de 3 a 5 segundos. Se forma enzimáticamente a partir de la arginina. El óxido nítrico reacciona con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del ADN, y también puede producir necrosis, entre otros fenómenos.

e) Peroxinitrito (ONOO^-)

El óxido nítrico puede generar el anión peroxinitrito al reaccionar con el anión superóxido (Gryglewski et al., 1986; Miles et al., 1996). En soluciones neutras es un potente agente oxidante, capaz de oxidar grupos tioles o tioéteres, capaz de nitrar residuos de tirosina, de nitrar y oxidar guanosina, de degradar carbohidratos, de iniciar peroxidación lipídica y de fragmentar ADN (Beckman y Koppenol, 1996; Beckman et al., 1994).

f) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, pero se debe tener en cuenta por su facilidad para difundirse a través de las membranas. En los medios biológicos se forma por dos vías: tras la reducción directa del oxígeno por dos electrones o tras la dismutación del ión superóxido. Muchos enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre (Korycka-Dahi y Richardson, 1981).

g) Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno en presencia de fotoactivadores como la riboflavina (Aurand et al., 1977). Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interactuar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas.

3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Los radicales libres tienen el potencial de reaccionar con una variedad de especies químicas, ya que participan en un amplio rango de funciones biológicas en la señalización celular y en la enzimología; actúan sobre una serie de macromoléculas, tales como glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Una sustancia *antioxidante* es aquella, que a concentraciones relativamente bajas, es capaz de competir con otros sustratos oxidables y, por tanto, retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Halliwell y Gutteridge, 1989). Existen también sustancias que tienen poca actividad específica antioxidante, pero que, a altas concentraciones, contribuyen significativamente al potencial antioxidante de una célula o sistema. Ejemplos de este caso son los aminoácidos, péptidos y proteínas.

La mayoría de los radicales libres producidos *in vivo* son oxidantes, capaces de oxidar una gama de moléculas biológicas, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. Como es imposible prevenir la producción *in vivo* de todos los radicales libres, no es sorprendente que se hayan desarrollado en el cuerpo una cantidad de defensas antioxidantes, de hecho están presentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Los enzimas antioxidantes son superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa y tioredoxina, mientras que los principales antioxidantes no enzimáticos incluyen el glutatión (GSH), las vitaminas C y E, el ácido α -lipoico, los carotenoides y la ubiquinona (ver tabla 1.1).

Antioxidantes enzimáticos	Ubicación celular	Propiedades antioxidantes	Referencias
Mn superóxido dismutasa Cu-Zn superóxido dismutasa GSH peroxidasa	Mitocondria Citosol Citosol y mitocondria	Dismuta radicales peróxido Dismuta radicales superóxido Reduce H ₂ O ₂ a agua e hidropéroxidos orgánicos a alcohol	Halliwell y Gutteridge, 1989
Catalasa	Citosol y mitocondria	Descompone H ₂ O ₂ en agua y oxígeno	
Tioredoxina	Citosol	Sistema compuesto por tres proteínas: tioredoxina (reducción de puentes disulfuro); tioredoxina reductasa (regeneración del ascorbato); y tioredoxina peroxidasa (transforma H ₂ O ₂ y alquilhidperóxidos en agua y alcohol)	Sen, 1998; May et al., 1997; Netto et al., 1996
Antioxidantes no enzimáticos			
Vitamina E	Compuestos fenólicos solubles en lípidos; localizada en membranas	Principal antioxidante que disrumpe la cadena de peroxidación lipídica. Neutraliza los radicales superóxido, hidroxilo y lipoperoxilo a formas menos reactivas	Burton y Traber, 1990; Packer et al., 1979
Vitamina C (ácido ascórbico)	Soluble en agua; localizada en citosol	Neutraliza una amplia variedad de ROS en fase acuosa; regenera vitamina E	Packer et al., 1979; Sevanian et al., 1985
GSH	Citosol y mitocondria	Interactúa con una amplia gama de radicales libres cediendo un protón. Elimina H ₂ O ₂ y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por GPX. Reduce varios antioxidantes celulares (vitaminas E y C). Contribuye al mantenimiento del estado redox celular	Yu, 1994; Niki et al., 1995; Dröge, 2002; Ernest y Kim, 1973
Ácido α -lipoico	Tiol endógeno; localizado tanto en la fase acuosa como en la lipídica	Interviene en el reciclado de vitamina C; puede ser buen sustituto de GSH	Packer, 1994
Ubiquinonas	Derivados de quinona soluble en lípidos; localizadas en membrana	Las formas reducidas son antioxidantes eficientes	
Carotenoides	Soluble en lípidos; localizados principalmente en membranas	Neutralizan diversos ROS, incluido el radical superóxido y radicales peroxilo. Reducen la peroxidación lipídica	Briviba y Sies, 1994; Krinsky, 1994; Krinsky y Denecke, 1982; Yu, 1994

Tabla 1.1 (Powers y Lennon, 1999): Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Durante los últimos treinta años los investigadores han explorado el papel de los antioxidantes en la salud, así como en el tratamiento y prevención de enfermedades que involucran el ataque oxidativo de radicales libres, generando una nueva rama de la medicina: Biología de los radicales libres. El uso extendido de antioxidantes bien conocidos como vitaminas C y E y selenio neutraliza los radicales libres. Esto ocurre de manera natural en el medio, pero no en el cuerpo. Estos antioxidantes deben formar parte de una dieta equilibrada.

Dada la importancia de los antioxidantes en una buena salud, no es sorprendente que el cuerpo fabrique sus propios antioxidantes. El más importante de estos es el glutatión. El hecho de que otros antioxidantes dependan de la presencia de glutatión para su funcionamiento correcto, ha llevado a los científicos a considerar al glutatión como el antioxidante principal. La actividad del sistema inmune también depende de la disponibilidad de glutatión.

El GSH tiene una importante función antioxidante. Interactúa fácilmente con una amplia gama de radicales libres cediendo un protón (Yu, 1994). Una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es la eliminación de agua oxigenada y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por GPX, en la que dos moléculas de GSH donan dos átomos de hidrógeno para dar lugar a glutatión oxidado (GSSG), el cual posteriormente es reducido por la GR para restaurar el GSH. La concentración de GSSG en la célula se mantiene a niveles muy bajos. El GSH está implicado también en la reducción de varios antioxidantes celulares, como por ejemplo el radical vitamina E y el radical semideshidroascorbato de la vitamina C (Niki et al, 1995).

El GSH contribuye al mantenimiento del estado redox celular, al cual son sensibles las proteínas. Éstas cambian su función y conformación ante cambios en el estado redox, siendo más susceptibles de degradación cuando éste es más oxidante (Dröge, 2002). Por tanto, y debido al cambio de conformación que pueden sufrir algunas proteínas enzimáticas que alteran su función, el GSH, en la medida en que mantiene los tioles proteicos de aquéllas, permite mantener la conformación y regular la actividad enzimática de enzimas metabólicas importantes, evitando la formación de disulfuros mixtos y puentes disulfuro. Un ejemplo es el enzima glucógeno sintetasa D, el cual es inactivado por el GSSG y reactivado por el GSH (Ernest y Kim, 1973).

4. IMPORTANCIA DEL GLUTATIÓN

Rey-Pailhade descubrió en 1888 que existía un compuesto que reaccionaba espontáneamente con el azufre y lo denominó *philothion* (de las palabras griegas para amor y azufre). Más tarde se descubrió que la propia molécula contenía azufre y el término **glutatión** fue propuesta por Hopkins.

La estructura del glutatión fue establecida por Hopkins en 1921 (Hopkins, 1921) y desde entonces se han realizado numerosas investigaciones con respecto a la producción y uso de este compuesto. Hay un interés creciente en el papel del glutatión reducido (GSH) y compuestos relacionados (glutatión oxidado y unido a proteínas) en cultivos de células animales y humanas (Udeh y Achremowicz, 1997). La importancia de estos compuestos 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 et al., 1993; Lomaestro y Malone, 1995).

Este tripéptido (γ -L-glutamil-L-cisteil-glicina), a través del grupo tiol de la cisteína, actúa como un tampón redox en la protección contra agentes oxidativos, radicales libres de oxígeno y compuestos tóxicos (Santiago y Mori, 1993; Udeh y Achremowicz, 1994). Se ha visto que es de gran importancia en la protección contra la isquemia en varios tejidos y en el tratamiento de nefropatía y neuropatía (Hunjan y Evered, 1985; Hamers et al., 1993).

El glutatión se une a toxinas tales como metales pesados, solventes y pesticidas, y los transforma de forma que puedan ser excretados en orina y bilis. También es un importante antioxidante y se ha asociado el consumo de glutatión a partir de frutas y vegetales, con la protección contra algunos tipos de cáncer (Sen, 1997; Flagg et al., 1994), esto se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* (Donnerstag et al., 1996) como en estudios *in vivo* (Trickler et al., 1993).

Los suplementos de glutatión se absorben eficazmente en ratas (Hagen et al., 1990; Favilli et al., 1997) pero no en humanos (Witschi et al., 1992), esto parece deberse a la significativa presencia de

gamma-glutamil transpeptidasa en el tracto gastrointestinal humano que degrada el glutatión (Valencia et al., 2001; Valencia y Hardy, 2002).

Diversas investigaciones utilizando glutatión intravenoso o intramuscular han demostrado que es útil para prevenir la formación de trombos en las intervenciones quirúrgicas (Molloy et al., 1998), reducir los efectos secundarios e incrementar la eficacia de drogas quimioterapéuticas (Smyth et al., 1997), tratar la enfermedad de Parkinson (Sechi et al., 1996), reducir la presión sanguínea cuando ésta es elevada en personas diabéticas (Ceriello et al., 1991) e incrementar los contajes de esperma en hombres con bajos contajes (Lenzi et al., 1994; Lenzi et al., 1993). Un spray nasal de glutatión también reduce los síntomas en personas con rinitis crónica (Testa et al., 1995).

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 et al., 1995).

La deficiencia de glutatión en el organismo puede deberse a enfermedades que aumentan la necesidad de glutatión, deficiencia de los aminoácidos necesarios para su síntesis, o a enfermedades que inhiben la formación de glutatión (White et al., 1994). El déficit de glutatión está relacionado con algunos estados de salud tales como diabetes, bajos contajes de esperma, enfermedades del hígado, cataratas, sida, enfermedades respiratorias, cáncer, inflamaciones gastrointestinales y pancreáticas, enfermedades neurodegenerativas y con el envejecimiento (Wu et al., 2004). El fumar también se relaciona con niveles bajos de glutatión, ya que aumenta su utilización.

Aunque el glutatión está involucrado en muchos procesos fisiológicos, las principales y más relevantes funciones del GSH en los organismos eucariotas se pueden resumir en (Pastore et al., 2003):

1. Antioxidante
2. Estimulante del sistema inmune
3. Desintoxicación

En primer lugar, la elevada capacidad de donación de electrones del GSH y su relativamente elevada concentración intracelular (niveles milimolares) permite mantener un ambiente celular reductor; esto hace que sea un antioxidante importante en la protección del ADN, proteínas y otras biomoléculas contra el daño oxidativo generado, por ejemplo, por especies reactivas de oxígeno. En segundo lugar, desempeña una importante función en el sistema inmune mediante la producción de glóbulos blancos, y además es uno de los agentes antivirales conocidos más potente. Por último, la desintoxicación de xenobióticos o sus metabolitos es una de las principales funciones del GSH. Estos compuestos electrófilos se conjugan con el GSH, tanto de manera espontánea como catalizada por el enzima glutatión S-transferasa (GST), dando lugar a mercapturatos que serán posteriormente eliminados. Por todas estas razones, el GSH se considera como la más potente, versátil e importante de las moléculas de defensa generadas por la propia célula (Li et al., 2004).

Debido a sus numerosas e importantes funciones, hay un interés creciente en la obtención de glutatión mediante síntesis enzimática o procesos microbianos. Se usa como compuesto farmacéutico y tiene el potencial de ser usado como aditivo alimentario y en la industria cosmética (Sies, 1999), dado que el coste puede ser minimizado mediante optimización del proceso de producción.

4.1. BIOSÍNTESIS DEL GLUTATIÓN

El GSH, que es el antioxidante intracelular más concentrado, está presente en la mayoría de células, desde procariontas hasta eucariotas, en concentraciones elevadas, de hasta 10mM. Intracelularmente, el enzima glutatión reductasa se encarga de mantener el glutatión en su forma reducida; este enzima requiere de NADPH. El glutatión tiene numerosas funciones en el metabolismo, transporte, catálisis (como coenzima) y mantenimiento de los grupos tiol de proteínas y de la forma reducida de otras moléculas como cisteína, coenzima A, y antioxidantes como el ácido ascórbico.

También se usa en la formación de ácidos desoxirribonucleicos y participa de forma no enzimática y enzimática (a través de GSH-S-transferasas) en la protección contra compuestos tóxicos. Quizás una de sus funciones más importantes sea la protección contra el daño oxidativo causado por radicales libres (ROS), muchos de los cuales se originan del propio metabolismo. El GSH actúa de forma no enzimática con los radicales libres y el enzima glutatión peroxidasa cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos (Anderson, 1997).

El glutatión está presente principalmente en forma reducida (GSH). En células sanas la forma oxidada (GSSG), raramente supera el 10% del glutatión total. El estado del glutatión intracelular es un indicador del estado de la célula. Su ausencia puede provocar el suicidio de la célula mediante un proceso llamado apoptosis.

Se sintetiza a nivel intracelular por la acción consecutiva de (1) γ -glutamylcisteína sintetasa, gGCS y (2) GSH sintetasa, GS, dos enzimas del citosol:

- (1) L-Glutamato + L-cisteína + ATP \leftrightarrow L- γ -glutamyl-L-cisteína + ADP + Pi
- (2) L- γ -glutamyl-L-cisteína + Glicina + ATP \leftrightarrow GSH + ADP + Pi

El esquema general del metabolismo del GSH se puede ver en la figura 1.1, donde también se muestran las rutas de obtención de cada uno de sus aminoácidos constituyentes.

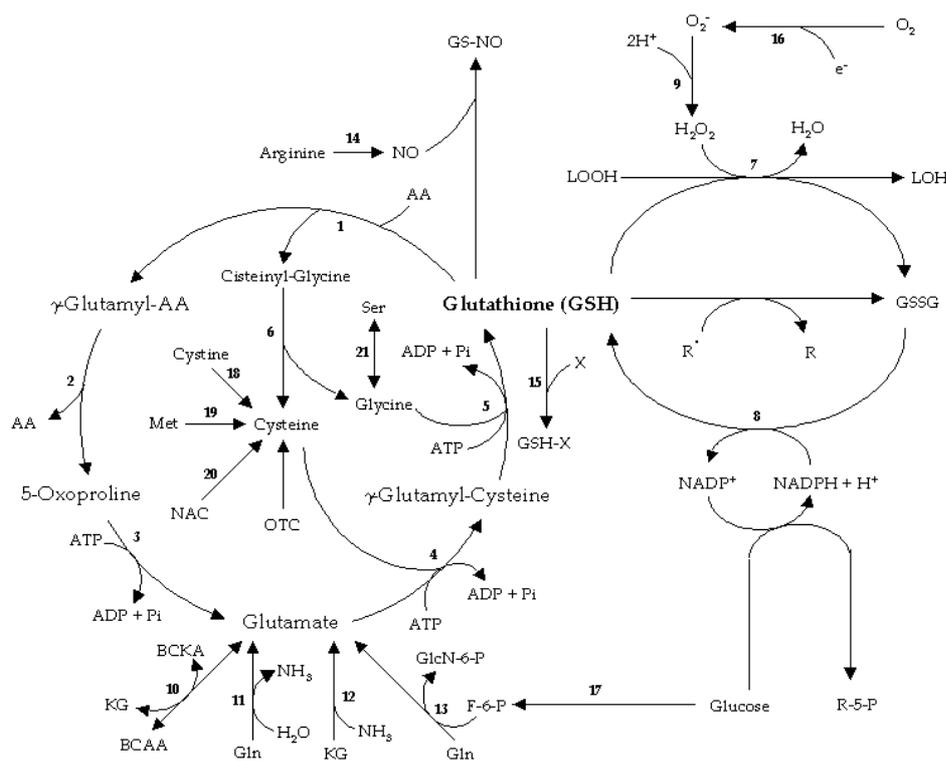


Figura 1.1 (Wu et al., 2004): Glutathione synthesis and utilization in animals. Enzymes that catalyze the indicated reactions are: 1) γ -glutamyl transpeptidase, 2) γ -glutamyl cyclotransferase, 3) 5-oxoprolinase, 4) γ -glutamylcysteine synthetase, 5) glutathione synthetase, 6) dipeptidase, 7) glutathione peroxidase, 8) glutathione reductase, 9) superoxide dismutase, 10) BCAA transaminase (cytosolic and mitochondrial), 11) glutaminase, 12) glutamate dehydrogenase, 13) glutamine:fructose-6-phosphate transaminase (cytosolic), 14) nitric oxide synthase, 15) glutathione-S-transferase, 16) NAD(P)H oxidase and mitochondrial respiratory complexes, 17) glycolysis, 18) glutathione-dependent thioldisulfide or thioltransferase or nonenzymatic reaction, 19) transsulfuration pathway, 20) deacylase, and 21) serine hydroxymethyltransferase. Abbreviations: AA, amino acids; BCKA, branched-chain α -ketoacids; GlcN-6-P, glucosamine-6-phosphate; GS-NO, glutathione-nitric oxide adduct; KG, α -ketoglutarate; LOO, lipid peroxy radical; LOOH, lipid hydroperoxide; NAC, N-acetylcysteine; OTC, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate; R, radicals; R, nonradicals; R-5-P, ribulose-5-phosphate; X, electrophilic xenobiotics

La síntesis de GSH está regulada al menos por 3 factores: **(1)** el nivel de gGCS presente en la célula; **(2)** la disponibilidad de sustratos; **(3)** inhibición retroalimentaria de GSH sobre gGCS (Griffith y Mulcahy, 1999). Los niveles intracelulares de aminoácidos varían entre especies, tejidos y dependiendo del nivel nutricional, sin embargo los niveles de L-cisteína son significativamente menores que los de L-glutamato o glicina (Griffith y Mulcahy, 1999). Tateishi et al. (1974) concluyen que la disponibilidad de L-cisteína es el factor que limita principalmente la síntesis de GSH. La síntesis de GSH requiere de ATP, y este sustrato también puede llegar a ser limitante. Suzuki y Kurata (1992) demostraron que la síntesis de GSH en eritrocitos depende del nivel de ATP.

Los niveles de glutatión están controlados homeostáticamente, siendo continuamente reajustados con respecto al balance entre la síntesis de GSH (por gGCS y GS), su obtención a partir de GSSG (por GSH reductasa) y su utilización (por peroxidases, transferasas, transhidrogenasas, y transpeptidasas). La degradación de GSH está catalizada por γ -glutamyltranspeptidasa. La mayoría de aminoácidos participan en las reacciones de transpeptidación.

4.2. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE GLUTATIÓN

Las funciones fisiológicas del GSH en humanos y tejidos animales, en plantas y en células microbianas han sido descritas y estudiadas de manera extensa (Carmel-Harel y Storz, 2000; Penninckx y Elskens, 1993; Penninckx, 2000; Penninckx, 2002), pero escasean los estudios sobre la producción biotecnológica de este tripéptido. Una de las razones puede ser que mucha de las investigaciones sobre producción de GSH están patentadas, debido al gran interés económico.

Hace setenta años se demostró que el GSH podía ser sintetizado por un método químico (Harington y Mead, 1935). Aunque este proceso se comercializó en los años 50, el glutatión sintetizado químicamente era una mezcla ópticamente inactiva de los isómeros D- y L-. Como sólo el isómero L- es fisiológicamente activo, se necesitaba de una resolución óptica para separar la forma activa L- del isómero D-.

La observación de la biosíntesis del GSH en un hígado aislado y la caracterización de su ruta de síntesis (Bloch, 1949), dio lugar a que se empezaran a desarrollar estudios sobre la producción enzimática y fermentativa de GSH. En la tabla 1.2 se resume el desarrollo de la producción biotecnológica del GSH. Las investigaciones sobre la producción enzimática y fermentativa tuvieron gran auge en Japón entre 1976 y 1985; la producción fermentativa de GSH con levaduras se comercializó a principios de 1980. Desde entonces, el número de patentes sobre producción de GSH comenzó a disminuir. Hasta la fecha, la producción enzimática de GSH no ha sido comercializada debido al elevado coste de producción (Li et al., 2004).

Investigaciones relacionadas con la producción de GSH	Periodo
Crecimiento de levaduras (fundamentalmente <i>S. cerevisiae</i> y <i>Candida utilis</i>) para la producción de glutatión, utilizando métodos fermentativos o enzimáticos	1976-1985 1998-presente
Purificación de glutatión de sistemas biológicos	1976-1987 1993-1998
Selección de bacterias para la producción de glutatión por métodos enzimáticos	1978-1991
Construcción de sistemas regeneradores de ATP	1978-1982
Aplicación de la biología molecular para la biosíntesis de GSH en <i>E. coli</i> y construcción de <i>E. coli</i> recombinante para producir GSH	1982-1990
Construcción de <i>S. cerevisiae</i> recombinante para producir GSH	1986-1990 1996-1998
Optimización y control del proceso de producción de glutatión	1991-1994 1997-presente
Producción de glutatión por bacterias ácido lácticas	2001-presente

Tabla 1.2 (Li et al., 2004): Desarrollo de la producción biotecnológica de GSH

4.2.1. Síntesis enzimática de Glutación

Una de las formas bien estudiadas de producción de glutación es mediante el método enzimático. En principio, los elementos esenciales que constituyen el sistema de síntesis enzimática son: gGCS, GS, aminoácidos precursores (L-glutamato, L-cisteína, glicina), ATP, cofactores (Mg^{2+}) para mantener las actividades de gGCS y GS, y un pH apropiado (normalmente de 7.5). En la tabla 1.3 se muestran distintos métodos de síntesis enzimática de GSH utilizando células intactas o extractos de enzimas. Se puede concluir de la tabla que la adición de ATP no es necesaria si se utiliza *S. cerevisiae*, pero sí es necesaria si se utilizan procariotas o enzimas purificadas. Esto es debido a que en *S. cerevisiae* la fuerte capacidad de la glucólisis para regenerar ATP compensa el consumo de ATP que se produzca. Cuando se utilizan células intactas se puede incrementar la producción enzimática cuando se aumenta la permeabilidad de la pared celular (mediante congelación o tratamiento con surfactantes o enzimas).

La necesidad de ATP en la producción enzimática de GSH hace que este proceso sea difícilmente escalable, puesto que no es económicamente viable la adición de ATP a escala industrial (Li et al, 2004). Sería de gran interés industrial la construcción de un sistema de regeneración eficiente de ATP, que se puede definir como un sistema en donde las reacciones que requieren ATP se emparejan con reacciones que producen ATP. Los sistemas de regeneración de ATP se pueden dividir en sistemas que trabajen con un solo organismo o en sistemas que trabajen con dos o más organismos.

Los sistemas de regeneración de ATP con un solo organismo no han sido muy estudiados porque es muy difícil incrementar simultáneamente las actividades tanto de biosíntesis de GSH como de regeneración de ATP en un solo microorganismo (Shimosaka et al., 1982). Los sistemas que trabajen con dos o más organismos son la única forma viable de regeneración de ATP. La reacción catalizada por acetato quinasa en *E. coli* se estudió como un sistema de regeneración de ATP que podría unirse a las reacciones de biosíntesis de GSH, para la producción favorable de glutación (Langer et al., 1976). Sin embargo el sustrato acetil fosfato necesario para este estudio era inestable y caro. Murata et al. (1981) consideraron que la ruta glucolítica de *S. cerevisiae* era el sistema más capaz y más simple para regenerar suficiente ATP para la biosíntesis de GSH. Cuando la disponibilidad económica de ATP dejó de ser un problema, la baja actividad de gGCS y GS se hicieron los factores limitantes. 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.

4.2.2. Síntesis microbiana de Glutación

Gran parte de levaduras y de bacterias gram positivas pueden acumular glutación a nivel intracelular. Se ha estudiado la producción de GSH en células animales (Meister, 1988), en bacterias (Nakayama et al., 1984; Ohwada y Sagisaka, 1990) y en levaduras (Shimizu et al., 1991; Alfafara et al., 1992a; Alfafara et al., 1992b). También se emplean técnicas genéticas para dar lugar a cepas con alto contenido en GSH (Murata y Kimura, 1982; Murata et al., 1983).

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 (Greenberg y Demple, 1986; Apontoweil y Berends, 1975). Sorprendentemente, estos mutantes no vieron afectada su resistencia a compuestos que causan daño oxidativo y además eran capaces de inducir una respuesta adaptativa al peróxido de hidrógeno y shock térmico (Greenberg y Demple, 1986). Estos resultados se contraponen con lo que ocurre en células mamíferas, donde la deficiencia en GSH provoca daño celular (Jain et al., 1991; Martensson et al., 1991). Por tanto, las necesidades de GSH son distintas entre eucariotas y procariotas. Grant et al. (1996) vieron que en oposición a lo que ocurre en bacterias, el GSH es un reductor esencial en los procesos metabólicos normales de las levaduras.

GSH biosynthesis	ATP regeneration	ATP supply	T (°C)	pH	t (h)	GSH (mg/L)	Yield on Cys (%)	Reference
<i>C. krusei</i> IFO 0011		Not necessary	37	6.0	16	350	1.4	Yokozeaki et al. (1985)
<i>S. cerevisiae</i> IFO 0021 (treated by sodium dodecyl sulfate and β -1,3-glucanase)		Glycolisis (glucose)	37	7.3	15	9060	98.4	Miwa (1978)
<i>S. cerevisiae</i> 500 (immobilized crude enzymes of gGCS, GS)	Immobilized carbamyl-phosphokinase from <i>Streptococcus faecalis</i> R 600	ATP	35	7.3	5	325	58.6	Miwa (1976)
<i>S. cerevisiae</i> (immobilized gGCS, GS)		ATP	30	7.5	-	2517	82	Miyamoto and Miwa (1977)
<i>E. coli</i> (treated with surfactant, xylene)		ATP	37	7.4	6	2714	58.9	Kyowa Hakko Kogyo Co. (1985)
<i>E. coli</i> B ATCC 23226 (crude enzymes of gGCS, GS)	Acetate kinase prepared from <i>E. coli</i> B ATCC 23226	Dextran-N-[(6-amino-hexyl)-carbamoylmethyl], ATP	37	7.0	3	46.3	3.0	Chibata et al. (1979)
<i>Proteus mirabilis</i> (cell-free extract)	Dried yeast	ATP, glucose	37	8.5	2	1320	61.4	Ajinamoto Co. (1984)
<i>Phormidium lapideum</i> (2500 1x)	Light used as an external energy source	ATP	47	7.5	12	1.5 mg/g wet cell	-	Sawa et al. (1986)

Table 1.3 (Li et al., 2004): An overview of the literature on the enzymatic production of glutathione by microorganisms. Enzymatic production of glutathione uses a reaction mixture containing L-glutamic acid, L-cysteine, and glycine

Se ha investigado mucho en la producción fermentativa de GSH utilizando azúcares como sustratos y, hoy en día es el principal método comercial que se utiliza. *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* son los microorganismos que se emplean normalmente a escala industrial y los contenidos intracelulares de las cepas salvajes suelen ser altos (0.1-1% del peso seco celular).

La manipulación genética de microorganismos y células permite modificar el genoma con el objetivo de proporcionar nuevas características. Esta modificación puede conseguirse de tres formas: (1) por los métodos clásicos de mutación y selección, (2) a través de la recombinación genética, y (3) por medio de los métodos de recombinación *in vitro*, clonación de genes o tecnología del ADN recombinante (Alvero, 1998). En la tabla 1.4 se muestran avances de ingeniería genética en la producción de GSH. Se puede conseguir un incremento de GSH del 3-5% con estos mutantes. Un valor bastante elevado de GSH de 9.5% se consiguió con una cepa de *S. cerevisiae* (Ishii y Miyajima, 1989). Estudios realizados sobre las propiedades de los enzimas gamma-glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa muestran que estos enzimas son inhibidos de manera retroalimentaria por GSH y GSSG respectivamente (Murata y Kimura, 1990) y que el enzima gGCS es el limitante en la biosíntesis de GSH; además, la presencia de gGT degrada al GSH sintetizado.

Host strain	Cloning strategy	GSH in mutant	GSH in wild type	Increment (x-fold)	Reference
<i>S. cerevisiae</i>	A strong promoter, P8 from <i>S. cerevisiae</i> YNN27, was used to replace the promoter of gGCS, resulting in plasmid pGRS2518-x	24 mg/g	3mg/g	7	Tezuka et al. (1987)
<i>E. coli</i>	HindIII digested chromosomal DNA of <i>E. coli</i> was inserted into pBR322 and transformed into GSH-deficient <i>E. coli</i> to select positive clones	7.9 μ mol/g (2.42 mg/g)	1.3 μ mol/g (0.55 mg/g)	3.4	Kimura and Murata (1983)
<i>E. coli</i>	DNA fragment containing the structural and promoter region of <i>gshB</i> (encoding GS) was cloned in single, double, and triple copies into pBR325	-	-	Little improved	Watanabe et al. (1986)
<i>E. coli</i> (a)	A recombinant bacteriophage containing two copies of <i>gshA</i> and one copy of <i>gshB</i> of <i>E. coli</i> was constructed to transfect <i>E. coli</i>	7.9 μ mol/(g proteína · h)	<0.1 μ mol/(mg proteína h)	78	Matsuyama et al. (1989)
<i>S. cerevisiae</i>	Oxidative stress-resistance genes from a peroxide-resistant <i>S. cerevisiae</i> were cloned and transformed into <i>S. cerevisiae</i> SHY2	-	-	2.5	Kimura et al. (1996)
<i>S. cerevisiae</i>	Single point mutations in the transcriptional activator of <i>MET</i> gene, [Pro ²¹⁵] <i>Met4</i> , [Ser ¹⁵⁶] <i>Met4</i> , resulted in an enhanced transcription of <i>MET</i> genes	-	-	-	Omura et al. (1998)
<i>L. lactis</i>	<i>gshA</i> and <i>gshB</i> genes, encoding gGCS and GS, respectively, were amplified from <i>E. coli</i> TG1 chromosomal DNA and inserted into pNZ8148 to generate pNZ3203	358 nmol/g proteína (55mg/g)	Cannot produce	-	Li et al. (2004)
<i>S. cerevisiae</i>	A recombinant plasmid, pGMF, containing a γ -glutamylcysteine synthetase gene (<i>GSH1</i>) from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , was constructed with a copper-resistance gene as the selection marker and was introduced into <i>S. cerevisiae</i> YSF-31	13.1 mg/g	8.7 mg/g	1.5	Fan et al. (2004)

(a) Production of glutathione was performed in a reaction mixture containing precursor amino acids, ATP and acetyl phosphate

Tabla 1.4 (Li et al., 2004): Production of glutathione by recombinant microorganisms

Saccharomyces cerevisiae y *Candida utilis* se han escogido como diana para procesos de mutagénesis física o química. El mecanismo de selección en la mayoría de los casos era evitar o disminuir la inhibición retroalimentaria del glutatión sobre gGCS. De la tabla 1.5 se puede apreciar la eficacia de las diferentes estrategias de selección.

Strain	Phenotype	Carbon source	Nitrogen source	Special nutrient	T(°C)	t(h)	GSH ^a (%)	GSH (mg/L)	Extraction	Recovery rate	Scale	Reference
<i>C. tropicalis</i> FERM-P 3368	Wild type	3% glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄	Nicotinamide	30	24	-	550	-	-	Flask	Tanno et al. (1979)
<i>C. utilis</i> IFO1086	Wild type	3% glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Yeast extract, corn steep liquor, L-	30	20	2.2	250	Water (95°C), Cu ²⁺ -H ₂ S	70	20 L	Tanno et al. (1976)
<i>C. utilis</i> n74-8	Ethionine ^s	3% glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Yeast extract	30	15	3.0	450	H ₂ SO ₄ , Cu ²⁺ -H ₂ S	74.6	70 L	Ikeno et al. (1977)
<i>C. utilis</i> FERM-P 6907	Ethionine ^s , sulfite ^r	3% glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄		30	24	4.5	680	H ₂ SO ₄ , Cu ₂ O-H ₂ S	70	200 L	Kohjin Co. (1984)
<i>S. cerevisiae</i> TRZ-6	1,2,4-triazole ^r , NaN ₃ ^r	6% molasses	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄	Corn steep liquor	30	24	3.5	860	H ₂ SO ₄ , Cu ₂ O-H ₂ S	70	2 L	Hamada et al. (1983)
<i>S. cerevisiae</i>		Glucose	Urea	Biotin	30	40	9.5	4320	-	-	125 L	Ishii y Miyajima (1989)
<i>S. cerevisiae</i> KY6186		Molasses	(NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ H ₂ PO ₄		30	60	3.7	-	-	-	120 m ³	Sakato y Tanaka (1992)
<i>S. cystinovorolens</i> FERM- P 3831	Wild type	2% corn steep liquor	(NH ₄) ₂ SO ₄		30	32	-	116	H ₂ SO ₄ (95°C)	-	Flask	Miwa y Tajima (1978)
<i>Methylomonas methanotroens</i> FERM-P 3330	Wild type	Methanol	(NH ₄) ₂ SO ₄		30	48	1.82	50	Water (90°C), chromatography	80	2.5 L	Miyamoto et al. (1978)
<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	Wild type	1% glucose	Peptone, NaNH ₄ HPO ₄	Serine, H ₃ BO ₃	31	36	-	180 (extracellular)	Chromatograph y	61	2 L	Ajinomoto Co. (1983)
<i>S. cerevisiae</i>		Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄		30	7.6	-	100	-	-	3 L	Alfajara et al. (1993)

Tabla 1.5 (Li et al., 2004): An overview of literature on the fermentative production of glutathione by microorganisms. T temperature, t culture time, superscript r resistant, superscript s sensitive, superscript a intracellular GSH content, shown as the mass percentage of GSH in the total dry cell weight (%)

El objetivo final de la producción biotecnológica de GSH es conseguir una elevada concentración de GSH por el aumento del contenido intracelular de GSH y la densidad celular. Mientras que el contenido intracelular de GSH se puede mejorar de manera significativa mediante mutagénesis, la mejora en la concentración de biomasa se puede conseguir mediante la optimización y control del proceso. Si la estrategia de control es adecuada también se puede incrementar la producción específica de GSH.

La selección y concentración de nutrientes del medio de cultivo puede ser optimizada. Se han utilizado diversos diseños para analizar el efecto de determinados nutrientes en la síntesis de biomasa y contenido intracelular de GSH en *S. cerevisiae* (Udeh y Achremowicz, 1997; Liu et al., 1999).

Uno de los métodos más efectivos para conseguir una elevada densidad celular en cultivos de levadura es el cultivo fed-batch; sin embargo, la velocidad específica de crecimiento durante el cultivo se debe controlar cuidadosamente para evitar un descenso en el contenido intracelular de GSH. Hay autores que han desarrollado un perfil de μ que permite maximizar la producción de GSH (Shimizu et al., 1991). También se han desarrollado procesos para maximizar la producción de GSH mediante el control de la concentración de etanol (Alfafara et al., 1993; Sakato y Tanaka, 1992). Todos estos métodos permiten incrementar la producción total de GSH en un 50% con respecto al control.

La adición de aminoácidos precursores de GSH es un método que permite incrementar la producción de GSH. El problema del aminoácido L-cisteína es que presenta inhibición en la segunda fase de crecimiento (Alfafara et al., 1992b); por tanto es necesario desarrollar una adecuada estrategia de adición de cisteína para incrementar la producción de GSH sin causar inhibición en el crecimiento. Se han realizado estudios de adición de cisteína en *S. cerevisiae* (Alfafara et al., 1992a) y en *E. coli* recombinante (Li et al., 1998).

En conclusión, el glutatión se produce satisfactoriamente a escala industrial con métodos de fermentación. Las aplicaciones del GSH están aumentando en paralelo al descubrimiento de nuevas funciones de este tripéptido bioactivo. Con el diseño y descubrimiento de nuevos productores de GSH, o la desregulación de la biosíntesis en los productores conocidos, el enfoque biotecnológico ofrece muchas oportunidades para disminuir el coste de producción, lo que a su vez incrementará las aplicaciones y la utilización de GSH.

Hay muchas fuentes de GSH, pero de todas ellas la alternativa de la levadura es especialmente aconsejable, no sólo debido a su facilidad de manipulación sino también al bajo coste operacional con respecto a otras fuentes y se trata de un microorganismo GRASS (generalmente reconocido como seguro). Para llevar a cabo el estudio planteado en este trabajo se elige la cepa *Saccharomyces cerevisiae* y por eso vamos a desarrollar las características más relevantes de este microorganismo.

5. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son hongos unicelulares que se han utilizado durante siglos para la obtención de productos como el vino, la cerveza o el pan. Todas metabolizan azúcares como la glucosa, fructosa y manosa, pero algunas son capaces de hacerlo en condiciones anaerobias, con la producción de alcohol y anhídrido carbónico, en el proceso conocido como fermentación. 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. En la figura 1.2 se muestra una micrografía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*.



Figura 1.2 (Calzada et al., 2000): Micrografía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae*

Los microorganismos son sistemas que necesitan una gran cantidad de energía que se obtiene de la oxidación de compuestos orgánicos reducidos proporcionados por los nutrientes; en el curso de la oxidación se libera energía (que se acumula en forma de moléculas almacenadoras de energía, especialmente el ATP) y se producen elementos estructurales que servirán para la construcción de nuevas células (crecimiento y diferenciación).

Al proceso por el que se obtiene energía y elementos estructurales básicos a partir de nutrientes se le denomina *catabolismo* y al que utiliza la energía obtenida en el catabolismo para sintetizar nuevos componentes celulares se le denomina *anabolismo*. Ambos tipos de procesos ocurren simultáneamente y conforme se van produciendo elementos estructurales y energía en el catabolismo, estos elementos se usan para formar nuevos componentes celulares en procesos anabólicos.

La fuente de energía actúa como donador de electrones y, para que se produzca la liberación de energía, se requiere una reacción de oxidación-reducción completa; es decir, la presencia de un aceptor de electrones. Si ese aceptor es el oxígeno, el aprovechamiento de energía se realiza a través de la *fosforilación oxidativa*, en un proceso denominado *cadena respiratoria* o de transporte de electrones. En otros casos, en ausencia de aceptores externos de electrones, los organismos llevan a cabo reacciones de oxidación-reducción equilibradas internamente, que conducen a la obtención de energía a través de la *fosforilación a nivel de sustrato*. Es el proceso conocido como fermentación (Alvero, 1998).

El catabolismo de azúcares en eucariotas se realiza a través de dos rutas: la *glucólisis* (también denominada vía de Embden Meyerhof-Parnas, EMP), y la de las *hexosas monofosfato* (HMP, también denominada de las pentosas fosfato). La principal función de la glucólisis es generar energía y piruvato, mientras que la ruta de las hexosas monofosfato proporciona diferentes precursores imprescindibles para la síntesis de nucleótidos, aminoácidos aromáticos y vitaminas, además de los equivalentes de reducción en forma de $\text{NADPH}+\text{H}^+$.

En el metabolismo respiratorio, las vías de degradación de las distintas fuentes de energía convergen en la formación de ácido pirúvico. Éste es oxidado a acetato, el cual entra en el *ciclo del ácido cítrico* (también denominado de los *ácidos tricarbónicos*, TCA) siendo, a su vez, oxidado a CO_2 y H_2O . Los electrones generados en estas reacciones de oxidación, transportados en forma de $\text{NADH}+\text{H}^+$, son transferidos al aceptor externo de electrones a través de la cadena respiratoria, con la correspondiente producción de energía en forma de ATP. Pero el ciclo del ácido cítrico también tiene gran importancia para la biosíntesis: proporciona una serie de precursores para las vías de producción de aminoácidos y cofactores.

Las vías metabólicas de biosíntesis se inician a partir de doce metabolitos precursores o intermediarios básicos que, mediante el consumo de ATP, nucleótidos reducidos (NADPH+H⁺), nitrógeno y azufre, se transforman en vitaminas, NADP⁺, cofactores y en las unidades estructurales de las macromoléculas. Los doce metabolitos son: glucosa 1-P, glucosa 6-P, ribosa 5-P, eritrosa 4-P, fosfoenol piruvato, piruvato, 3-fosfoglicerato, cetoglutarato, succinil-CoA, oxalacetato, dihidroxiacetona-P y acetil-CoA. Estos doce metabolitos precursores constituyen el puente metabólico entre las reacciones de degradación y de síntesis.

A los productos metabólicos generados durante el catabolismo y el anabolismo que tiene lugar durante el crecimiento (trofofase) se les denomina *metabolitos primarios* y su producción es paralela al crecimiento celular. Por el contrario, los productos metabólicos que se acumulan cuando no hay crecimiento sino diferenciación celular (idiofase), se denominan *metabolitos secundarios*. En general, puede decirse que los metabolitos secundarios se producen después de que se han producido los primarios; aunque en ciertas condiciones (como en cultivo continuo) se pueden producir simultáneamente.

Es conveniente considerar el metabolismo como un flujo de materia reducida que puede oxidarse para la producción de energía o utilizarse para la biosíntesis de nuevos elementos estructurales. No todo el carbono presente en los nutrientes va a oxidarse completamente ya que parte se utilizará para sintetizar nueva biomasa. Por otra parte, no todo el carbono de los nutrientes se utiliza para la producción de biomasa y, por consiguiente, el rendimiento es siempre inferior a la unidad (en torno al 50% en muchos casos).

Es evidente que el complejo de vías metabólicas de cualquier célula, que incluye miles de enzimas, requiere una coordinación y un control, ajustable independientemente, para evitar el caos y conseguir la síntesis ordenada de todos los componentes celulares.

En todas las células la regulación puede ejercerse de dos formas (Alvero, 1998): ① mediante cambios en la actividad de enzimas presentes o, ② por modificación de la síntesis de estas proteínas, lo que conduce a un cambio en su concentración celular. Ambos tipos de regulación se presentan en todas las células.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestra cinco fases de crecimiento bien definidas cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: lag, logarítmica, cambio diáuxico, postdiáuxica y estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo (aún en condiciones aerobias) del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticosa (Folch-Mallol et al., 2004).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede fermentar la glucosa a etanol. En condiciones anaerobias ésta es la única manera de producir energía. En la presencia de oxígeno, tiene lugar la respiración. Sin embargo, se puede producir fermentación alcohólica incluso en condiciones aerobias (van Dijken y Scheffers, 1986) si la concentración de glucosa sobrepasa un valor límite crítico (Verduyn et al., 1984). Esto es lo que se conoce como *efecto Crabtree*.

La formación aeróbica de etanol a partir de glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* se produce de diferentes maneras en los tres tipos de técnicas de cultivo: discontinuo (batch), semicontinuo (fed-batch) y continuo (chemostat). En cultivos tipo batch, primero se consume el azúcar con la consiguiente formación de etanol seguido de una corta fase lag y consumo posterior de etanol

(Barford, 1981), esto se conoce como *crecimiento diáuxico*. La fase lag se debe a la inducción de enzimas del ciclo glicoxilato y de la gluconeogénesis que se requieren en la síntesis de compuestos C₃-C₆ a partir del C₂ del sustrato etanol (Haarasilta y Oura, 1975). Un proceso batch se caracteriza por una baja densidad máxima celular debido a la inhibición por etanol y por un bajo rendimiento en biomasa. Por esta razón se utiliza ocasionalmente en procesos industriales.

Hay diversas hipótesis sobre la naturaleza del cuello de botella que origina el metabolismo *overflow* de la glucosa. Sonnleitner y Kappeli (1986) sugieren que la capacidad respiratoria establece el límite del metabolismo aerobio. Por otro lado, van der Aar et al. (1990) notaron que la capacidad respiratoria no se limita al valor máximo observado cuando se realiza un cultivo continuo a una velocidad de dilución mayor a la crítica. Esto fue posteriormente demostrado por Verduyn et al. (1992) que observaron que la adición de ácido benzoico y de otros compuestos daba lugar a una mayor respiración. Según estos autores la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) o alguna reacción en el ciclo TCA podría restringirse dando lugar a un máximo en la velocidad de respiración.

La velocidad máxima de consumo de glucosa, q_{Smax} , en *Saccharomyces cerevisiae* no coincide con la velocidad máxima de consumo de oxígeno, q_{O2max} . El consumo máximo de oxígeno es insuficiente para completar la oxidación en el punto de consumo máximo de glucosa. Esto significa que la parte respiratoria del metabolismo actúa como cuello de botella a concentraciones de glucosa elevadas (Sonnleitner y Kappeli, 1986). El consumo de glucosa que se corresponde a q_{O2max} se llama valor crítico de consumo de glucosa, q_{Scrit} y es sólo aproximadamente 1/7 de q_{Smax} . Cuando se supera el valor q_{Scrit} las partes puramente oxidativas del metabolismo, la cadena respiratoria y en cierta medida el ciclo TCA, se están saturando, y para regenerar el exceso de NADH y FADH₂ producido en la glucólisis y en el ciclo TCA, que no pueden ser oxidados en la cadena respiratoria, parte del piruvato producido en la glucólisis se reduce a etanol (figura 1.3). Este proceso que tiene lugar cuando algo de sustrato se degrada sin intervenir la cadena respiratoria, se denomina respiro-fermentativo. El rendimiento ATP/Glucosa de este proceso es menor que en un proceso puramente respirativo, lo que explica el menor rendimiento de biomasa a partir de la glucosa.

El etanol presente en el medio sólo puede ser metabolizado por la levadura en presencia de oxígeno; es decir, la velocidad de degradación de etanol q_E se controla con el grado de consumo de oxígeno q_{O2} . Si la concentración de glucosa es lo suficientemente baja como para no superar la capacidad respiratoria, el etanol puede metabolizarse conjuntamente con la glucosa (ejemplo e de la figura 1.3).

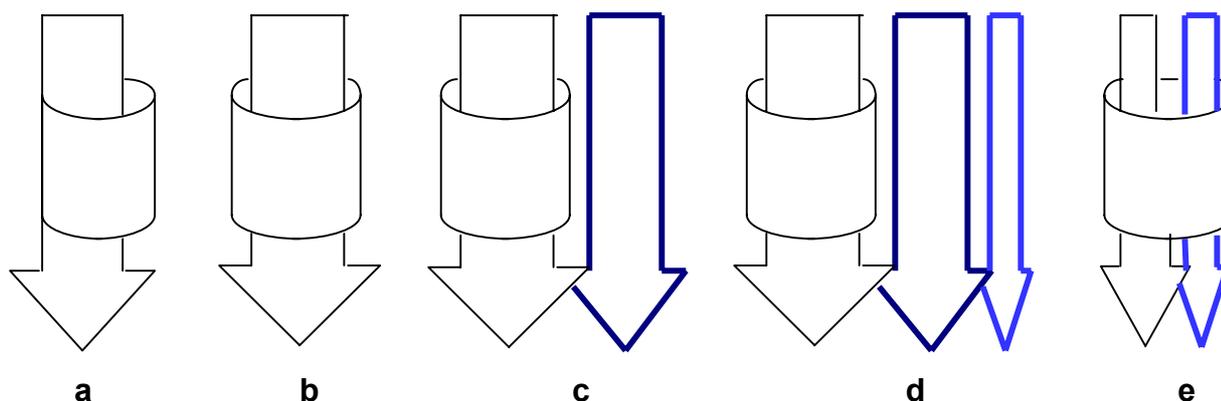


Figura 1.3: Diferentes metabolismos de una célula de levadura: a) El consumo de glucosa es lo suficientemente bajo que no causa metabolismo *overflow*, y se denomina flujo subcrítico. b) Flujo crítico, el consumo de glucosa cubre la capacidad oxidativa. c) El consumo de glucosa supera la capacidad oxidativa, lo que resulta en producción de etanol. d) El exceso de glucosa da lugar a producción de etanol y el etanol adicional que haya en el medio no se consume. e) El flujo de glucosa está por debajo del valor crítico, si hay etanol en el medio éste se metaboliza de forma oxidativa

La mayoría de modelos matemáticos de formación aerobia de etanol consideran una velocidad máxima de respiración, independientemente de la localización de la restricción metabólica. Cuando el flujo a través de la glucólisis es bajo, todos los carbonos de la glucosa se convierten en dióxido de carbono y los coenzimas reducidos resultantes se oxidan con oxígeno en la respiración con generación de ATP (figura 1.4).

Cuando a concentraciones elevadas de azúcar, el flujo a través de la glucólisis excede la capacidad de la restricción metabólica desconocida, no se produce regulación retroalimentaria del consumo de azúcar, sino que el flujo de carbono se redirige del piruvato al etanol, lo cual permite la regeneración del NAD^+ usado en la glucólisis. También se secreta algo de acetaldehído y acetato durante el metabolismo *overflow*. Si hay etanol en el medio, sólo puede consumirse con el metabolismo aerobio y es convertido a acetylCoA. Esta ruta no se produce a través del piruvato, sino a través de la ruta del acetaldehído y acetato (figura 1.4).

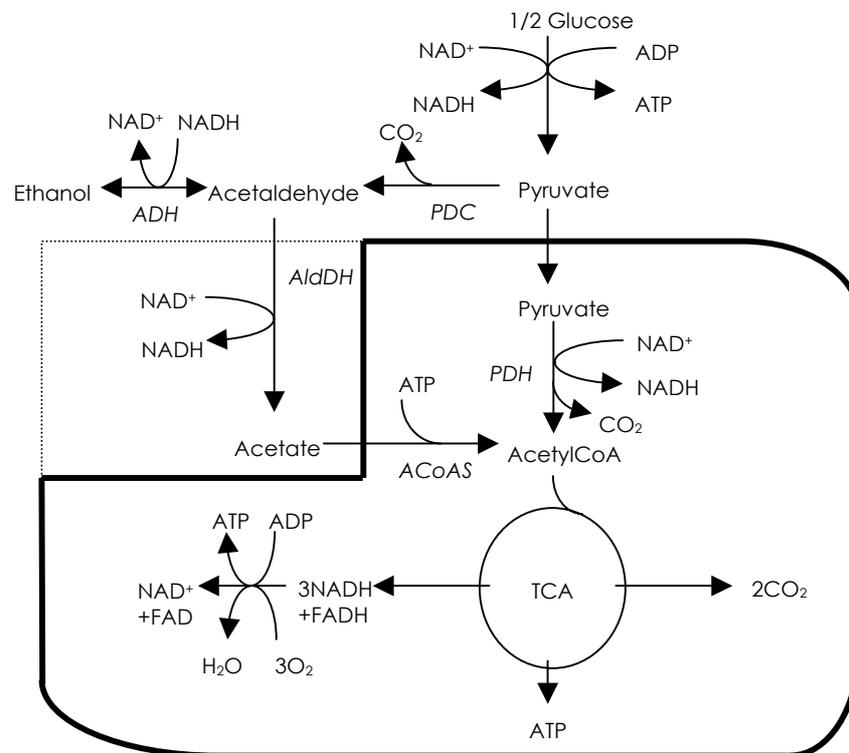


Figura 1.4 (Pham et al., 1998): Principales componentes de las rutas metabólicas energéticas de *Saccharomyces cerevisiae*. Los enzimas claves del metabolismo *overflow* son: PDH: complejo piruvato deshidrogenasa; PDC: piruvato descarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; AldDH: acetaldehído deshidrogenasa; AcoAS: acetylCoA sintetasa

5.1. RESPUESTA ADAPTATIVA DE *Saccharomyces cerevisiae* A LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante procesos industriales. El daño provocado por el estrés así como la respuesta de la levadura al mismo, dependen del tipo y grado del estrés, y del estado de desarrollo de la levadura al momento en que ocurre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrenta afectan principalmente a las estructuras

celulares (e.g. las membranas) y a diferentes macromoléculas (especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función (Hohmann y Mager, 1997).

Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, la levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. Entre las moléculas mejor caracterizadas en esta respuesta están las llamadas “proteínas de estrés”. Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales, factores de transcripción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta (Ruis y Schüller, 1995).

La levadura desarrolla mecanismos moleculares de defensa comunes bajo la acción de distintos agentes estresantes, que se conocen como la respuesta general ante el estrés (figura 1.5).

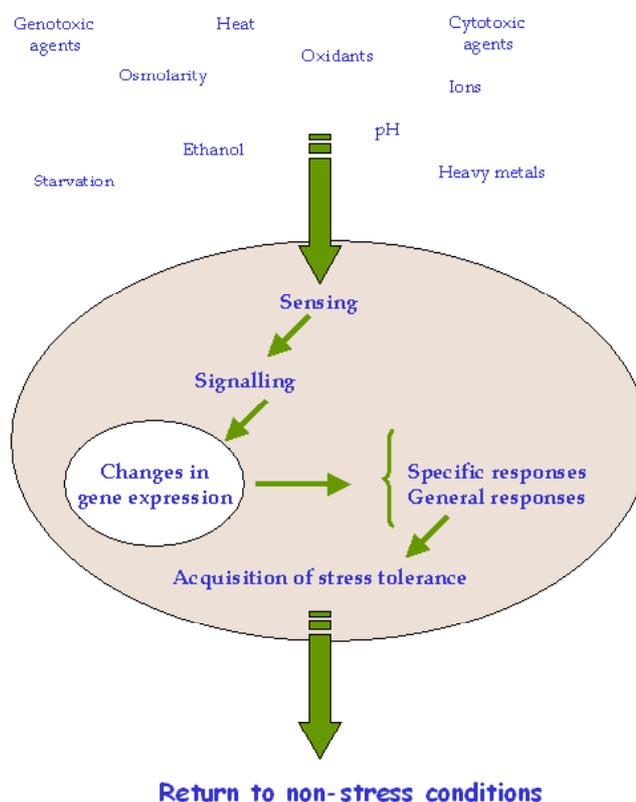


Figura 1.5 (Costa y Moradas-Ferreira, 2001): Adaptive responses to stress conditions. Stress responses involve sensing and activation of signal transduction pathways that adjust genomic expression program. The induction of both specific and general stress responses increases cellular resistance to a subsequent lethal stress

Cuando *Saccharomyces cerevisiae* crece en un medio de glucosa, la levadura la fermenta a etanol. Al final de la fase fermentativa se produce un cese de crecimiento (cambio diáuxico), en el cual la modificación en la expresión genética permite a las células crecer de modo respiratorio, usando el etanol acumulado en la fase anterior. Para actuar frente a la elevada producción intracelular de ROS

debida al proceso de respiración se produce un incremento en la expresión de genes que codifican defensas antioxidantes. Esto ocurre después del cambio diáuxico o durante el crecimiento en sustratos no fermentables, como acetato o glicerol. Las defensas antioxidantes también pueden ser inducidas durante la fase fermentativa cuando se somete a las células a agentes tales como estrés térmico, etanol, peróxido de hidrógeno, iones metálicos y radiación ionizante. Las respuestas ante el estrés producido por los diferentes agentes comparten mecanismos comunes, aunque existen cambios genéticos y bioquímicos específicos dependiendo del agente causante del estrés. En definitiva, las levaduras detectan el estrés oxidativo y generan una respuesta a nivel molecular induciendo los sistemas de defensa antioxidantes primarios y secundarios (Costa y Moradas-Ferreira, 2001).

6. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio del metabolismo de síntesis de glutatión en una cepa mutada de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello, vamos a llevar a cabo los siguientes pasos:

- ① Elegir el medio de cultivo
- ② Comparar el comportamiento de la cepa mutada *S. cerevisiae* MT-32 con la cepa salvaje *S. cerevisiae* 1328 tanto en las condiciones de selección en matraz como en biorreactor
- ③ Estudiar la evolución de sustratos, productos y variables de operación en un cultivo en biorreactor de *S. cerevisiae* MT-32
- ④ Estudiar la influencia del estado metabólico en la producción de glutatión de *S. cerevisiae* MT-32
- ⑤ Analizar el efecto de la fuente de nitrógeno en la fisiología de la cepa mutada *S. cerevisiae* MT-32
- ⑥ Analizar el efecto de la fuente de azufre en la fisiología de la cepa mutada *S. cerevisiae* MT-32
- ⑦ Estudiar el metabolismo de glutatión en *S. cerevisiae* MT-32 con alimentación de sus aminoácidos constituyentes, tanto de manera independiente como de forma combinada
- ⑧ Realizar un estudio sobre el efecto del estrés oxidativo en el metabolismo de *S. cerevisiae* MT-32
- ⑨ Comparar la influencia de distintas formas de operación mediante análisis de flujos metabólicos

7. REFERENCIAS

- Ajinamoto Co. 1983. Microbial production of glutathione. JP patent 58,016,694.
- Ajinamoto Co. 1984. Production of glutathione. JP patent 59,156,298.
- Alfafara C.G., Miura K., Shimizu H., Shioya S. and Suga K. 1992a. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 141-146.
- Alfafara C.G., Kanda A., Shioi T., Shimizu H., Shioya S. and Suga K. 1992b. Effect of aminoacids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 538-540.
- Alfafara C.G., Miura K., Shimizu H., Shioya S., Suga K. and 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.
- Alvero C.C. 1998. Biología de los microorganismos y células de interés industrial. En "Ingeniería Bioquímica" (Gòdia Casablanca F. y López Santín J., Eds). Editorial Síntesis, Madrid.
- Anderson M.E. 1997. Glutathione and glutathione delivery compounds. Adv. Pharmacol. 38: 65-78.
- Apontoweil P. and Berends W. 1975. Isolation and characterization of glutathione-deficient mutants of *Escherichia coli* K₁₂. Biochem. Biophys. Acta 399: 10-22.
- Aurand L.W., Boone N.H. and Giddings G.G. 1977. Superoxide and singlet oxygen in milk peroxidation. J. Dairy Sci. 60 (3): 363-369.
- Baccarini D.P. 1978. Coupled oxidation of NADPH with thiols at neutral pH. Arch. Biochem. Biophys. 191 (1): 315-357.
- Barford J.P. 1981. A mathematical model for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a saturated respiratory capacity. Biotechnol. Bioeng. 23: 1735-1762.
- Beckman J.S., Ye Y.Z., Anderson P., Chen J., Accavetti M.A., Tarpey M.M. and White C.R. 1994. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. Biol. Chem. Hoppe. Seyler. 375: 81-88.
- Beckman J.S. and Koppenol W.H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. Am. J. Physiol. 271: C1424-C1437.
- Bielski B.H. and Gebieki J.M. 1977. Application of radiation chemistry to biology. In "Free radicals in biology". Pryor W.A., Academic Press, New York.
- Bloch K. 1949. The synthesis of glutathione in isolated liver. J. Biol. Chem. 179: 1245-1254.
- Boveris A., Oshino N., and Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J. 128: 617-630.
- Briviba K. and Sies. 1994. "Natural antioxidants in human health and disease". Frei B., San Diego, Academic Press. pp. 107-128.
- Burton G. and Traber M. 1990. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Annu. Rev. Nutr. 10: 357-382.

Calzada A., Bueno A. y Sánchez M.M. 2000. El inicio de la replicación del ADN. Artículo de *CIENCIA al DÍA Internacional*.

www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero1/articulos/articulo3.html

Capdevila L., Parkhill L., Chacos N., Okita R., Masters B.B.S. and Estabrook R.W. 1981. The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 1357-1362.

Carmel-Harel O. and Storz G. 2000. Roles of the glutathione and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 439-461.

Ceriello A., Giugliano D., Quatraro A. and Lefebure P.J. 1991. Antioxidants show an anti-hypertensive effect in diabetic and hypertensive subjects. *Clin. Sci.* 81: 739-742.

Chibata I., Kato J. and Murata K. 1979. Glutathione. JP patent 54,122,793.

Chignell C.F. 1979. Spin labelling in pharmacology. In "Spin Labeling" New York, Academic Press. 2, pp. 223-228.

Costa V. and Moradas-Ferreira P. 2001. Review: Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 22: 217-246.

Dedon P.C. and Goldberg I.H. 1992. Free-radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bistranded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin, neocarzinostatin, and calicheamicin. *Chem. Res. Toxicol.* 5 (3): 311-332.

Dolphin D. 1988. The generation of free radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. *Basic Life Sci.* 49: 491-500.

Donnerstag B., Ohlenschläger G., Cinatl J., Amrani M., Hofmann D., Flindt S., Treusch G. and Trager L. 1996. Reduced glutathione and S-acetyl glutathione as selective apoptosis-inducing agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* 110: 63-70.

Doroshov J. and Hochstein P. 1982. Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases. In "Pathology of Oxygen". New York, Academic Press, pp. 245-253.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-96.

Ernest M. and Kim K.H. 1973. Regulation of rat liver glycogen synthetase. Reversible inactivation of glycogen synthetase D by sulfhydryl-disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* 248 (5): 1550-1555.

Fan X., He X., Guo X., Qu N. Wang C. and Zhang B. 2004. Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* 26 (5): 415-417.

Favilli F., Marraccini P., Iantomasis T. and Vincenzini M.T. 1997. Effect of orally administered glutathione on glutathione levels in some organs of rats: role of specific transporters. *Br. J. Nutr.* 78: 293-300.

Flagg E.W., Coates R.J., Jones D.P., Byers T.E., Greenberg R.S., Gridley G., McLaughlin J.K., Blot W.J., Haber M. and Preston-Martin S. 1994. Dietary glutathione intake and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Am. J. Epidemiol.* 139: 453-465.

Folch-Mallol J.L., Garay-Arroyo A., Lledías F. y Covarrubias Robles A.A. 2004. Artículo de revisión: La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 46 (1-2): 24-46.

Foster R.R. and Estabrook R.W. 1993. Is oxygen an essential nutrient? Annu. Rev. Nutr. 13: 383-403.

Freeman B.A. and Crapo J. 1982. Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agentes. Neurosurg. Clin. N. Am. 1 (2): 401-415.

Giordano F.J. 2005. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. The Journal of Clinical Investigation 115: 500-508.

Grant C.M., MacIver F.H. and Dawes I.W. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 29: 511-515.

Greenberg J.T. and Demple B. 1986. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensible for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. J. Bacteriol. 168: 1026-1029.

Griffith O.W. and Mulcahy R.T. 1999. The enzymes of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 73: Mechanism of Enzyme Action, Part A: 209-267.

Gryglewslí R.J., Palmer R.M.J. and Moncada S. 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endotrhelium-derived vascular relaxing factor. Nature 320: 454-456.

Haarasilta S. and Oura E. 1975. On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenetic enzymes during the growth process of baker's yeast. Eur. J. Biochem. 52 (1): 1-7.

Hagen T.M., Wierzbicka G.T., Sillau A.H., Bowman B.B., Aw T.Y. and Jones D.P. 1990. Fate of dietary glutathione: disposition in the gastrointestinal tract. Am. J. Physiol. 256: G530-G535.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1989. "Free radicals in biology and medicine". Oxford, Clarendon Press.

Hamada S., Tanaka H. and Sakato K. 1983. Glutathione. EP patent 79,241.

Hamers F.P., Brakkee H.J., Cavalletti E., Tedeschi M., Marmonti L., Pezzoni G., Neijt P.J. and Gispen H.W. 1993. Reduced glutathione protects against Cis-platin induced neurotoxicity in rats. Cancer Res. 53: 544-549.

Harington C.R. and Mead T.H. 1935. Synthesis of glutathione. Biochem. J. 29: 1602-1611.

Hohmann S. and Mager W. 1997. Shaping up: The responses of yeast to osmotic stress. Yeast stress responses. (Hohmann S. y Mager W., Eds). Germany, Springer. pp. 121-200.

Hopkins F.G. 1921. J. Biochem. 15: 286-305.

Hunjan M.K. and Evered D.F. 1985. Absorption of glutathione from the gastrointestinal tract. Biochim. Biophys. Acta 815: 184-188.

Ikeno Y., Tanno K., Omori I. and Yamada R. 1977. Glutathione. JP patent 52,087,296.

Ishii S. and Miyajima R. 1989. Glutathione manufacture by cultivation of *Saccharomyces* in asynthetic medium. JP patent 1,141,591.

- Jain A., Martensson J., Einar E., Auld PAM, and Meister A. 1991. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8: 1913-1917.
- Jones D.P., Coates R.J., Flagg F.W., Eley J.W., Block G., Greenberg R.S., Gunter E.W. and Jackson B. 1995. Glutathione in foods listed in the National Cancer Institutes Health Habits and History Food Frequency Questionnaire. Nutr. Cancer 17: 57-75.
- Kimura A. and 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 71,486.
- Kimura H., Inoe Y. and Kobayashi S. 1996. Glutathione manufacture with recombinant *Saccharomyces*. JP patent 8,070,884.
- Kohjin Co. 1984. Glutathione by fermentation. JP patent 59,151,894.
- Korycka-Dahi M. and Richardson T. 1981. Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. J. Dairy Sci. 63: 1181-1208.
- Krinsky N. and Denecke S. 1982. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. J. Natl. Cancer Inst. 69: 205-209.
- Krinsky N. 1994. "Natural antioxidants in human health and disease". Frei B., San Diego, Academic Press, pp. 239-262.
- Kyowa Hakko Kogyo Co. 1985. Microbial production of glutathione. JP patent 60,027,396.
- Langer R.S. Hamilton B.K. and Gardner C.R. 1976. Enzymatic regeneration of ATP. AIChE J. 22: 1079-1090.
- Lenzi A., Culasso F., Gandini L., Lombardo F. and Donero F. 1993. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Hum. Reprod. 8 (10): 1657-1662.
- Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Lombardo F., Terminali O., Passi S. and Donero F. 1994. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. Hum. Reprod. 9 (11): 2044-2050.
- Li Y., Chen J., Mao Y.Y., Lun S.Y. and Koo Y.M. 1998. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. Process Biochem. 33: 709-714.
- Li Y., Wei G. and Chen J. 2004. Glutathione: a review on biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66: 233-242.
- Liocher S.I. and Fridovich I. 1994. The role of O₂ in the production of HO·: *in vitro* and *in vivo*. Free Radical Biol. Med. 16: 29-33.
- Liu C.H., Hwang C. and Liao C.C. 1999. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. 34: 17-23.
- Lomaestro B.M. and Malone M. 1995. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. Ann. Pharmacother. 29: 1263-1273.
- Martensson J., Jain A., Stole E., Frayer W., Auld PAM and 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.

Mason R.P. and Fisher V. 1982. Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. In "Free radicals biology". Pryor W.A., New York, Academic Press.

Matsuyama A., Nakano E., Watabe K., Murata K. and Kimura H. 1989. Recombinant DNA encoding gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase, its preparation, and use for manufacturing glutathione with *Escherichia*. JP patent 1,228,473.

May J., Mendiratta S., Hill K. and Burk R.F. 1997. Reduction of hydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. 272: 22607-22610.

Meister A. 1988. Minireview: Glutathione metabolism and its selective modification. J. Biol. Chem. 263 (33): 17205-17208.

Miles A.M., Bohle D.S., Glassbrenner P.A., Hansert B., Winks D.A. and Grisham M.B. 1996. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. J. Biol. Chem. 271: 40-47.

Miwa N. 1976. Glutathione. JP patent 51,144,789.

Miwa N. and Tajima S. 1978. Production of glutathione by fermentation. JP patent 53,094,089.

Miyamoto I. and Miwa N. 1977. Production of glutathione by immobilized glutathione synthetase. JP patent 52,051,089.

Miyamoto T., Miwa N. and Takemoto T. 1978. Glutathione. JP patent 53,009,393

Molloy J., Martin J.F., Baskerville P.A., Fraser S.A.C. and Markus H.S. 1998. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. Circulation 98: 1372-1375.

Murata K., Tani K., Kato J. and 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.

Murata K. and Kimura A. 1982. Cloning of a gene responsible for the biosynthesis of glutathione in *Escherichia coli* B. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1444-1448.

Murata K., Miya T. and Gushima H. 1983. Cloning and amplification of a gene for glutathione synthetase in *Escherichia coli* B. Agric. Biol. Chem. 47: 1381-1383.

Nakayama R., Kumagai H. and Tochikura T. 1984. Leakage of glutathione from bacterial cells caused by inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase. Appl. Environ. Microbiol. 47 (4): 653-657.

Netto L., Chae H., Kang S., Rhee S.G. and 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.

Niki E., Noguchi N., Tsuchihashi H. and Gotoh N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. Am. J. Clin. Nutr. 62 (suppl.): 1322S.

Ohwada T. and Sagisaka S. 1990. An increase in levels of glutathione in *Escherichia coli* B caused by osmotic stress. Agric. Biol. and Chem. 54: 3371-3372.

Omura F., Maemura H. and Shibano Y. 1998. Recombinant preparation of glutathione using *Saccharomyces cerevisiae* mutants having single point mutations in gene *MET4* that impair the transcriptional repression of *MET* genes. JP patent 10,033,161.

- Packer J., Slater T. and 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.
- Pastore A., Federici G., Bertini E. and Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333: 19-39.
- Penninckx M.J. 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 737-742.
- Penninckx M.J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2: 295-305.
- Penninckx M.J. and Elskens M.T. 1993. Metabolism and functions of glutathione in micro-organism. *Adv. Microb. Physiol.* 34: 239-301.
- Pham H.T.B., Larsson G. and Enfors S. 1998. Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model verification. *Biotechnol. Bioeng.* 60 (4): 474-482.
- Powers S. and Lennon S. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceed. Nutr. Soc.* 58: 1025-1033.
- Ruis H. and Schüller C. 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17: 959-966.
- Sakato K. and Tanaka H. 1992. Advanced control of glutathione fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 904-912.
- Santiago L.A. and Mori A. 1993. Antioxidant defenses of Baker's yeast against free radicals and lipid peroxides in rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 13-21.
- Sawa Y., Shindo H., Nishimura S. and Ochiai H. 1986. Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells. *Agric. Biol. Chem.* 50: 1361-1363.
- Sechi G., Deledda M.G., Bua G., Satta W.M., Deiana G.A., Pes G.M. and Rosati G. 1996. Reduced intravenous glutathione in the treatment of early Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 20 (7): 1159-1170.
- Sen C.K. 1997. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutr. Biochem.* 8: 660-672.
- Sen C.K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1747-1758.
- Sevanian A., Davies K. and Hochstein P. 1985. Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1: 117-124.
- Shimizu H., Araki K., Shioya S. and Suga K. 1991. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 38 (2): 196-205.
- Shimosaka M., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. 1982. Application of hybrid plasmids carrying glycolysis genes to ATP production by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152: 98-103.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 916-921.

Sonnleitner B. and Kappeli O. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 927-937.

Smyth J.F., Bowman A., Perren T., Wilkinson P., Prescott R.J. and 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 (6): 569-573.

Suzuki M. and Kurata M. 1992. Effects of ATP level on glutathione regeneration in rabbit and guinea pig erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 103: 859-862.

Tanno K., Omori I., Yamada R. and Ikeno Y. 1976. Glutathione. JP patent 51,139,685.

Tanno K., Omori I. and Yamada R. 1979. Nicotinamide adenine dinucleotide and glutathione. JP patent 54,107,594.

Tateishi N., Higashi T., Shinya S., Naruse A. and Sakamoto Y. 1974. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J. Biochem.* 75: 93-103.

Testa B., Mesolella M. and Testa D. 1995. Glutathione in the upper respiratory tract. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 104: 117-119.

Tezuka H., Otake Y., Yabuchi S. and Kimura H. 1987. A novel *Saccharomyces* promoter and its use in glutathione biosynthesis. JP patent 62,275,685.

Trickler D., Shklar G. and Schwartz J. 1993. Inhibition of oral carcinogenesis by glutathione. *Nutr. Cancer* 20: 139-144.

Turrens J.F. and Boveris A. 1980. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191: 421-424.

Udeh K.O. and Achremowicz B. 1994. Production of yeast biomass with elevated content of glutathione. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 3/44 (1): 93-100.

Udeh K.O. and Achremowicz B. 1997. High-glutathione containing yeast *Saccharomyces cerevisiae*: optimization of production. *Acta Microbiol. Pol.* 46 (1): 105-114.

Valencia E., Marin A. and Hardy G. 2001. Glutathione-nutritional and pharmacologic viewpoints: Part IV. *Nutrition* 17 (9): 783-784.

Valencia E. and Hardy G. 2002. Practicalities of glutathione supplementation in nutritional support. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5: 321-326.

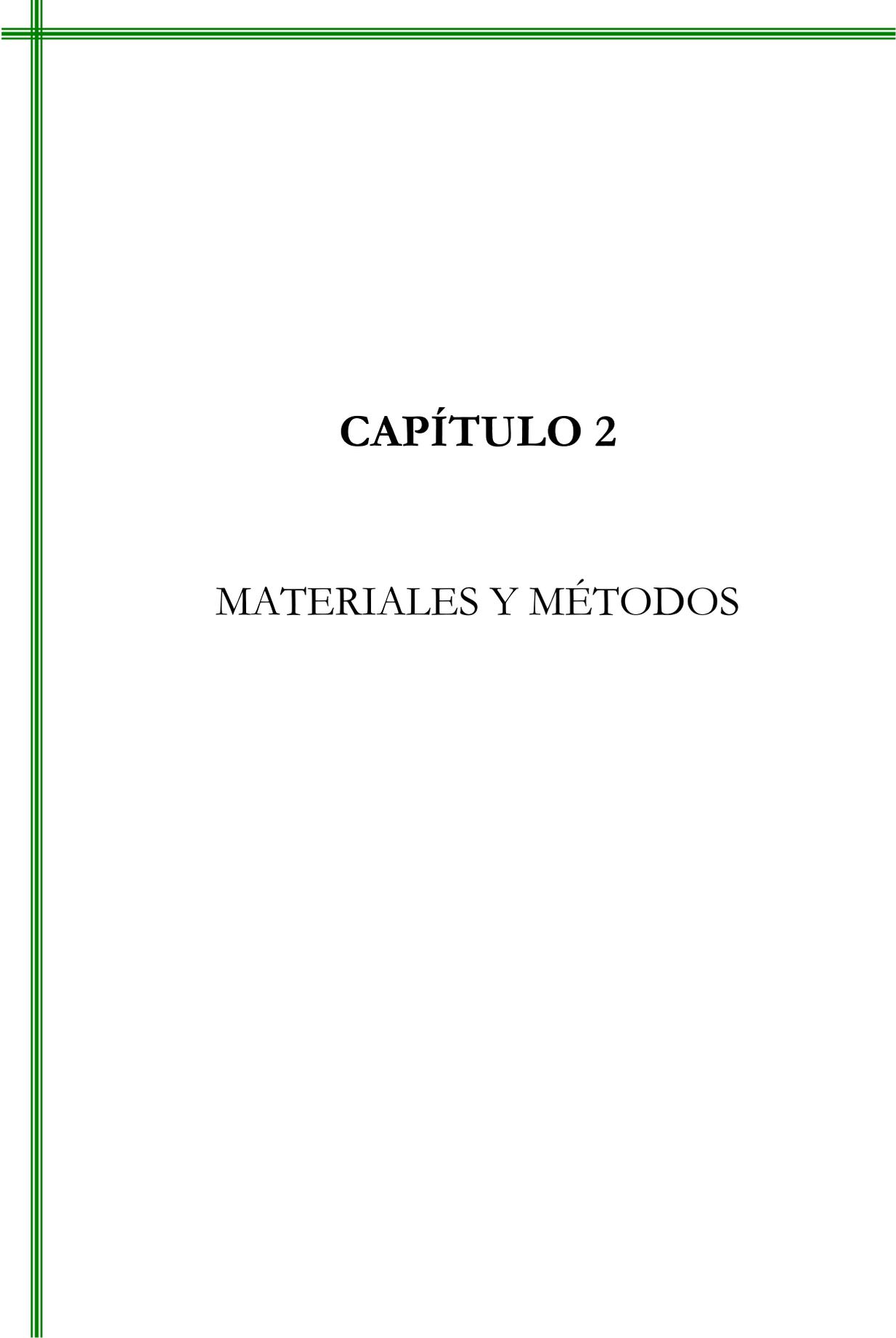
van der Aar P.C., van Verseveld H.W. and Stouthamer A.H. 1990. Stimulated glycolytic flux increases the oxygen uptake rate and aerobic ethanol production, during oxido-reductive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 13: 347-359.

van Dijken J.P. and Scheffers W.A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 199-224.

Verduyn C., Zomerdijk T.P.L., van Kijkens J.P. and Scheffers W.A. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 181-185.

Verduyn C., Postma E., Scheffers W.A. and van Dijken J.P. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: A continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8: 501-517.

- Watanabe K., Yamano Y., Murata K. and 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.
- White A.C., Thannickal V.J. and Fanburg B.L. 1994. Glutathione deficiency in human disease. *J. Nutr. Biochem.* 5: 218-226.
- White R.P. 1990. Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agentes. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 1 (2): 401-415.
- Witmer C.M.S., Jollow D.J., Kalf O.F., Kocis J.J. and Sipes I.G. 1991. "Biological Reactive Intermediates IV". New York, Plenum Press.
- Witschi A., Reddy S., Stofer B. and Lauterburg B.H. 1992. The systemic availability of oral glutathione. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43 : 667-669.
- Wu G., Fang Y., Yang S., Lupton J.R. and Turner N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134 (3) : 489-492.
- Yokozeki K., Takeuchi H. and Hirose Y. 1985. Glutathione. JP patent 60,160,894.
- Yu B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74: 139-162.



CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMO Y SUSTRATO	39
1.1. CEPA	39
1.2. MEDIO DE CULTIVO	39
2. EQUIPOS	41
2.1. BIORREACTOR	41
2.2. EQUIPOS AUXILIARES	44
3. PROTOCOLO DE FERMENTACIÓN	46
3.1. PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO	46
3.2. DISOLUCIONES CORRECTORAS DEL pH	46
3.3. PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR	46
3.4. SISTEMA DE MONITORIZACIÓN Y CONTROL EN LÍNEA	47
3.5. MONITORIZACIÓN EN LÍNEA DE LOS GASES DE ENTRADA Y SALIDA	48
3.6. TOMA DE MUESTRAS	49
4. MEDIDAS BIOLÓGICAS	49
4.1. DETERMINACIÓN DEL PESO SECO DE BIOMASA	49
4.2. ANÁLISIS DE ALCOHOLES MEDIANTE GC-FID	50
4.2.1. Principio del método	50
4.2.2. Reactivos y patrones	50
4.2.3. Aparatos	51
4.2.4. Descripción del proceso	51
4.2.4.1. Condiciones instrumentales	51
4.2.4.2. Desarrollo	52
4.2.4.3. Expresión de los resultados	53
4.3. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC-IR	53
4.3.1. Principio del método	53
4.3.2. Reactivos y patrones	53
4.3.3. Aparatos	54
4.3.4. Descripción del proceso	54
4.3.4.1. Condiciones instrumentales	54
4.3.4.2. Desarrollo	55
4.3.4.3. Expresión de los resultados	56
4.4. ANÁLISIS DE AMONIO	56
4.4.1. Preparación de patrones	56
4.4.2. Preparación del sistema	56
4.4.3. Medida de la concentración de amonio de una muestra real	57
4.5. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC-FLUORESCENCIA	57
4.5.1. Principio del método	57
4.5.2. Reactivos y patrones	57
4.5.3. Aparatos	58
4.5.4. Descripción del proceso	58
4.5.4.1. Condiciones instrumentales	58

4.5.4.2. Desarrollo	59
4.5.4.3. Expresión de los resultados	61
4.6. ANÁLISIS DE GSH Y gGC MEDIANTE HPLC-FLUORESCENCIA	61
4.6.1. Principio del método	61
4.6.2. Reactivos y patrones	62
4.6.3. Aparatos	63
4.6.4. Descripción del proceso	63
4.6.4.1. Condiciones instrumentales	63
4.3.4.2. Desarrollo	64
4.3.4.3. Expresión de los resultados	65
5. VELOCIDADES ESPECÍFICAS Y RENDIMIENTOS	65
6. OXÍGENO ABSORBIDO Y DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO	69
6.1. CAUDALES DE AIRE A LA ENTRADA Y A LA SALIDA	69
6.2. CAUDAL DE O ₂ ABSORBIDO Y CO ₂ DESPRENDIDO	70
6.3. OXÍGENO TOTAL ABSORBIDO Y DIÓXIDO DE CARBONO TOTAL DESPRENDIDO	71
7. REFERENCIAS	71

1. MICROORGANISMO Y SUSTRATO

1.1. CEPA

En este trabajo se utilizan dos microorganismos: *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1328 de la Colección Española de Cultivos Tipo, y *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 que fue seleccionada y cedida por el Departamento de Biotecnología de Puleva Biotech S.A..

Para la obtención de cepas superproductoras de GSH se recurre a la mutación al azar con N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (NTG). Las levaduras, en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) activan mecanismos de defensa para sobrevivir al estrés oxidativo. Si se tratan las células con un agente mutagénico (NTG) y luego se siembran en presencia de un oxidante a una concentración en la que no crece la cepa sin mutar, sólo crecerán aquellas que tengan mutadas alguna de las vías de regulación de respuesta a estrés oxidativo. Las levaduras activan mecanismos de respuesta a estrés distintos dependiendo de si se encuentran en presencia de un hidróperóxido o en presencia de metales pesados. Como oxidantes se utilizaron peróxido de hidrógeno, terc-butilhidroperóxido y cloruro de cadmio. El glutatión es un antioxidante que protege a las células frente a radicales libres; se hace por tanto un screening de las células mutantes que crezcan en presencia de oxidante, analizando su contenido en GSH. De cada ronda de mutación se selecciona la mejor cepa para la siguiente ronda, intentando conseguir así un incremento de GSH cada vez mayor.

Las condiciones de selección se realizan en matraz y se basan en los dos aspectos que se detallan a continuación:

- ① Peso seco de biomasa mayor o igual a un 80% del peso de *S. cerevisiae* 1328 (cepa salvaje)
- ② Producción total de GSH (mg/L) entre 15 y 20% superior que la cepa de la que procede

Así a partir de la cepa salvaje (*S. cerevisiae* 1328) se procede a realizar una ronda de mutación al azar con nitrosoguanidina (0.18mg/L, 20min, 95-98% mortalidad). La cepa mutada se siembra en placas con terc-butilhidroperóxido (0,8mM), peróxido de hidrógeno (12mM) y CdCl₂ (800µM). Se realiza un screening de las cepas que crecen en los tres medios y se selecciona *S. cerevisiae* MRSG-2 como la mejor. Esta nueva cepa se somete a una nueva ronda de mutación al azar igual que la descrita anteriormente y se siembra en placas con terc-butilhidroperóxido (1.65mM). De las cepas crecidas se selecciona *S. cerevisiae* MT-32.

1.2. MEDIO DE CULTIVO

El medio de crecimiento de la levadura está compuesto de melazas y corn steep liquor (líquido de maceración del maíz). Como medio de crecimiento del microorganismo, antes de pasarlo directamente al medio de cultivo, se utiliza un medio rico (YEPD) formado por:

Yeast extract:	10g/L
Peptona:	20g/L
Glucosa:	20g/L

Para el mantenimiento de la cepa se utiliza un medio sólido, con la misma composición anterior pero conteniendo agar en la concentración de 15g/L.

Composition and Nutrient Content of Molasses Products Hemicellulose

Item	Cane	Beet	Citrus	Extract	Starch
Brix	79.5	79.5	71.0	65.0	78.0
Total Solids (%)	75.0	77.0	65.0	65.0	73.0
Specific Gravity	1.41	0.41	1.36	1.32	1.40
Total Sugars (%)	46.0	48.0	45.0	55.0	50.0
Crude Protein (%)	3.0	6.0	4.0	0.5	0.4
Nitrogen Free Extract (%)	63.0	62.0	55.0	55.0	65.0
Total Fat (%)	0.0	0.0	0.2	0.5	0.0
Total Fiber (%)	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0
Ash (%)	8.1	8.7	6.0	5.0	6.0
Calcium, (%)	0.8	0.2	1.3	0.8	0.1
Phosphorus, (%)	0.08	0.03	0.15	0.05	0.2
Potassium, (%)	2.4	4.7	0.1	0.04	0.02
Sodium, (%)	0.2	1.0	0.3	---	2.5
Chlorine, (%)	1.4	0.9	0.07	---	3.0
Sulfur, (%)	0.5	0.5	0.17	---	0.05
Energy (kcal/kg)					
Swine (ME)	2343	2320	2264	2231	---
Poultry (ME _N)	1962	1962	---	---	---

Trace Minerals in Molasses

Mineral	Cane	Beet	Citrus
Copper, mg/kg	36	13	30
Iron, mg/kg	249	117	400
Manganese, mg/kg	35	10	20
Zinc, mg/kg	13	40	---

Vitamins in Molasses

Vitamin	Cane	Beet	Citrus
Biotin, mg/kg	0.36	0.46	---
Choline, mg/kg	745.0	716.0	---
Pantothenic Acid, mg/kg	21.0	7.0	10.0
Riboflavin, mg/kg	1.8	1.4	11.0
Thiamine, mg/kg	0.9	---	---

Tabla 2.1 (Curtin, 1983): Composición media y contenido en nutrientes de distintos tipos de melazas

El medio utilizado en el biorreactor para la realización de los experimentos, tiene la siguiente composición:

Melazas:	6.8 g/L
Corn Steep Liquor:	2.4 g/L

Se prepara una disolución concentrada de 300 g/L de corn steep liquor que se esteriliza, y a partir de esta disolución se toma el volumen necesario para preparar el medio de concentración 2.4 g/L de corn steep liquor.

La melaza, un subproducto de la producción del azúcar, es una de las fuentes más baratas de carbohidrato. Además de una gran cantidad de azúcar, las melazas contienen sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. Sin embargo, la composición de las melazas varía dependiendo de la materia prima utilizada para la producción de azúcar. La composición media y el contenido en determinados nutrientes de distintos tipos de melazas se presenta en la tabla 2.1.

Como suele ocurrir en numerosos subproductos industriales, la composición química de las melazas tiene una variación muy amplia. En la composición influyen factores tales como la temperatura ambiente, humedad, estación de la producción, variedad, prácticas productivas en la planta de procesado y variables de almacenamiento. Por tanto, pueden encontrarse variaciones considerables en el contenido de nutrientes, sabor, color, viscosidad y contenido total en azúcares. Los datos de composición presentados en la tabla 2.1 reflejan estas diferencias ya que los datos están compilados de diversas publicaciones (Curtin, 1983).

Las melazas que se utilizan en este trabajo son melazas de remolacha (Azucarero Ebro, Fábrica de La Rinconada, Sevilla) con una composición aproximada (w/w) de: 41.38% sacarosa, 1.63% rafinosa, 0.93% glucosa y 0.54% fructosa.

La materia orgánica que no es azúcar es responsable de muchas propiedades físicas de las melazas, en particular de la viscosidad. Se compone principalmente de carbohidratos, tales como almidón, compuestos nitrogenados y ácidos orgánicos. En las melazas de remolacha aproximadamente la mitad del contenido de esta materia orgánica se encuentra en forma de compuestos nitrogenados, particularmente betaina y ácido glutámico. Las melazas son una fuente de minerales y las cantidades de minerales traza son significativas. La melaza de remolacha tiende a tener un contenido mayor de potasio y sodio y menor de calcio.

Una fuente de nitrógeno que es metabolizada eficientemente es el líquido de maceración del maíz (corn steep liquor) que se forma durante la producción de almidón a partir de maíz. El extracto concentrado (con aproximadamente 4% de nitrógeno; Crueger y Crueger, 1989) contiene numerosos aminoácidos, como alanina, arginina, ácido glutámico, isoleucina, treonina, valina, fenilalanina, metionina y cisteína. El líquido de maceración de maíz utilizado en este trabajo es el comercializado por SIGMA.

2. EQUIPOS

2.1. BIORREACTOR

El reactor en el cual se llevan a cabo las fermentaciones es un Biostat B (B. Braun Biotech International) de 2 litros como el de la figura 2.1.

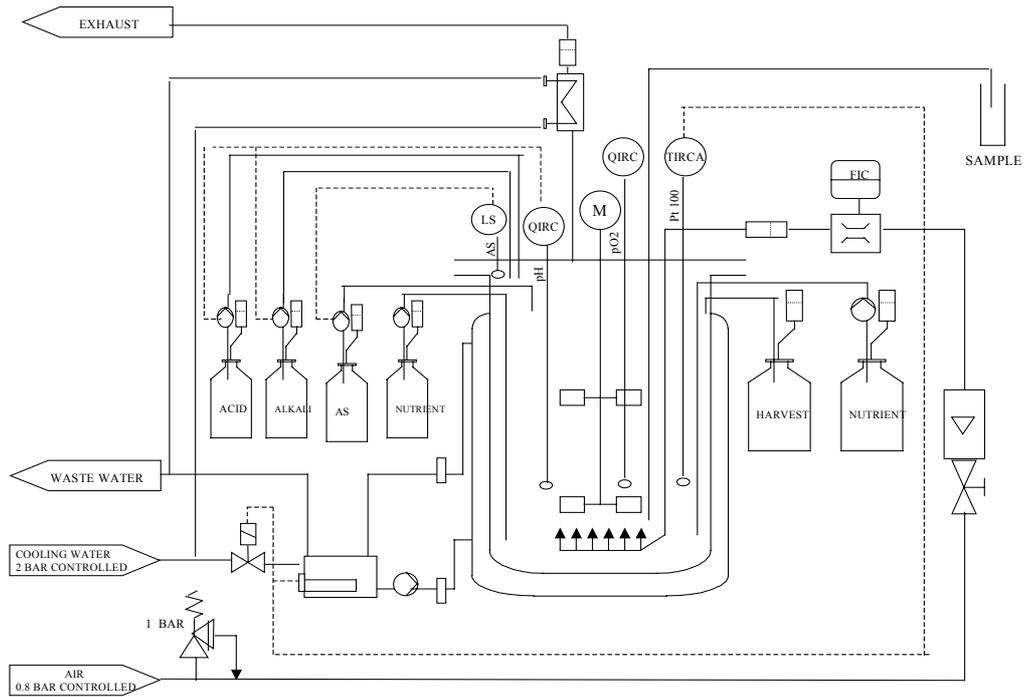


Figura 2.1: Esquema del Biostat B (B. Braun Biotech International)

El dimensionamiento del reactor puede verse en la siguiente figura 2.2:

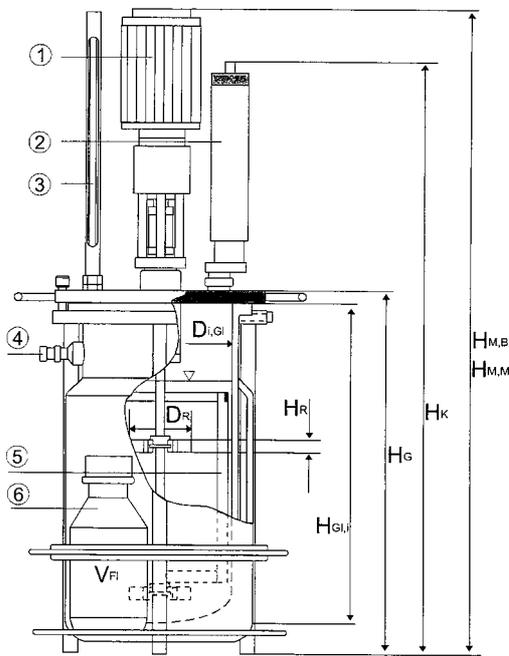


Fig. 4 - 1: Setup and dimensions of the standard culture vessels type B2, B5 and B10 with stirrer drive system
 (1) motor
 (2) exhaust cooler
 (3) reference thermometer
 (4) side entry hose connector
 (5) baffle insert
 (6) corrective solution bottles

Total volume (l)	3
Working volume (l)	2
H/D-ratio (total)	1,6:1
Space requirements ca. (H _{M,B} x D [mm])	587 x 350 incl. motor
Autoklave dimensions -for standard cooler -cooler bent over (H x D) [mm]	550 x 350 380 x 350
Height incl. exh. cooler (H _K , [mm])	508
Vessel height with top plate (H _G , [mm])	285
Height of glass vessel (H _{GL} , [mm])	240
Inner φ vessel (D _i , [mm])	130
Top plate ports, number x φ [mm]	2 x φ 19 2 x φ 12 9 x φ 6 4 hose connectors
Side entry ports	4
Top plate locating screws	3

Figura 2.2: Dimensiones y diseño del Biostat B de 2 litros

Se trata de un reactor tipo tanque agitado que consta de: dos turbinas de disco tipo Rushton; cuatro baffles; un motor; sondas de temperatura, oxígeno disuelto, espuma, pH y nivel; un equipo de toma de muestras directo; cuatro entradas para la adición de ácido, base, preinóculo, sustrato, y sistema de monitorización y control en línea mediante el software MFCS/win.

El diseño del biorreactor debe ser tal que asegure un ambiente uniforme y adecuado para los microorganismos. El biorreactor debe:

- a) Distribuir las células uniformemente en todo el volumen de cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación
- b) Mantener constante y homogénea la temperatura
- c) Minimizar los gradientes de concentración de nutrientes
- d) Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo
- e) El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo deseado

Para satisfacer los cuatro primeros puntos es necesario que el biorreactor esté provisto de un sistema de agitación, y además para el punto d) se requiere de un sistema que inyecte aire en el cultivo.

En un reactor tanque agitado, un eje provisto de turbinas accionado por un motor realiza la agitación. La velocidad de agitación se puede ajustar y controlar mediante la unidad de control DCU a la que está conectado el biorreactor. El aire que ingresa al biorreactor debe estar estéril, lo que se consigue haciéndolo pasar por dos filtros de teflón cuyos diámetros de poro son de 0.22μ , que impiden el paso de microorganismos y esporas. El aire se inyecta por la parte inferior del tanque y es distribuido por una corona que posee pequeños orificios espaciados regularmente. El chorro de aire que sale de cada orificio es "golpeado" por las paletas de la turbina inferior generándose de este modo miles de pequeñas burbujas de aire, desde las cuales difunde el oxígeno hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro deflectores que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando de este modo mayor turbulencia y mejor mezclado.

El sistema de termostatación está formado por un sistema cerrado de circulación con una bomba y una línea de conexión a la camisa de la cuba, un calentador eléctrico y un circuito de agua fría. La medida de temperatura se realiza mediante un sensor de temperatura Pt-100.

Para la medida y el control del oxígeno disuelto se utiliza un electrodo polarográfico esterilizable de oxígeno disuelto InPro 6000 de Mettler Toledo. El sensor tiene una membrana T-96 (con superficie externa de teflón). Antes de la calibración tiene que esterilizarse junto con el biorreactor y ser polarizado al menos 6 horas, en condiciones atmosféricas.

Para la medida y control del pH se utiliza un electrodo con electrolito gelificado de Mettler Toledo (405-DPAS-SC-K8S/325) que se esteriliza *in situ* y que mide la diferencia de potencial entre el medio de cultivo y un electrolito de referencia de pH 7. Antes de colocar la sonda de pH en el reactor que va a ser esterilizado, se calibra por duplicado en soluciones tampón de pH conocido (4 y 7).

El control de pH en el Biostat B es una función del software que actúa como un controlador PID. La señal eléctrica del sensor es recibida por el controlador que determina la acción a seguir según el valor de pH y el rango de operación de esta variable de control. Si el pH es más bajo que el permitido en la lógica de control, el controlador activará la bomba de base introduciendo medio alcalino que permita subir el pH. En el caso de que el pH sea más alto de lo establecido en el criterio de control, se activará la bomba de ácido y el pH bajará. En el caso de que el pH esté dentro del rango permitido, ambas bombas permanecerán desactivadas. Los parámetros del controlador son: $X_p = 30\%$, $T_i = 30s$, $T_D = 0s$, Deadband = 0.5%.

2.2. EQUIPOS AUXILIARES

Para el desarrollo integral del proceso de fermentación es necesario disponer de los equipos auxiliares que se describen a continuación. Los equipos utilizados en el análisis de metabolitos se especificarán en el apartado 4 de este capítulo.

Autoclave

La esterilización de todo el material que va a estar en contacto con el microorganismo se realiza en un autoclave (Autester-E 140 DRY de P-Selecta).

Cabina de flujo laminar

Una vez esterilizado el material se debe manipular en condiciones asépticas, para lo que se utiliza una cabina de flujo laminar vertical (TELSTAR BV-100), con impulsión de aire ultrafiltrado en sentido vertical. La cabina se debe limpiar con etanol antes y después de utilizarse, y debe ponerse en marcha 15 minutos antes de empezar a trabajar con ella para que se realice un barrido de partículas de la zona de trabajo y del material introducido.

Agitador orbital

Para la incubación de ciertos preinóculos se utiliza un agitador orbital magnético dentro de una cabina de incubación (Incubator Shaker C25KC, New Brunswick Scientific). Se fijan las condiciones de operación de 250rpm y temperatura de 30°C.

Agitador termostatzado

Para la incubación de los preinóculos que se introducen en el biorreactor se coloca una botella pyrex de 250mL con el medio inoculado en el interior de un recipiente con vaselina. Este recipiente se coloca sobre un agitador termostatzado (Agimatic-N 7000243) para garantizar la agitación y la temperatura del cultivo. Para el control de la temperatura se introduce un termostato de contacto (SELECTA) en el interior del baño de vaselina y se conecta al agitador termostatzado.

Espectrofotómetro

Para la medida de densidad óptica de un cultivo se utiliza un espectrofotómetro UV/visible (Helios γ , ThermoSpectronic). Antes de introducir la cubeta con el medio de cultivo celular (1 mL) se debe hacer el cero con 1 mL del mismo medio de cultivo (sin células).

Espectrómetro de masas

Los gases resultantes del proceso de fermentación se analizan mediante un espectrómetro de masa (EGAS, B. Braun Biotech International); con él se pueden determinar las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono necesarias para los balances de materia. Esto permite calcular la velocidad de consumo de oxígeno y la velocidad de producción de dióxido de carbono. El análisis se realiza conectando en línea las corrientes gaseosas de entrada y salida al biorreactor. El sistema de análisis permite obtener valores de hasta ocho corrientes gaseosas diferentes, lo que facilita que las corrientes de distintas fermentaciones puedan ser analizadas alternativamente. Se pueden especificar las corrientes y el intervalo de medida.

pH-metro

Se utiliza un pH-metro GLP 22 (Crison) con un electrodo de pH 52-02 (Crison/Mettler Toledo) que utiliza electrolito Crisolyt A (KCl 3M + AgCl).

Electrodo de Amonio

Se utiliza un electrodo de ión selectivo (NH_4^+) de Crison/Mettler Toledo (Referencia: 15 223 3000) acoplado al pH-metro GLP22. Se debe utilizar también un electrodo de referencia (Crison/Mettler Toledo, 52-41) de plata / cloruro de plata con electrolito intermedio, electrolito externo de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.9M y con diafragma externo esmerilado. Este electrodo utiliza un cable específico con conector banana Europa (nº Catálogo: 100 40 10). Se utiliza para las muestras una disolución acondicionadora ISA de sulfato de aluminio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

Vortex

Para homogeneizar las muestras se utiliza un Vortex Heidolph (Reax control).

Pipetas

Para medir volúmenes iguales o inferiores a 5mL se utilizan pipetas Finnpiptette digitales (Thermo Labsystems) de las siguientes características:

2-20 μL	Nº 4500080
20-200 μL	Nº 4500090
200-1000 μL	Nº 4500050
1-5 mL	Nº 4500060

Balanzas

Se utiliza una balanza GX 2000 (A&D Company, Limited; Max=2100g, Min=0.5g, e=0.1g, d=0.01g) para pesar cantidades de medios de cultivo o sustratos superiores a 0.5g. Si las cantidades están por debajo de 0.5g, se utiliza una balanza BP 61S (Sartorius; Max=61g, d=0.1mg).

Centrífuga

Para centrifugar muestras de cultivo de 1mL (en eppendorf de 1.5mL) se utiliza una centrífuga 5415D (Eppendorf).

Estufa

Se utiliza una estufa DRY-BIG 2003740 (P-Selecta) para la determinación del peso seco de biomasa.

3. PROTOCOLO DE FERMENTACIÓN

3.1. PREPARACIÓN DEL PREINÓCULO

A partir de un vial de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 o *Saccharomyces cerevisiae* 1328 en glicerol almacenado a -80°C , se siembra por duplicado en estrías sobre una placa petri de YEPD agar. Se incuba a 30°C en un agitador orbital sin agitación durante 72 horas. Luego se conservan las placas a 4°C y hay que refrescarlas cada semana.

Para preparar el preinóculo del biorreactor se inocula una colonia procedente de placa (YEPD agar) en 150mL de YEPD líquido. Se utiliza una botella Pyrex de 250mL con una varilla agitadora en su interior, todo el conjunto debe estar estéril. Tras inocular se coloca la botella en un baño de vaselina a 30°C y en agitación y se conecta mediante una goma al biorreactor (ya estéril). A las 32 horas se procederá a inocular el biorreactor.

3.2. DISOLUCIONES CORRECTORAS DEL pH

Los microorganismos pueden crecer en una variada gama de pH que va desde pH=2 para los acidófilos hasta pH=12 para alcalófilos. En general los microorganismos que toleran pH ácidos no toleran pH alcalinos y viceversa. Independientemente del pH que pueda soportar un microorganismo, es importante conocer cuál es el pH óptimo para su crecimiento. Los cultivos llevados a cabo se desarrollan a pH=5 que es el valor óptimo según Albaz et al. (1997) utilizando como soluciones correctoras KOH 2M y H_3PO_4 2N.

3.3. PREPARACIÓN DEL BIORREACTOR

Los pasos a seguir para tener el biorreactor puesto a punto para cada una de las fermentaciones desarrolladas son:

- a) Calibración sonda de pH con soluciones tampón 4 y 7.
- b) Calibración de las bombas peristálticas utilizadas para la adición de ácido, base, preinóculo y sustrato.
- c) Esterilizar a 115°C durante 40 minutos.
- d) Condiciones iniciales de operación:
 - $T = 30^{\circ}\text{C}$
 - $\text{pH} = 5$
 - Agitación = 200rpm
 - Caudal aire = 1.5 L/min
- e) Polarizar electrodo de oxígeno durante un mínimo de 6 horas.
- f) Calibrar electrodo de oxígeno. Primero se hace pasar nitrógeno hasta que el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio sea 0%. En este momento se hace pasar aire hasta que el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio alcance el 100%. Se repite este proceso.

3.4. SISTEMA DE MONITORIZACIÓN Y CONTROL EN LÍNEA

El control se lleva a cabo a través de un ordenador en el cual se haya instalado el software MFCS/win (B. Braun Biotech International). El proceso se detalla en forma de una receta programada por el usuario. Las recetas consisten en una secuencia de cajas (que representan una operación determinada); dentro de cada caja hay subcajas (o fases) en las que se especifica el control que se quiera llevar a cabo.

En la figura 2.3 se muestra la receta utilizada para la experimentación llevada a cabo en este trabajo.

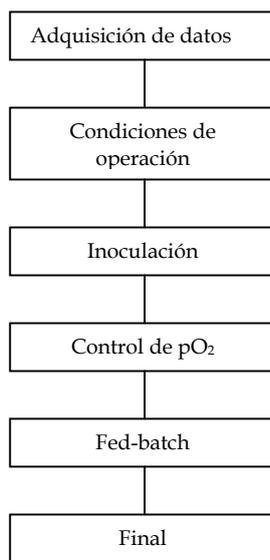


Figura 2.3: Receta para el desarrollo de una fermentación de *S. cerevisiae* en un biorreactor de 2L

En caso de que la operación sea tipo batch se eliminará la operación de fed-batch de la receta. A continuación se explica en qué consiste cada una de las operaciones de las que consta la receta:

✦ Adquisición de datos

Se especifica el estado de todas las variables como ON, para que el programa empiece a registrar su evolución en el tiempo.

✦ Condiciones de operación

Se ajustan los valores de temperatura, pH, agitación y caudal de aire necesarios para iniciar la fermentación.

✦ Inoculación

Se programa la bomba de introducción de inóculo de forma que, transcurrido un determinado tiempo desde el inicio de la receta, empiece a funcionar dicha bomba durante el periodo de tiempo necesario para que se introduzcan los 150mL de preinóculo. En este momento se produce un reset en el tiempo, de forma que el tiempo cero del experimento se corresponda con el inicio de la inoculación.

✦ Control de pO_2

Para evitar que la concentración de oxígeno disuelto limite el crecimiento del microorganismo, se modifican las condiciones de aeración y agitación de forma que la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo permanezca por encima de un valor prefijado del 20%. En la figura 2.4 se muestra la cascada de control de pO_2 .

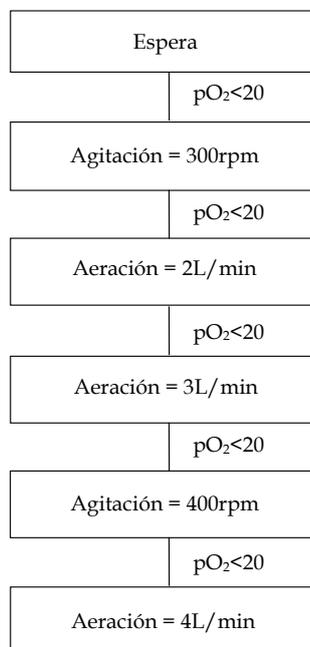


Figura 2.4: Control del porcentaje de oxígeno disuelto para un cultivo aerobio de *S. cerevisiae* en un biorreactor de 2L

✦ Fed-batch

Si el propósito del experimento es ejercer un control del crecimiento, será necesario una etapa para la adición controlada de el/los aditivo/s necesario/s. En esta operación empezaría a funcionar la bomba correspondiente del aditivo a una velocidad determinada.

✦ Final

Esta última operación de la que consta la receta se utiliza para que el programa deje de tomar datos de las variables y para que dejen de funcionar los diversos sistemas de control.

3.5. MONITORIZACIÓN EN LÍNEA DE LOS GASES DE ENTRADA Y SALIDA

Para conocer en tiempo real el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono por parte del microorganismo, es necesario medir la composición de los gases tanto a la entrada como a la salida del biorreactor. Para ello se utiliza un espectrómetro de masa EGAS-8 de B. Braun Biotech International.

3.6. TOMA DE MUESTRAS

La evolución de los metabolitos se determina a partir de muestras tomadas del biorreactor a lo largo del tiempo. A cada tiempo se toman aproximadamente 15mL de muestra realizando un lavado previamente del dispositivo de muestreo. Con este volumen se procederá como sigue:

10mL se filtran a vacío con un filtro de celulosa de Millipore de 0.45 μ . El filtro se coloca en una estufa a 65°C para conocer el peso seco de biomasa. El filtrado se pipetea de la siguiente manera:

- a. En un vial cromatográfico de vidrio se añade 1mL, se sella y se almacena a -20°C para análisis de alcoholes.
- b. En un vial cromatográfico de vidrio se añade 1mL, se sella y se almacena a -20°C para análisis de azúcares.
- c. En un tubo falcon de 15mL se añaden 3mL y se almacena a 4°C para análisis de amonio.
- d. El sobrenadante que queda se introduce en un tubo falcon de 15mL y se almacena a -20°C para tener una reserva de la muestra. De aquí se tomará el volumen necesario para el análisis de aminoácidos.

4mL se separan en alícuotas de 1mL cada una en Eppendorf de 1.5mL. Se centrifugan a 10000rpm durante 2min (temperatura ambiente). Se elimina el sobrenadante y se adiciona 1mL de agua milli-Q (proceso de lavado de las células). Se resuspenden las células con un ligero vortex y se vuelve a centrifugar a 10000rpm durante 2min. Se elimina el sobrenadante y se almacenan las células a -20°C para posterior análisis de GSH y gGC. Las células almacenadas a esta temperatura son estables durante al menos un mes.

4. MEDIDAS BIOLÓGICAS

De las muestras tomadas del biorreactor a distintos tiempos se determinan el peso seco de biomasa y la concentración de etanol, azúcares, amonio, aminoácidos, glutatión y gamma-glutamilsteína. A continuación se describen los métodos utilizados para la determinación de estos metabolitos.

4.1. DETERMINACIÓN DEL PESO SECO DE BIOMASA

Una vez tomada la muestra del biorreactor se coloca en hielo para evitar que el crecimiento continúe. La masa celular se determina mediante gravimetría. Para ello se toman 10 mL de muestra y, posteriormente, se separa el microorganismo suspendido en el caldo de cultivo por filtración (filtro de celulosa de 0.45 μ) en un sistema de filtración Millipore. El filtro se seca en una estufa a 65°C durante 48 horas hasta alcanzar un peso constante. El sobrenadante obtenido por el proceso de filtración, proporciona un medio libre de microorganismos para poder realizar las determinaciones posteriores de alcoholes, azúcares, amonio y aminoácidos.

Las impurezas del medio de cultivo también quedan retenidas en el filtro junto a las células. Para eliminar este error, se corrigen los pesos de los filtros con el peso del medio de cultivo.

4.2. ANÁLISIS DE ALCOHOLES MEDIANTE GC-FID

El objetivo del método de análisis es la determinación directa y rápida de alcoholes, fundamentalmente etanol, en muestras filtradas de cultivo celular sin tratamiento previo. El método es aplicable a la determinación del contenido de metanol, etanol, propanol, butanol y acetaldehído en los rangos de concentración de 1 a 500mg/L. El método ha utilizado como base el Catálogo de Aplicaciones de SGE (SGE, 2003-2004).

4.2.1. Principio del método

El método se basa en la inyección directa de la muestra en una columna de cromatografía de gases específica para soportar muestras que contienen agua. Estas muestras corresponden a medios de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* filtradas.

4.2.2 Reactivos y patrones

- Agua milli-Q. Agua grado reactivo, tipo I, según especificaciones de la ASTM.
- Acetaldehído 99% PA, FLUKA.
- Metanol 99% HPLC, PANREAC.
- Etanol 99% HPLC, PANREAC.
- Propanol 99% HPLC, PANREAC.
- Butanol 99% HPLC, PANREAC.
- Disolución Madre de 10g/L de cada alcohol** en agua. En un matraz aforado de 100mL, se toman los volúmenes o masas mostradas en la tabla 2.2 y se enrasa a 100mL con agua milli-Q. Preparar en el momento de comenzar el experimento.

Compuesto	Densidad (Kg/L)	Pureza (%)	m _{Alc} (g) o V _{Alc} (L)	V _{H2O} (mL)	V _{Final} (mL)	C _{Final} (g/L)
Acetaldehído	0.788	99.0	1.01 g	Enrase	100	10
MeOH	0.791	99.0	1.28 mL			
EtOH	0.801	99.0	1.27 mL			
PropOH	0.804	99.0	1.26 mL			
ButOH	0.920	99.0	1.10 mL			

Tabla 2.2: Preparación de las disoluciones madre

- Disolución intermedia de 1.0g/L.** Se toman 150μL de la disolución de 10g/L, se diluye hasta 1.5mL con agua desionizada y se agita durante un minuto en vortex. Preparar en el momento de comenzar el experimento.
- Disolución intermedia de 0.1g/L.** Se toman 150μL de la disolución de 1.0g/L, se diluye hasta 1.5mL con agua desionizada y se agita durante un minuto en vortex. Preparar en el momento de comenzar el experimento.
- Soluciones patrón para la recta de calibrado.** En la tabla 2.3 se muestran los volúmenes necesarios para preparar los patrones de calibración.

C _{std}	V _{std}	V _{agua}	V _{Final}	C _{Final}
xxx	xxx	1000 µL	1000 µL	0.0 mg/L
0.10 g/L	10 µL	990 µL	1000 µL	1.0 mg/L
0.10 g/L	50 µL	950 µL	1000 µL	5.0 mg/L
0.10 g/L	100 µL	900 µL	1000 µL	10.0 mg/L
1.00 g/L	25 µL	975 µL	1000 µL	25.0 mg/L
1.00 g/L	50 µL	950 µL	1000 µL	50.0 mg/L
1.00 g/L	100 µL	900 µL	1000 µL	100.0 mg/L
1.00 g/L	250 µL	750 µL	1000 µL	250.0 mg/L
1.00 g/L	500 µL	500 µL	1000 µL	500.0 mg/L

Tabla 2.3: Función de calibrado

4.2.3. Aparatos

- CG-MS Varian provisto de:

1. Módulo de separación Varian CP3800
2. Detector de ionización de llama tipo FID
3. Inyector automático
4. Ordenador Pentium III y Software Saturn 5.50 de Varian

- Balanza analítica Mettler Toledo $m_{\min} = (10.0 \pm 0.1)$ mg

4.2.4. Descripción del proceso

4.2.4.1. Condiciones instrumentales

En la tabla 2.4 se muestran las condiciones instrumentales optimizadas para la determinación de alcoholes en muestras acuosas por cromatografía de gases acoplada con detección por ionización de llama (CG-FID). En la tabla se presentan las condiciones adecuadas para la determinación de metanol, etanol, propanol, butanol y acetaldehído.

Fase estacionaria	BP20 (SGE) 25mm x 0.32mm ID, 1.0µ
Fase Móvil	Nitrógeno (Flujo 1.0mL/ min)
V inyección (µL)	0.5µL
T inyector (°C)	240°C (8.0 minutos)
T detector (°C)	FID 260°C (8.0 minutos)
Modo de medida	Áreas
Réplicas	1
Determinación de Acetaldehído, MeOH, EtOH, PropOH y ButOH	
Relación de Split	0.00 min On Relación 50 0.01 min On Relación 50 2.00 min Off
T horno (°C)	t=0min 65°C, 2.5min Rampa 250°C (60°C/min, 2.42min)
Duración (t _{retención})	(t _{acetaldehído} = 0.642 min) (t _{metanol} = 1.020 min) 8 minutos (t _{etanol} = 1.169 min) (t _{propanol} = 1.877 min) (t _{butanol} = 3.052 min)

Tabla 2.4: Parámetros instrumentales

4.2.4.2. Desarrollo

Tratamiento de patrones

En una serie de viales cromatográficos de 2mL se introduce 1mL de cada uno de los patrones acuosos preparados con anterioridad tal y como se muestra en la tabla 2.3 y se inyectan en el CG-FID fijando las condiciones mostradas en la tabla 2.4. En la figura 2.5 se puede apreciar el cromatograma obtenido para los patrones, siguiendo este método.

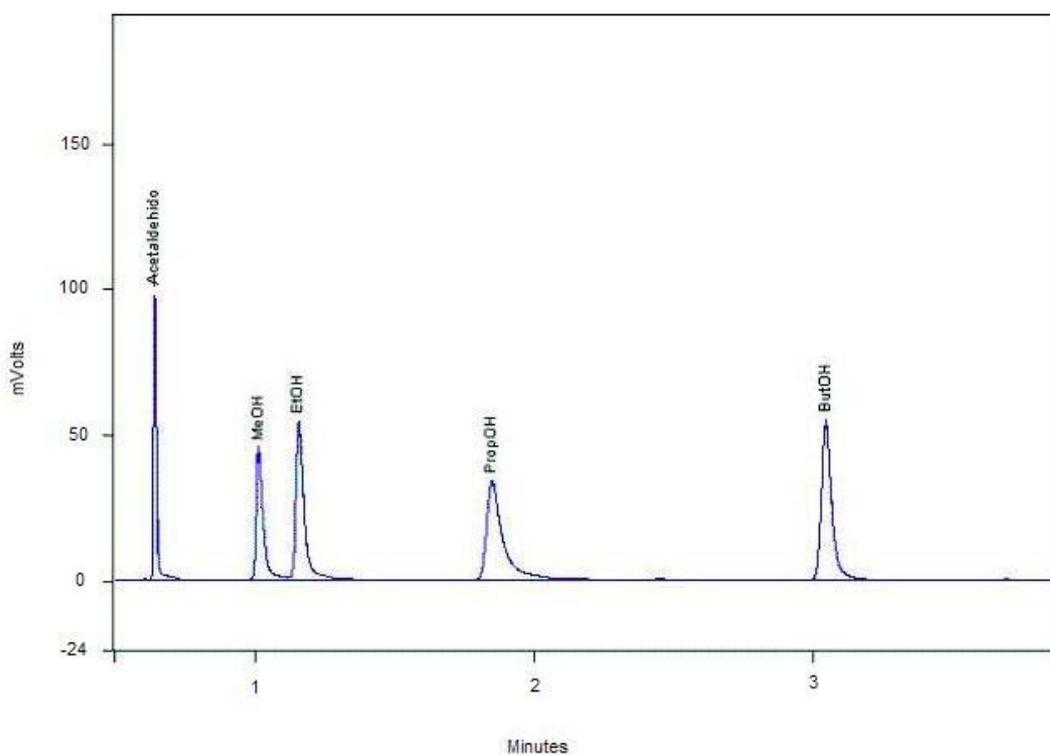


Figura 2.5: Cromatograma representativo de los patrones utilizados en el método de determinación de alcoholes por GC-FID

Tratamiento de muestra

Tras un periodo determinado de tiempo de cultivo, se toma 1.0mL del caldo previamente filtrado a 0.45μ para eliminar las células. El sobrenadante (1mL medido de forma exacta) se introduce en un vial cromatográfico y se inyecta en el CG-FID, fijando las condiciones mostradas en la tabla 2.4.

En caso de que la inyección no sea inmediata se deben conservar tanto muestras como patrones en la nevera a 4°C ; si el análisis se demora más de 24 horas, se guardarán a -20°C .

4.2.4.3. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en mg/L de cada alcohol en la muestra real. . Dicha concentración se determina mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida.

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

4.3. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC-IR

El método tiene como finalidad la determinación de la concentración de azúcares en el medio de cultivo filtrado de *Saccharomyces cerevisiae* mediante HPLC acoplado con detección por índice de refracción (HPLC-IR). Este método es aplicable a la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa de muestras de cultivo en el rango de concentración de 0.5 a 15.0g/L. El método que se va a describir utiliza como referencia el Catálogo Phenomenex (Phenomenex, 2003) y uno de los boletines de Supelco (Supelco, 1999).

4.3.1. Principio del método

El método se basa en la separación cromatográfica de los distintos analitos y posterior detección por diferencia de índice de refracción entre una disolución que atraviesa una celda de medida respecto a otra de referencia.

4.3.2. Reactivos y patrones

- a. Agua milli-Q. Agua grado reactivo, tipo I, según especificaciones de la ASTM.
- b. Acetonitrilo >99% HPLC, Panreac.
- c. Patrón de glucosa, PRS, Panreac.
- d. Patrón de fructosa, PRS, Panreac.
- e. Patrón de sacarosa, PRS, Panreac.
- f. Hidróxido sódico pellets >98% PA, Panreac.
- g. **Eluyente A: Mezcla AcN/Agua (80/20)**. En una botella topacio de 2.5L de capacidad se introducen 2L de acetonitrilo filtrados. Se adicionan 500mL de agua milli-Q, medidos con probeta, y se agita vigorosamente. Finalmente se sonica durante 5 minutos.
- h. **Disolución madre 15.0g/L de cada uno de los compuestos**. En un matraz aforado de 5mL de capacidad, se introducen 75mg de cada compuesto (glucosa, fructosa, sacarosa), se adiciona agua milli-Q hasta casi enrase para disolver y se agita vigorosamente; se enrasa al volumen final con agua milli-Q. La disolución se deja estabilizar en nevera a 4°C durante 12 horas y se emplean las cantidades necesarias de la misma y el resto se alicuota en Eppendorf de 1.5mL de capacidad para conservar en nevera a -20°C. Cuando se use una disolución madre congelada, es necesario que alcance temperatura ambiente y agitar vigorosamente.
- i. **Soluciones patrón para la recta de calibrado**. En la tabla 2.5 se muestran los volúmenes necesarios para la preparación de los patrones de concentraciones finales deseadas.

C _{std}	V _{std}	V _{agua}	V _{Final}	C _{Final}
xxx	xxx	1000 µL	1000 µL	0.0 g/L
15 g/L	150 µL	0 µL	150 µL	15.0 g/L
15 g/L	600 µL	300 µL	900 µL	10.0 g/L
15 g/L	450 µL	450 µL	900 µL	7.5 g/L
15 g/L	300 µL	600 µL	900 µL	5.0 g/L
15 g/L	150 µL	750 µL	900 µL	2.5 g/L
10 g/L	100 µL	900 µL	1000 µL	1.0 g/L
10 g/L	50 µL	950 µL	1000 µL	0.5 g/L

Tabla 2.5: Función de calibrado

4.3.3. Aparatos

- HPLC 2695 Waters provisto de:

1. Horno de columna termostatzado 20-60°C
2. Detector de índice de refracción 1100 Series Agilent conectado a través de Satin con Millenium
3. Inyector automático
4. Ordenador Pentium III y Software Millenium 4.0

- Balanza analítica Mettler Toledo $m_{\min} = (10.0 \pm 0.1)$ mg

4.3.4. Descripción del proceso

4.3.4.1. Condiciones instrumentales

En la tabla 2.6 se muestran las condiciones instrumentales optimizadas para la determinación de azúcares en muestras acuosas por HPLC acoplado con detección por índice de refracción (HPLC-IR).

Fase estacionaria	Columna Luna 5u NH ₂ C18 250mm x 4.6mm 5µ
Fase Móvil (Isocrática)	Fase A: Agua/AcN 20/80 Flujo 3.0mL/min Preparada previamente para evitar fluctuación del detector
V inyección (µL)	10µL
Profundidad de la Aguja	0mm
T carrusel muestra (°C)	(25.0 ± 5.0) °C
T columna (°C)	(35.0 ± 2.0) °C
Modo de medida	Áreas
Réplicas	1
Duración (t_{retención})	15 minutos (t _{fructosa} = 0.642 min) (t _{glucosa} = 1.020 min) (t _{sacarosa} = 1.169 min)

NOTA: La columna Luna 5u NH₂ viene estabilizada en hexano/AcN (99:1). Se han de equilibrar para su uso en fase reversa. Para ello, en su primer uso se debe pasar fase móvil durante al menos 2 horas a flujo 1.5mL/min.

Tabla 2.6: Parámetros instrumentales

Cada 150 inyecciones se cambia la precolumna y se lava con el gradiente mostrado en la tabla 2.7. Se aumenta la proporción de agua milli-Q durante dos horas y finalmente se vuelve a condiciones iniciales para reequilibrar la columna y el detector. Con este lavado, se eliminan sustancias iónicas que pueden presentarse en las muestras.

Gradiente			
t (min)	Flujo (mL/min)	% A	% Agua
0	3.00	100	0
2	1.50	20	80
240	1.50	20	80
245	1.50	100	0
320	1.50	100	0
325	0.05	100	0

Tabla 2.7: Gradiente y lavado de columna

4.3.4.2. Desarrollo

Preparación de Patrones

En una serie de viales cromatográficos de 2mL con inserto de 200 μ L de capacidad se introducen 100 μ L de cada uno de los patrones mostrados en la tabla 2.5. En la figura 2.6 se muestra el cromatograma obtenido para los patrones, siguiendo este método.

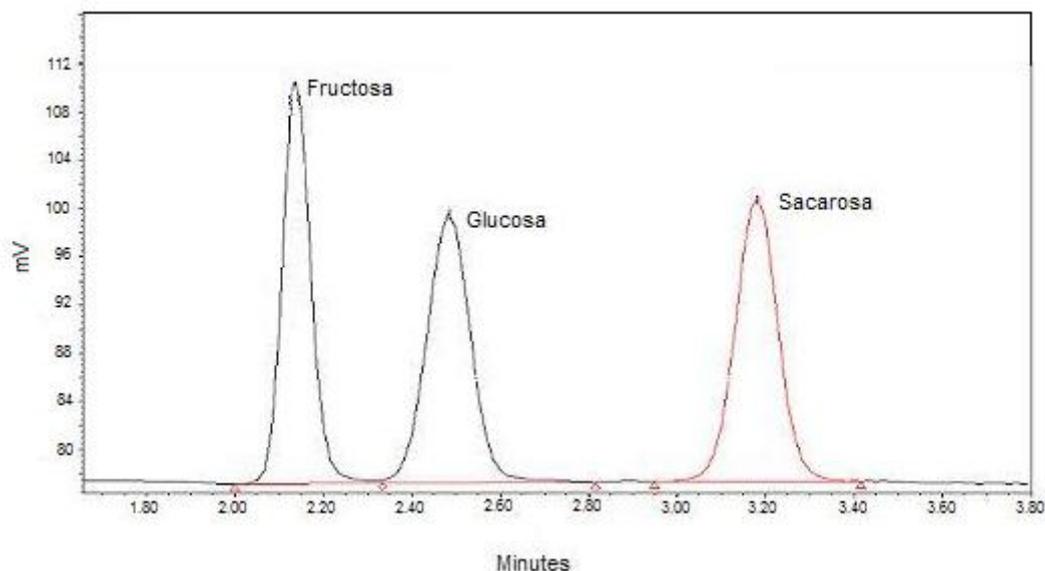


Figura 2.6: Cromatograma representativo de los patrones utilizados en el método de determinación de azúcares por HPLC-IR

Preparación de Muestras

Tras un periodo determinado de tiempo de cultivo, se toma 1.0mL de caldo previamente filtrado con filtro de celulosa de 0.45 μ para eliminar las células, y se introduce en un vial cromatográfico. Se inyecta junto a los patrones en el HPLC, fijando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla 2.6.

4.3.4.3. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en gramo de analito en litro de disolución. Dicha concentración se determina mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida.

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

4.4. ANÁLISIS DE AMONIO

El método tiene como finalidad la determinación de la concentración de amonio en el medio de cultivo filtrado de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el electrodo de amonio y un electrodo de referencia conectados a un pHmetro. El protocolo a seguir es el que aparece en el catálogo adjunto con el electrodo de ión selectivo.

4.4.1. Preparación de patrones

Se pesan 5.349g de cloruro de amonio (previamente secado a 100°C durante 2 horas) y se enrasa con agua milli-Q a 1 litro. Esto da lugar a una solución de concentración 0.1mol/L de NH_4^+ . En la tabla 2.8 se muestran los diferentes patrones que se preparan.

mol/L NH_4^+	Volumen de disolución de amonio	mL de Agua milli-Q	μL ISA ^(a)
10 ⁻¹	12mL del patrón (10 ⁻¹ mol/L NH_4^+)	-	240
10 ⁻²	1.2mL del patrón (10 ⁻¹ mol/L NH_4^+)	10.8	240
10 ⁻³	1.2mL de la disolución 10 ⁻² mol/L NH_4^+	10.8	240
10 ⁻⁴	1.2mL de la disolución 10 ⁻³ mol/L NH_4^+	10.8	240

(a) ISA: Aluminio sulfato 0.9 mol/L

Tabla 2.8: Patrones para la recta de calibrado

4.4.2. Preparación del sistema

El electrodo de referencia se rellena con el electrolito intermedio (solución ISA) hasta el nivel del puerto de llenado. Se desafloja ligeramente la junta inferior y se sube un poco dejando que salga algo de electrolito intermedio. Apretar suavemente la junta nuevamente y rellenar con tanto electrolito

intermedio como sea necesario. Conectar tanto el electrodo de referencia como el electrodo de amonio al pHmetro. Seleccionar en el pHmetro la medida en mV. Para medir se introducen ambos electrodos en la disolución. Permitir que el valor medido se estabilice y apuntar el valor constante de potencial de electrodo.

4.4.3. Medida de la concentración de amonio de una muestra real

Se mide el potencial de electrodo de los patrones para hacer la recta de calibrado donde se representa en las abscisas $\log[\text{NH}_4^+]$ y en las ordenadas el potencial de electrodo en mV.

De las muestras del medio de cultivo filtrado se toman 3mL y se añaden 9mL de agua milli-Q y 240 μL de ISA. Se mide el potencial de electrodo y se interpola en la recta de calibrado para conocer la concentración molar de amonio correspondiente. Para determinar la concentración de amonio en la muestra de partida se multiplica el resultado por el factor de dilución empleado.

4.5. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC-FLUORESCENCIA

4.5.1. Principio del método

El análisis de aminoácidos se realiza por el método AccQ-Tag con la utilización del kit correspondiente (WAT052880). Dicho método se basa en:

- Derivatizar los aminoácidos con el reagente AccQ-Fluor de Waters
- Separar los derivados por cromatografía de fase reversa HPLC
- Cuantificar los derivados por detección fluorimétrica

El protocolo a seguir se encuentra en la página web de Waters (www.waters.com).

4.5.2. Reactivos y patrones

- a. Tampón borato del kit (se almacena en un desecador)
- b. Acetonitrilo
- c. Polvo de reagente AccQ-Fluor. Cuando se reconstituye tiene una concentración 10mM de AccQ-Fluor en acetonitrilo. Para reconstituirlo se procede como sigue:
 - 1) Precalentar un bloque térmico a 55°C
 - 2) Dar golpecitos al recipiente para asegurarnos que el polvo queda en el fondo
 - 3) Añadir 1mL de acetonitrilo enjuagando la punta de la micropipeta antes
 - 4) Vortex de 10 segundos
 - 5) Calentar el vial en el bloque térmico hasta que se haya disuelto el polvo. No calentar más de 10 minutosEl reagente reconstituido se guarda en un desecador.
- d. **Estándar de aminoácidos (Waters):** se tienen 10 ampollas del patrón de aminoácidos. Cada ampolla contiene una mezcla 2.5mM de 17 aminoácidos a excepción de la cistina (1.25mM). Para preparar el estándar para la curva de calibración se toman 40 μL de una ampolla y se añaden 960 μL de agua milli-Q. Se utiliza un vial de vidrio. Este patrón que se utilizará para preparar la recta de calibrado contiene 100pmol/ μL de cada aminoácido a excepción de la

cistina (50pmol/ μ L, equivalente a 100pmol/ μ L de cisteína). El estándar para la curva de calibración se guarda a -20°C hasta un máximo de un mes. El estándar de aminoácidos sobrante de la ampolla se guarda en un vial de vidrio y se almacena a -20°C hasta un máximo de 3 meses. Las ampollas que no se han abierto se guardan a 4°C hasta un máximo de 1 año.

- e. **Eluyente A: tampón acetato acuoso (Waters AccQ-Tag).** Se añaden 200mL del concentrado a 2 L de agua milli-Q y se agita. Se almacena a 4°C hasta un máximo de un mes.
- f. **Eluyente B: Acetonitrilo.** Añadir 600mL de acetonitrilo a un vaso de precipitado de 2L. Añadir 400mL de agua milli-Q. Mezclar y desgasificar. Se almacena a 4°C hasta un máximo de 2 semanas.
- g. **Eluyente C: Agua milli-Q.** Agua grado reactivo, tipo I, según especificaciones de la ASTM.

4.5.3. Aparatos

- HPLC 2695 Waters provisto de:

1. Inyector automático
2. Bandeja para muestras termostaticada $4-40^{\circ}\text{C}$
3. Horno de columna termostaticado $20-60^{\circ}\text{C}$
4. Detector de fluorescencia Waters 474

- Ordenador Pentium III y Software Millennium 4.0-Tubos de muestra de vidrio de 6x50mm

- Pipetas Pasteur de vidrio de 9 pulgadas

- Bloque calefactor

4.5.4. Descripción del proceso

4.5.4.1. Condiciones instrumentales

En la tabla 2.9 se muestran las condiciones instrumentales para el análisis de aminoácidos mediante HPLC-Fluorescencia y en la tabla 2.10 se muestra el gradiente empleado en el método de análisis. Para acondicionar la columna se hace pasar primero un flujo de 1mL/min de 60% Eluyente B-40% Eluyente C durante 5 min. Luego se equilibra la columna haciendo pasar un flujo de 1mL/min de 100% Eluyente A durante 9 min.

Fase estacionaria	Columna AccQ-Tag (Waters) 150mmx3.9mm, 4 μ
Fase Móvil	Fase A Tampón acetato AccQ-Tag Fase B Acetonitrilo Fase C Agua milli-Q
V inyección (μL)	5
Elución	Por gradiente (ver tabla 2.10)
Profundidad de la Aguja	2mm
T carrusel muestra ($^{\circ}\text{C}$)	20
T columna ($^{\circ}\text{C}$)	37
Fluorescencia (λ_{medida})	Excitación 250nm/Emisión 395nm; Anchura banda 18; Ganancia 10
Modo de medida	Áreas
Réplicas	1
Duración ($t_{\text{retención}}$)	45 min (ver tabla 2.11)

Tabla 2.9: Parámetros instrumentales

t (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B	% C
	1.00	100.0	0.0	0.0
0.50	1.00	99.0	1.0	0.0
18.50	1.00	95.0	5.0	0.0
19.00	1.00	91.0	9.0	0.0
29.50	1.00	83.0	17.0	0.0
35.00	1.00	0.0	60.0	40.0
38.00	1.00	100.0	0.0	0.0
45.00	1.00	100.0	0.0	0.0

Tabla 2.10: Gradiente

En la tabla 2.11 se muestran los tiempos de retención para cada aminoácido analizado.

Aminoácido	Tiempo de retención (min)
<i>Reactivo</i>	13.196
Ácido Aspártico	15.166
Ácido Glutámico	17.107
Serina	17.664
Histidina	19.325
Glicina	20.565
Amoniaco	21.412
Arginina	22.042
Treonina	22.482
Alanina	22.806
Prolina	23.996
Cisteína	26.469
Tirosina	27.462
Valina	28.663
Metionina	29.246
Lisina	31.392
Isoleucina	32.710
Leucina	33.428
Fenilalanina	35.184

Tabla 2.11: Tiempos de retención para cada aminoácido y del reactivo

4.5.4.2. Desarrollo

Preparación de Patrones

- 1) Precalentar el bloque calefactor a 55°C
- 2) Añadir 10 µL del estándar al vial de muestra
- 3) Añadir 70 µL de tampón borato
- 4) Añadir 20 µL del reactivo AccQ-Fluor reconstituido
- 5) Vortex inmediato durante unos segundos
- 6) Incubar 1 min a temperatura ambiente
- 7) Pasar el contenido del vial mediante pipeta Pasteur a un vial con inserto
- 8) Calentar durante 10 min a 55°C
- 9) Inyectar en HPLC-Fluorescencia

Un volumen de inyección de 5µL del estándar derivatizado contiene 50pmol de cada aminoácido derivatizado (a excepción de la cistina que será de 25pmol).

En la figura 2.7 se muestra el cromatograma obtenido para los patrones, siguiendo este método.

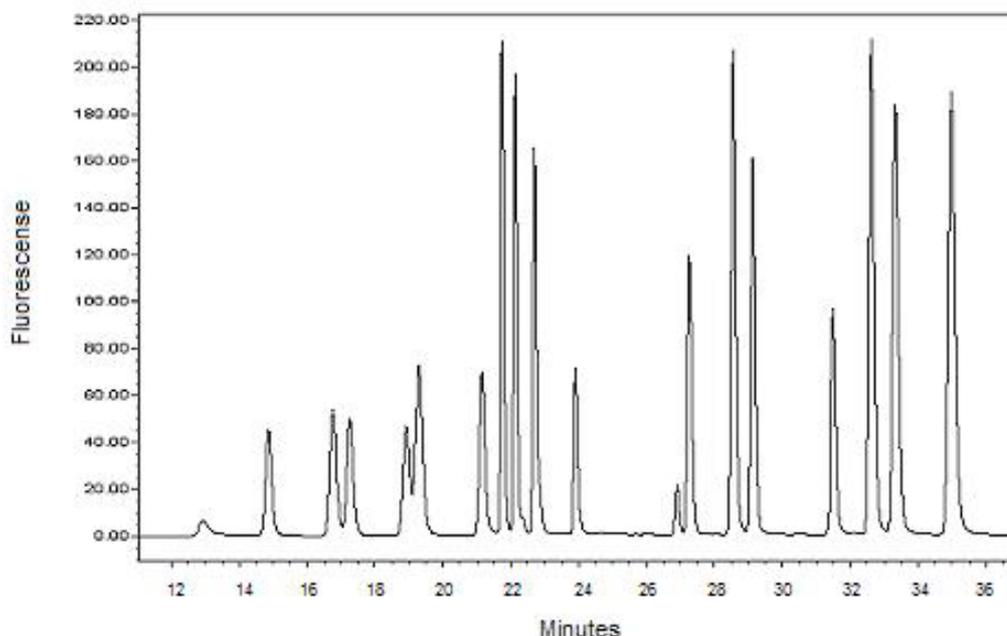


Figura 2.7: Cromatograma representativo de los patrones utilizados en el método de determinación de aminoácidos por HPLC-Fluorescencia. Según la tabla de tiempos de retención (tabla 2.11) se puede saber cuál es el pico correspondiente a cada aminoácido analizado

Preparación del Blanco

- 1) Añadir 80 μL de tampón borato a un vial de muestra
- 2) Añadir 20 μL del reactivo AccQ-Fluor reconstituido
- 3) Vortex
- 4) Incubar durante un minuto a temperatura ambiente
- 5) Pasar a vial con inserto
- 6) Calentar 10 min a 55°C
- 7) Inyectar en HPLC-Fluorescencia

Preparación de la Muestra

Se analizan los aminoácidos libres del sobrenadante que queda después de filtrar una muestra del biorreactor. Así podremos conocer la cantidad de aminoácido consumida por la célula después de alimentar algún aminoácido en el medio de cultivo. El proceso es el siguiente: tras un periodo determinado de tiempo de cultivo, se toman 10mL del caldo de cultivo y se filtra a vacío utilizando un filtro de celulosa de 0.45 μ . Del filtrado se toman 500 μL (en un eppendorf de 1.5mL) y se añaden 500 μL de acetonitrilo para precipitar las proteínas. Se centrifuga 2 min a 12000 rpm y se toman 20 μL del sobrenadante. Se procede a derivatizar la muestra. Las muestras derivatizadas son estables una semana a temperatura ambiente.

- 1) Precipitar las proteínas del sobrenadante. A 500µL de sobrenadante se añaden 500µL de acetonitrilo. Se centrifuga 2min a 12000rpm. Esto implicará una dilución 1:2 de la muestra original
- 2) Añadir 20 µL del sobrenadante obtenido en la etapa anterior en un vial de muestra
- 3) Añadir 60 µL de tampón borato
- 4) Añadir 20 µL del reactivo AccQ-Fluor reconstituido
- 5) Vortex inmediato
- 6) Incubar 1 min a temperatura ambiente
- 7) Incubar 10 min a 55°C
- 8) Inyectar en HPLC-Fluorescencia

4.5.4.3. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en µmoles/litro de cada aminoácido. Dicha concentración se determina mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida y tomando como ordenada en el origen el valor de cero, porque sólo se tiene un punto de concentración para cada aminoácido.

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

La concentración final teniendo en cuenta la dilución realizada al precipitar las proteínas con acetonitrilo es:

$$C_{\text{Final}} = C_1 \cdot 2$$

4.6. ANÁLISIS DE GSH Y gGC MEDIANTE HPLC-FLUORESCENCIA

El método es aplicable a la determinación de la forma reducida de GSH y de γ -glutamylcisteína en células procedentes de cultivos en los rangos de concentración de 1 a 300µmol/L para ambos. Se deberá reducir por tanto todo el glutatión mediante una reacción previa, es decir, se está analizando glutatión total. Por otro lado, en caso necesario se puede determinar la fracción oxidada por diferencia entre la concentración total tras la reducción (glutatión total) y la inicial antes de dicha reducción (glutatión reducido). El método utilizado se basa en los métodos descritos por Cereser et al. (2001) y Busto et al. (1997).

4.6.1. Principio del método

El método se basa en la derivatización del tripéptido glutatión y del dipéptido gGC con o-ftalaldehído a pH 7.6 y a temperatura ambiente. La reacción origina un compuesto altamente fluorescente. Las células se lavan previamente con agua milli-Q para eliminar el medio de cultivo y se rompen mecánicamente en medio ácido (TCA 7.5%); por último se neutraliza la disolución con ayuda de un tampón fosfato, se reduce todo el glutatión con el agente reductor y se miden los compuestos libres en dicha disolución.

4.6.2. Reactivos y patrones

- a. Agua milli-Q. Agua grado reactivo, tipo I, según especificaciones de la ASTM.
- b. Glutación reducido (GSH) 99%, Sigma.
- c. γ -glutamilcisteína 99%, Sigma.
- d. o-ftalaldehído >97%, PA, Sigma.
- e. Triscarboxietilfosfina (TCEP), PA, Sigma.
- f. Monohidrógeno fosfato potásico (K_2HPO_4), PA, Panreac.
- g. Dihidrógeno fosfato potásico (KH_2PO_4) PA, Panreac.
- h. Ácido clorhídrico 37%, PA, Panreac.
- i. Ácido tricloroacético, PA, Sigma.
- j. Acetato sódico >99%, PA, Panreac.
- k. Metanol HPLC 99%, Scharlau.
- l. Acetonitrilo HPLC 99.9%, PAI, Panreac.
- k. **Disolución de K_2HPO_4 1M.** En un matraz aforado de 200mL se colocan 34.84g de K_2HPO_4 y se enrasa al volumen final con agua milli-Q. Se renovará con una frecuencia máxima de tres meses.
- l. **Disolución de KH_2PO_4 1M.** En un matraz aforado de 200mL se colocan 27.22g de KH_2PO_4 y se enrasa al volumen final con agua milli-Q. Se renovará con una frecuencia máxima de tres meses.
- m. **Tampón fosfato potásico 1M, pH=7.8.** En un vaso de precipitado se echan 90.8mL de disolución K_2HPO_4 1M y se adicionan 9.2mL de la disolución de KH_2PO_4 1M. Se ajusta el pH según sea necesario con las disoluciones iniciales. Se renovará con una frecuencia máxima de tres meses.
- n. **Tampón fosfato potásico 600mM, pH=7.8.** A 90mL de tampón fosfato potásico (pH=7.8) 1M se le adicionan 60mL de agua milli-Q. Se renovará con una frecuencia máxima de tres meses.
- o. **Disolución de agente reductor.** En un matraz aforado de 25mL se echan 5mL de HCl 1M y se adiciona agua milli-Q hasta casi enrase. Se añaden 9mg de TCEP y se enrasa al volumen final con agua milli-Q. Se renovará con una frecuencia máxima de un mes.
- p. **Eluyente A: Disolución de acetato sódico 50mM.** En un matraz aforado de 1L se colocan 4.115g de acetato sódico y se disuelve en 1L de agua desionizada. Se agita vigorosamente, se sonica durante 5 minutos y se ajusta el pH a 6.5 con ácido acético. Se filtra con filtro de disco de acetato de celulosa de 0.45 μ . Se renovará con una frecuencia máxima de dos días.
- q. **Eluyente B: Acetonitrilo 100%.** Filtrado a través de filtro de disco de nylon de 0.45 μ m de tamaño de poro.
- r. **Disolución de OPA (12mM) en AcNa (50mM).** Se pesan 0.829g de OPA y se disuelven en 10mL de metanol. Por otra parte, se pesan 2.058g de acetato sódico y se disuelven en agua milli-Q (aproximadamente en 400mL). Se mezclan ambas disoluciones en un matraz aforado de 500mL de capacidad y se enrasa hasta el volumen final con agua milli-Q. Por último se filtra con filtro de acetato de celulosa de 0.45 μ , y se guarda en nevera a 4°C. Se renovará con una frecuencia máxima de tres meses.
- s. **Disolución de ácido tricloroacético al 7.5%.** En un matraz aforado de 100mL se toman 7.5mL del ácido puro (100%, 6.1N) con pipeta de vidrio y se enrasa al volumen final con agua milli-Q.
- t. **Disolución madre de glutación 40mM.** En un matraz aforado de 10mL se echan 123mg de patrón de glutación (P.M.= 307.33uma), se adiciona agua milli-Q hasta casi enrase para disolver y a continuación se enrasa al volumen final. Por último, se agita vigorosamente hasta homogeneización. La disolución se conserva en congelador a -20°C. Se renovará con una frecuencia máxima de seis meses.
- u. **Disolución madre de γ -GluCis 40mM.** En un matraz aforado de 10mL se colocan 100.1mg del compuesto (P.M.= 250.3uma), se adiciona agua milli-Q hasta casi enrase para disolver y se enrasa al volumen final. Por último, se agita vigorosamente hasta homogeneización. La disolución se conserva en congelador a -20°C. Se renovará con una frecuencia máxima de seis meses.

- v. **Patrón mezcla de glutatión y g-GluCis 10mM.** En un Eppendorf de 1.5mL se toman 300µL de cada una de las dos disoluciones anteriores, se adicionan 600µL de agua milli-Q y se agita durante un minuto en vortex para homogeneizar.
- w. **Patrón mezcla de glutatión y g-GluCis 1mM.** En un Eppendorf de 1.5mL se toman 150µL de la disolución anterior 10mM, se adicionan 1350µL de agua milli-Q y se agita durante un minuto en vortex para homogeneizar.
- x. **Patrón mezcla de glutatión y g-GluCis 100µM.** En un Eppendorf de 1.5mL se toman 100µL de la disolución anterior 1mM, se adicionan 900µL de agua milli-Q y se agita durante un minuto en vortex para homogeneizar.
- y. **Patrón mezcla de glutatión y g-GluCis 25µM.** En un Eppendorf de 1.5mL se toman 250µL de la disolución anterior 100µM, se adicionan 750µL de agua milli-Q y se agita durante un minuto en vortex para homogeneizar.
- z. **Patrón mezcla de glutatión y g-GluCis 10µM.** En un Eppendorf de 1.5mL se toman 100µL de la disolución de concentración 100µM, se adicionan 900µL de agua milli-Q y se agita durante un minuto en vortex para homogeneizar.
- aa. **Soluciones patrón para la recta de calibrado.** En la tabla 2.12 se muestran los volúmenes de disolución de los patrones necesarios para preparar las concentraciones finales de glutatión y γ-GluCis, respectivamente.

*C _{std}	V _{std}	V _{agua}	V _{Final}	C _{Final}
10 µM	100 µL	900 µL	1000 µL	1.0 µM
25 µM	200 µL	800 µL	1000 µL	5.0 µM
100 µM	100 µL	900 µL	1000 µL	10.0 µM
1 mM	50 µL	950 µL	1000 µL	50.0 µM
1 mM	100 µL	900 µL	1000 µL	100.0 µM
1 mM	150 µL	850 µL	1000 µL	150.0 µM
1 mM	200 µL	800 µL	1000 µL	200.0 µM
1 mM	250 µL	100 µL	1000 µL	250.0 µM

*Mezcla de Glutatión y γ-GluCis

Tabla 2.12: Función de calibrado

4.6.3. Aparatos

- HPLC 2695 Waters provisto de:

1. Inyector automático
2. Bandeja para muestras termostaticada 4-40°C
3. Horno de columna termostaticado 20-60°C
4. Detector de fluorescencia Waters 474
5. Ordenador Pentium III y Software Millennium 4.0

- pHmetro Crison, con electrodo de referencia Ag/ AgCl y electrodo selectivo de vidrio

- Balanza analítica Mettler Toledo $m_{\min} = (10.0 \pm 0.1)$ mg

4.6.4. Descripción del proceso

4.6.4.1. Condiciones instrumentales

En la tabla 2.13 se muestran las condiciones optimizadas para la determinación de glutatión y γ-GluCis intracelulares mediante HPLC-FLUO.

Fase estacionaria	Columna Spherisorb S3 ODS2 (Waters) 250mmx4.6mm, 3 μ
Fase Móvil	Fase A 96% Acetato sódico 50mM pH=7.65 Fase B 4% Acetonitrilo
V inyección (μ L)	10
Elución	Isocrático
Profundidad de la aguja	1.0mm
T carrusel muestra ($^{\circ}$ C)	(4.0 \pm 1.0) $^{\circ}$ C
T columna ($^{\circ}$ C)	(35.0 \pm 5.0) $^{\circ}$ C
Fluorescencia (λ_{medida})	Excitación 340nm/ Emisión 420nm; Ganancia 10
Duración ($t_{retención}$)	12min (γ -GluCis=4.19min y GSH=5.33min)
Modo de medida	Áreas
Réplicas	1

Tabla 2.13: Parámetros instrumentales

4.6.4.2. Desarrollo

Tras un periodo de tiempo de cultivo, se toma 1mL del caldo en el que se encuentran inmersas las células objeto de estudio. Se centrifuga a 10000rpm durante dos minutos. Se lavan las células con 1mL de agua milli-Q y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones, se descarta el sobrenadante. El pellet se resuspende en 300 μ L de ácido tricloroacético (7.5%), se rompen las células mediante agitación en vortex durante cinco minutos y se centrifuga durante dos minutos a 12000rpm. A continuación se toman 100 μ L del sobrenadante y se diluyen con 300 μ L de agua milli-Q hasta un volumen final de 400 μ L agitando vigorosamente en vortex durante un minuto.

Una vez preparados patrones y muestras del modo descrito anteriormente, en una serie de viales cromatográficos de vidrio se toman 20 μ L de cada patrón/muestra, se le añaden 340 μ L de buffer (fosfato potásico 0.6M, pH=7.8) y se agita suavemente. A continuación se añaden 340 μ L del agente reductor compuesto por una mezcla de TCEP (1.25mM) en HCl (0.2M) y se deja reposar durante 15min en oscuridad. La muestra así preparada se diluye adicionando 800 μ L de OPA (12mM/AcNa 50mM), se agita durante un minuto en vortex y se deja reaccionar en nevera a 4 $^{\circ}$ C durante 15 minutos. Por último, se inyecta en el HPLC-Fluorescencia. En caso de tener que conservar las muestras, se mantendrán a -20 $^{\circ}$ C el tiempo necesario hasta el momento de la inyección (no más de 15 horas). En la figura 2.8 se muestra el cromatograma obtenido para los patrones, siguiendo este método.

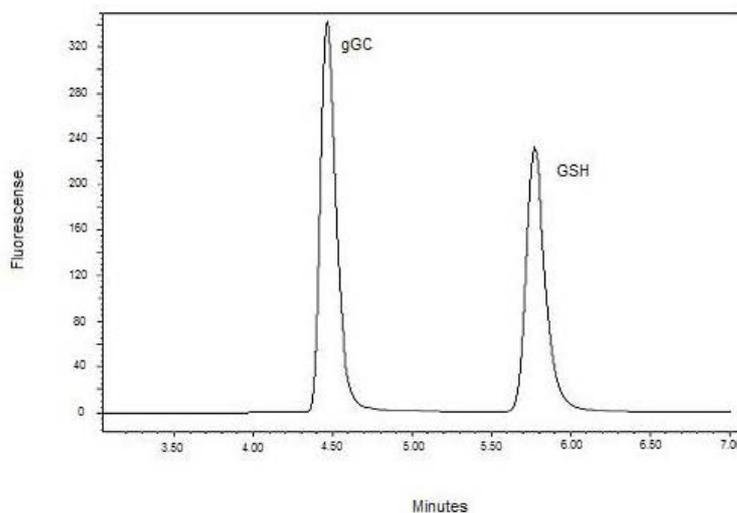


Figura 2.8: Cromatograma representativo de los patrones utilizados en el método de determinación de gamma-glutamylcisteína (gGC) y glutatión (GSH) por HPLC-Fluorescencia

4.6.4.3. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en $\mu\text{moles/litro}$ de glutatión y $\gamma\text{-GluCis}$. Dicha concentración se determina mediante interpolación del área correspondiente a cada una de las muestras en la función de calibración obtenida con los patrones de concentración conocida.

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

La concentración final en el vial teniendo en cuenta la dilución realizada será:

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

La concentración expresada en mg/L de la muestra de partida será:

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

donde

C_{muestra} :	Concentración de la muestra de partida (mg/L)
C_{final} :	Concentración en el vial (μM)
V_{TCA} :	Volumen de TCA empleado, $300\mu\text{L}$
V_{muestra} :	Volumen de muestra centrifugado, $1000\mu\text{L}$
PM_C :	Peso molecular de glutatión o dipéptido, tiene un valor de 307.4 y de $250.3 \mu\text{g}/\mu\text{mol}$, respectivamente

5. VELOCIDADES ESPECÍFICAS Y RENDIMIENTOS

Velocidad específica de crecimiento, μ :

La velocidad específica de crecimiento se puede calcular a partir de los datos experimentales de concentración de biomasa de las muestras. La velocidad específica de crecimiento se define como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Se puede calcular a partir de nuestros datos experimentales de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{1}{\bar{X}} \cdot \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{1}{\bar{X}} \cdot \frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}, \quad h^{-1}$$

donde:

X : moles de biomasa

\bar{X} : valor promedio de biomasa = $(X_i + X_{i-1})/2$, mol

t : tiempo, h

i : número de muestra

Velocidad específica de consumo de sustrato, q_s :

La velocidad específica de consumo de sustrato se define como:

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X$$
$$q_s = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt}$$

Se puede calcular a partir de los datos experimentales de la siguiente forma:

$$q_s = \frac{1}{\bar{X}} \frac{S_{i-1} - S_i}{t_i - t_{i-1}}$$

donde

S : moles de sustrato

\bar{X} : valor promedio de biomasa = $(X_i + X_{i-1})/2$, mol

t : tiempo, h

i : número de muestra

El cálculo de la velocidad específica de consumo de sustrato para que sea comparable en distintos medios de cultivo se va a calcular como:

$$q_s \left(\frac{\text{mol C consumidos}}{\text{mol biomasa} \cdot h} \right) = \frac{(\text{moles de carbono consumidos})_i}{\bar{X} (\text{mol}) \cdot (t_i - t_{i-1})}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{mol} \cdot h}$$

donde

$$(\text{moles C consumidos})_i = (\text{moles C})_{i-1} - (\text{moles C})_i$$

Velocidad específica de producción de etanol, q_E :

Se define q_E como la velocidad específica de producción de etanol. Los valores negativos de esta variable indicarán que en lugar de producirse etanol, se estará consumiendo.

$$\frac{dE}{dt} = q_E \cdot X$$

$$q_E = \frac{1}{X} \cdot \frac{dE}{dt}$$

$$q_E = \frac{1}{\bar{X}} \frac{E_i - E_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{h}}$$

donde

\bar{E} : moles de etanol

\bar{X} : valor promedio de biomasa = $(X_i + X_{i-1})/2$, mol

t : tiempo, h

i : número de muestra

Velocidad específica de producción del metabolito P, q_P :

En general y para cualquier metabolito (P) que se produce durante el cultivo, se puede calcular la velocidad específica de producción de P como:

$$\frac{dP}{dt} = q_P \cdot X$$

$$q_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

$$q_P = \frac{1}{\bar{X}} \frac{P_i - P_{i-1}}{t_i - t_{i-1}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{h}}$$

donde

\bar{P} : moles del metabolito que corresponda

\bar{X} : valor promedio de biomasa = $(X_i + X_{i-1})/2$, mol

t : tiempo, h

i : número de muestra

Velocidad específica de consumo del metabolito P, q_P :

En general y para cualquier metabolito (P) que se consume durante el cultivo, se puede calcular la velocidad específica de consumo de P como:

$$\frac{dP}{dt} = -q_P \cdot X$$
$$q_P = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

Se puede calcular a partir de los datos experimentales de la siguiente forma:

$$q_P = \frac{1}{\bar{X}} \frac{P_{i-1} - P_i}{t_i - t_{i-1}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{mol} \cdot \text{h}}$$

donde

- P : moles del metabolito que corresponda
- \bar{X} : valor promedio de biomasa = $(X_i + X_{i-1})/2$, mol
- t : tiempo, h
- i : número de muestra

El concepto de sustrato limitante da la posibilidad de definir rendimientos del proceso. Los rendimientos globales, calculados a partir de datos experimentales de crecimiento, dependen de la fuente de carbono utilizada y de las condiciones de operación, y pueden variar a lo largo del proceso. Se pueden calcular los siguientes rendimientos:

Rendimiento biomasa producida / sustrato consumido:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{moles de biomasa producidos}}{\text{moles de Carbono consumidos}}$$

Rendimiento producción de etanol / producción de biomasa:

$$Y_{E/X} = \frac{\text{Máxima concentración de etanol (mol)}}{\text{Biomasa a la concentración de etanol máxima (mol)}}$$

En general, el rendimiento de producción de un metabolito A con respecto al consumo de un metabolito B, se calcula como:

Rendimiento metabolito A producido / metabolito B consumido:

$$Y_{A/B} = \frac{\text{moles de metabolito A producidos}}{\text{moles de metabolito B consumidos}}$$

6. OXÍGENO ABSORBIDO Y DIÓXIDO DE CARBONO DESPRENDIDO

6.1. CAUDALES DE AIRE A LA ENTRADA Y A LA SALIDA

Las corrientes de gas a la entrada y a la salida pueden suponerse formadas por tres componentes: inertes (N_2 fundamentalmente), O_2 y CO_2 . El aire también arrastrará algo de vapor de agua y de los componentes volátiles que puedan formarse (etanol), sobre todo si no se humidifica previamente. Sin embargo, la presión de vapor del agua a $30^\circ C$ es: $P_{V_{H_2O}} = 4245.5$ Pa (CRC Handbook) que comparada con la presión ambiente media en Granada, del orden de $710\text{mmHg} \cdot 94659$ Pa, implicaría una fracción molar de vapor de agua en el aire de salida si saliera saturado con respecto al agua pura de: $y_{H_2O} = 4245.5/94659 = 0.045$, aunque será apreciablemente menor por el efecto de los iones y solutos disueltos en el medio de cultivo que disminuyen la presión de vapor. Una simplificación aplicable es considerar el gas formado por N_2 , O_2 y CO_2 , por tanto:

gas de entrada (E)	$y_{N_2E} + y_{O_2E} + y_{CO_2E} = 1$	$y_{N_2E} = 1 - y_{O_2E} - y_{CO_2E}$
gas de salida (S)	$y_{N_2S} + y_{O_2S} + y_{CO_2S} = 1$	$y_{N_2S} = 1 - y_{O_2S} - y_{CO_2S}$

Según el caudal de entrada en condiciones de 710mmHg y $30^\circ C$ y considerando comportamiento de gases ideales, se puede calcular el caudal de gas a la entrada:

$$m_E = \frac{P \cdot q_E}{R \cdot T} = \frac{(710/760) \cdot q_E (\text{L/min}) \cdot 60 \text{ min}}{(0.082) \cdot (303.15)} \cdot \frac{1}{1h}, \quad \text{moles/h}$$

donde

q_E : Caudal de aire a la entrada en cada instante (L/min)

El caudal de nitrógeno a la entrada es: $m_E y_{N_2E} = m_E (1 - y_{O_2E} - y_{CO_2E})$, moles/h; puesto que éste no se absorbe ni se desprende, al poco tiempo de empezar el medio de cultivo estará saturado con respecto al nitrógeno y su caudal de salida será el mismo:

$$m_E (1 - y_{O_2E} - y_{CO_2E}) = m_S (1 - y_{O_2S} - y_{CO_2S})$$

ecuación que permite calcular el caudal molar de salida, ya que se conocen las composiciones molares de oxígeno y dióxido de carbono tanto a la entrada como a la salida:

$$m_S = m_E \frac{1 - y_{O_2E} - y_{CO_2E}}{1 - y_{O_2S} - y_{CO_2S}}, \quad \text{moles / h}$$

Puesto que hay un gran exceso de N_2 y las fracciones molares de O_2 y CO_2 varían poco ambos caudales serán muy próximos. Si se considerara que el aire entra seco y sale saturado con respecto al agua, la ecuación anterior sería:

$$m_S = m_E \frac{1 - y_{O_2E} - y_{CO_2E}}{1 - y_{O_2S} - y_{CO_2S} - 0.045}, \quad \text{moles / h}$$

Si el aire se humidifica a 30°C con el mismo medio de cultivo:

$$m_S = m_E \frac{1 - y_{O_2E} - y_{CO_2E} - y_{H_2O_E}}{1 - y_{O_2S} - y_{CO_2S} - y_{H_2O_S}}, \quad \text{moles / h}$$

donde las fracciones molares del agua serían prácticamente iguales y menores de 0.045.

6.2. CAUDAL DE O_2 ABSORBIDO Y DE CO_2 DESPRENDIDO

Para llevar a cabo un balance de oxígeno y conocer el caudal de oxígeno absorbido, será necesario conocer la fracción molar de oxígeno en las corrientes de entrada y salida, ya que:

$$m_{O_2A} = y_{O_2E}m_E - y_{O_2S}m_S, \quad \text{moles / h}$$

donde

m_{O_2A} :	Caudal de oxígeno absorbido (mol/h)
m_E :	Caudal de aire entrante (mol/h)
m_S :	Caudal de aire saliente (mol/h)
y_{O_2E} :	Fracción molar de oxígeno en el caudal de aire entrante
y_{O_2S} :	Fracción molar de oxígeno en el caudal de aire saliente

Mientras haya consumo de alguna fuente de carbono se estará formando dióxido de carbono. El caudal de dióxido de carbono desprendido se puede calcular como:

$$m_{CO_2D} = y_{CO_2S}m_S - y_{CO_2E}m_E, \quad \text{moles / h}$$

donde

m_{CO2D} :	Caudal de dióxido de carbono desprendido (mol/h)
m_E :	Caudal de aire entrante (mol/h)
m_S :	Caudal de aire saliente (mol/h)
y_{CO2E} :	Fracción molar de CO_2 en el caudal de aire entrante
y_{O2S} :	Fracción molar de CO_2 en el caudal de aire saliente

6.3. OXÍGENO TOTAL ABSORBIDO Y DIÓXIDO DE CARBONO TOTAL DESPRENDIDO

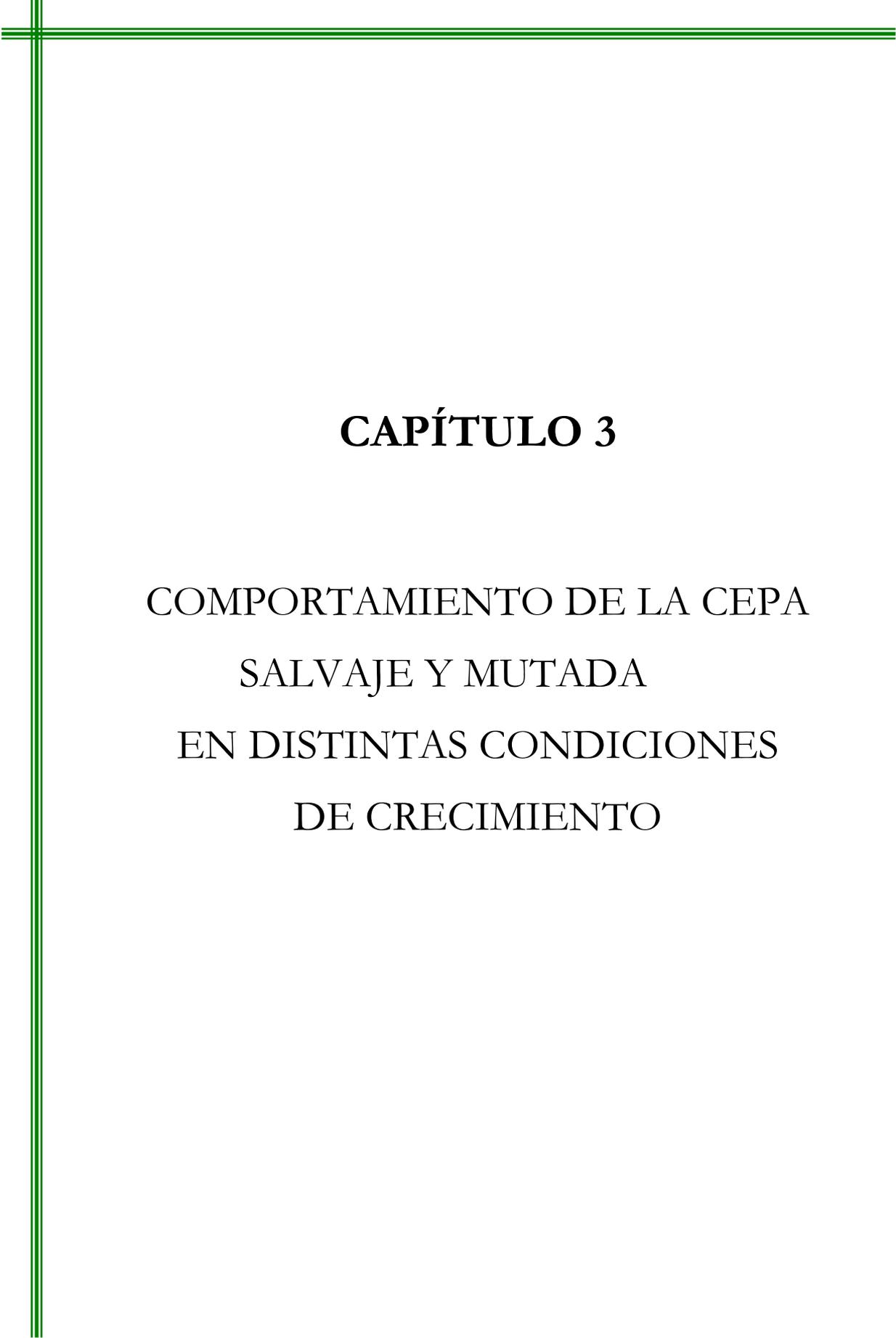
Al disponer, por los análisis de las corrientes gaseosas de entrada y salida, de los valores puntuales de moles de oxígeno absorbidos por hora, m_{O2A} , y de los valores puntuales de moles de CO_2 desprendidos por hora, m_{CO2D} , para los tiempos en que se han tomado las muestras, se puede calcular a esos tiempos el oxígeno total absorbido y el CO_2 total desprendido mediante las integrales numéricas:

$$M_{O_2} = \int_0^t m_{O_2A} dt, \quad \text{moles de } O_2$$

$$M_{CO_2} = \int_0^t m_{CO_2D} dt, \quad \text{moles de } CO_2$$

7. REFERENCIAS

- Alpaz M., Bursali N., Ertunc S. and Akay B. 1997. Application of a statistical technique to the production of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26: 91-96.
- Busto O., Miracle M., Guasch J. and Borrull F. 1997. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with on-column fluorescence derivatization. *J. of Chrom. A.* 757: 311-318.
- Cereser C., Guichard J., Drai J., Bannier E., García I., Boget S., Parvaz P. and 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 (1): 123-132.
- CRC Handbook of Chemistry and Physics. Lide D.R. 79th edition. 1998-1999.
- Crueger W. y Crueger A. 1989. "Biotecnología: Manual de microbiología industrial". Editorial Acribia S.A.
- Curtin L.V. 1983. Molasses: General considerations. In "Molasses in animal nutrition", National Feed Ingredients Association, Iowa.
- Phenomenex. 2003. "Chromatography columns and supplies". Catálogo Phenomenex 03/04, pp 148.
- SGE (2003-2004). Catálogo de aplicaciones de SGE, pp 30.
- Supelco. 1999. "HPLC Carbohydrate Column Selection Guide". Bulletin 887B. T195887B.



CAPÍTULO 3

COMPORTAMIENTO DE LA CEPA
SALVAJE Y MUTADA
EN DISTINTAS CONDICIONES
DE CRECIMIENTO

CAPÍTULO 3 COMPORTAMIENTO DE LA CEPA SALVAJE Y MUTADA EN DISTINTAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

1. INTRODUCCIÓN	77
2. METODOLOGÍA	78
2.1. CEPAS	78
2.2. CONDICIONES DE OPERACIÓN	78
2.3. MEDIOS DE CULTIVO	79
3. ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA SALVAJE	
<i>S. cerevisiae</i> 1328	80
3.1. VELOCIDADES ESPECÍFICAS: μ , q_s , q_E	80
3.2. RENDIMIENTOS: $Y_{X/S}$, $Y_{E/X}$	82
3.3. MEDIO DE CULTIVO ELEGIDO	83
4. COMPARACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE LA CEPA SALVAJE	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1328 Y EL DE LA MUTADA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
MT-32	83
4.1. CRECIMIENTO EN MATRAZ DE <i>S. cerevisiae</i> 1328 Y <i>S. cerevisiae</i> MT-32	84
4.2. CRECIMIENTO EN BIORREACTOR DISCONTINUO DE LA CEPA SALVAJE (<i>S. cerevisiae</i>	
1328) Y DE LA MUTADA (<i>S. cerevisiae</i> MT-32)	86
4.3. CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTADA <i>S. cerevisiae</i> MT-32 BAJO LIMITACIÓN DE	
OXÍGENO	88
5. CONTROL Y MONITORIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
MT-32 Y PRODUCCIÓN DE GSH EN MEDIO DE MELAZAS Y CORN STEEP	
LIQUOR, EN REACTOR DISCONTINUO	90
5.1. CONSUMO DE OXÍGENO Y PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO	90
5.2. CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO	91
5.3. CONTROL DE pH: ADICIÓN DE BASE Y ÁCIDO	92
5.4. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL METABOLISMO DE <i>S. cerevisiae</i> MT-32 SIN LIMITACIÓN	
DE O ₂	93
6. REFERENCIAS	94

1. INTRODUCCIÓN

A la hora de desarrollar un proceso industrial destinado a la producción de un metabolito de origen microbiano, hay que considerar varios aspectos:

- El aislamiento del microorganismo de interés, la detección de los metabolitos deseados y la conservación del microorganismo aislado para la producción industrial estable
- La mejora de las cepas aisladas para incrementar el rendimiento
- El diseño del proceso de fermentación

No todos los microorganismos pueden tener una aplicación industrial, pero los que se utilizan con este objetivo son el resultado de cuidadosos procesos de selección que conducen a una especialización metabólica muy elevada. Además, siempre existe la posibilidad de la introducción de cambios de tipo genético en un microorganismo o célula para mejorar sus propiedades. Un microorganismo susceptible de ser utilizado en un proceso industrial debe reunir una serie de condiciones para que esta utilización se produzca en condiciones óptimas. El microorganismo debe ser normalmente un cultivo puro, capaz de reproducirse en las condiciones de laboratorio y de la planta industrial. Otra característica importante es que crezca rápidamente, en el medio de cultivo más asequible y barato, y se obtenga el producto deseado en el menor tiempo posible. Finalmente, el microorganismo debe ser susceptible a la manipulación genética, tanto por su naturaleza biológica, como por el conocimiento y disponibilidad de las herramientas genéticas adecuadas para realizarla (Alvero, 1998).

Uno de los métodos utilizados para la producción industrial de glutatión es la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*. Aunque la cantidad de GSH presente en la cepa salvaje es alta, se suelen hacer mutaciones de forma que inicialmente se parta de una cantidad elevada de glutatión intracelular, la cual se puede incrementar posteriormente mediante una estrategia apropiada de cultivo en el biorreactor (Li et al., 2004). Las condiciones de operación de un biorreactor en el cual se controlan parámetros críticos del crecimiento (temperatura, pH, aeración) deben permitir una mejora en el rendimiento de la cepa que se vaya a utilizar.

Es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos porque es necesario poder predecir cómo va a evolucionar un cultivo, cómo va a ir consumiéndose el sustrato y cómo se va a ir acumulando el producto de una fermentación. Sin conocer estos factores es muy imprudente iniciar el cultivo en un fermentador de elevado volumen, puesto que no podemos predecir qué va a pasar, cuándo va a completarse el crecimiento, cómo se va a acumular el producto, etc..

En este capítulo se analizará el mejor medio de cultivo para el crecimiento de *S. cerevisiae* teniendo también en cuenta el aspecto económico. Se comparará una cepa salvaje (*S. cerevisiae* 1328) y otra mutada (*S. cerevisiae* MT-32) en dos condiciones de operación, matraz y biorreactor, para ver las diferencias entre ambas cepas bajo las condiciones del proceso de selección (matraz) y en el cultivo en biorreactor, donde las condiciones se controlan a los valores óptimos para el microorganismo. Se estudiará la evolución de sustratos, productos y variables de operación en el crecimiento de *S. cerevisiae* MT-32 en biorreactor para un cultivo aerobio y un cultivo con limitación de oxígeno. El conocimiento que se desprende de la cinética de crecimiento del microorganismo se aplicará posteriormente para dirigir la optimización del proceso de producción de glutatión y nos permitirá saber cómo está evolucionando cada uno de los cultivos que se puedan preparar de esta cepa en el mismo medio.

2. METODOLOGÍA

2.1. CEPAS

La cepa salvaje utilizada es *Saccharomyces cerevisiae* 1328 de la CECT. Esta cepa se somete a dos rondas de mutación con NTG y se obtiene la cepa mutada *Saccharomyces cerevisiae* MT-32.

2.2. CONDICIONES DE OPERACIÓN

Las condiciones de operación en el matraz y en el reactor se detallan a continuación.

Matraz

Se parte de un preinóculo de 24 horas de 10mL de YEPD líquido con una colonia procedente de una placa de YEPD sólido. A las 24 horas se mide la densidad óptica a 600nm de cada uno de los cultivos (1328 y MT-32) y se traspasa el volumen necesario para partir de una densidad óptica de 0.04 en un volumen de 1 litro de medio (melazas 6.8g/L y corn steep liquor 2.4g/L). Se utiliza un matraz de 2 litros estéril. Tras inocular se coloca el matraz en un agitador orbital a 30°C y 250rpm.

Reactor

Como el tiempo de cultivo en el biorreactor es elevado, la forma de preparación del preinóculo se ha elegido de forma tal que la inoculación se pueda llevar a cabo de forma automática mediante control por el software. De esta forma si se inocula durante la madrugada podremos tomar muestras durante todo el día y abarcar el periodo final de la fermentación que es el que presenta una mayor evolución.

Se inoculan 150mL de YEPD líquido con una colonia de la cepa correspondiente. Se utiliza una botella pyrex de 250mL con una varilla agitadora; la botella se coloca en un baño de vaselina a 30°C. El reactor con 1350mL de medio de cultivo (melazas + corn steep liquor), se inocula a las 32 horas. El volumen final de reacción es de 1500mL. Las condiciones de operación iniciales para el cultivo aerobio son:

T = 30°C
pH = 5
Agitación = 200rpm
Caudal de aire = 1.5L/min

Durante el cultivo se controla el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio, de forma que siempre esté por encima de un 20%. Para ello, se van modificando la agitación y aeración hasta llegar a unos valores máximos de 400rpm y 3L/min, respectivamente.

Si el cultivo se quiere llevar a cabo en condiciones de limitación de oxígeno, no se controla el porcentaje de oxígeno disuelto mediante cambios en la agitación y aeración, sino que se mantienen unos valores constantes de 200rpm y 1.5L/min, respectivamente.

2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Para realizar una comparativa entre distintos medios de cultivo, el número de átomos de carbono debe ser el mismo en cada uno de ellos. En el caso del medio que consta de corn steep liquor, también el número de átomos de nitrógeno debe ser el mismo que en aquellos medios en los que se han añadido sales, despreciando el aporte de nitrógeno procedente del extracto de levadura. Como composición base partimos del medio definido de glucosa que tiene la siguiente composición:

Glucosa: 5 g/L

$$n^{\circ} \text{ átomos de Carbono} / L = \frac{5 \text{ g/L}}{180.16 \text{ g/mol}} \cdot \frac{6 \text{ at C}}{\text{mol}} = 0.1665$$

(NH₄)₂SO₄: 0.5 g/L

$$n^{\circ} \text{ átomos de Nitrógeno} / L = \frac{0.5 \text{ g/L}}{132 \text{ g/mol}} \cdot \frac{2 \text{ mol NH}_4^+}{\text{mol (NH}_4)_2\text{SO}_4} \cdot \frac{1 \text{ at N}}{\text{mol NH}_4^+} = 0.00758$$

Las melazas sintéticas las consideramos compuestas por un 40% de sacarosa, 10% de glucosa y 12% de fructosa (R&H Hall, Technical Bulletins). En el caso de las melazas industriales el cálculo de su composición se realiza tomando sólo en cuenta los átomos de carbono procedentes de la sacarosa, que es el componente mayoritario (40%). Para el líquido de maceración del maíz suponemos que tiene un 4% de nitrógeno (Crueger y Crueger, 1989).

Con estas consideraciones, los medios de cultivo utilizados para este estudio se detallan en la tabla 3.1.

Medio	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Fructosa (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	Yeast extract (g/L)	Melazas (g/L)	Corn Steep Liquor (g/L)
Medio definido glucosa	5	-	-	0.5	0.3	0.05	0.2	-	-
Medio definido sacarosa	-	4.75	-	0.5	0.3	0.05	0.2	-	-
Medio definido fructosa	-	-	5	0.5	0.3	0.05	0.2	-	-
Melazas sintéticas	3.12	0.78	0.94	0.5	0.3	0.05	0.2	-	-
Melazas industriales sin sales	-	-	-	-	-	-	-	7.8	-
Melazas industriales con sales	-	-	-	0.5	0.3	0.05	0.2	7.8	-
Melazas industriales con corn steep liquor	-	-	-	-	-	-	-	7.8	2.65

Tabla 3.1: Composición de los medios de cultivo utilizados para analizar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 1328

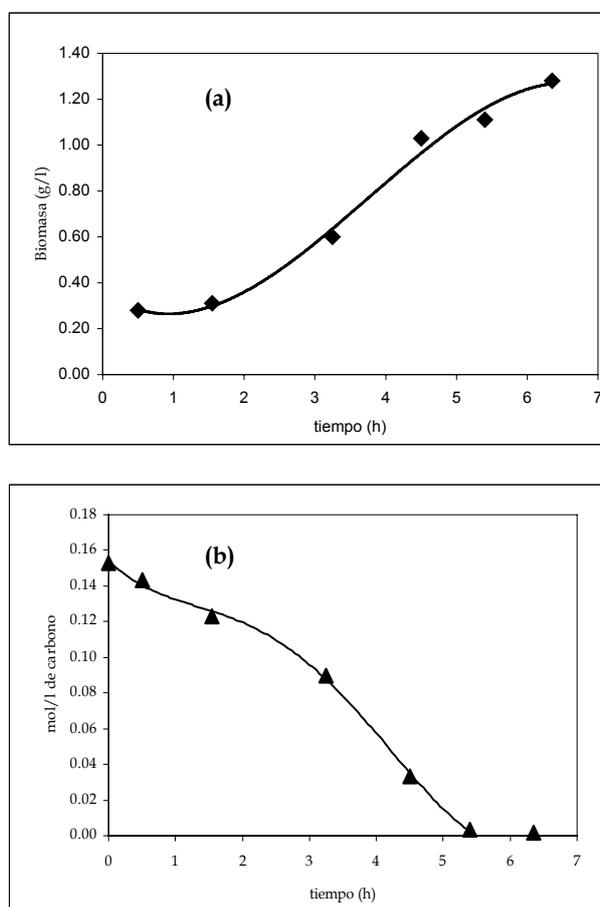
3. ELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA CEPA SALVAJE *S. cerevisiae* 1328

La elección del medio de cultivo se realiza a partir de cultivos de *S. cerevisiae* 1328 en distintos medios. Para comparar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 1328 en los diferentes medios de cultivo se calculan una serie de variables cinéticas como son la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo de sustrato, velocidad específica de generación de etanol y también el rendimiento de biomasa y de etanol (tal y como se describe en el Capítulo 2 de Materiales y Métodos). Para disminuir los errores que se puedan cometer en los cálculos, se ha decidido utilizar los ajustes por polinomios de los datos experimentales. Las figuras que representan los cálculos de estos parámetros sólo se detallan para uno de los medios empleados, el medio definido de glucosa. Un análisis similar se ha desarrollado para el resto de medios de cultivo.

3.1. VELOCIDADES ESPECÍFICAS: μ , q_S , q_E

Con el fin de tener un mayor número de datos de biomasa, etanol y moles de carbono, los valores experimentales de los diferentes batches se ajustaron por polinomios. A partir de estos polinomios se recalcularon los valores de biomasa, etanol y moles de carbono para pequeños intervalos de tiempo. Estos nuevos valores fueron los utilizados para calcular las velocidades específicas de crecimiento, producción de etanol y consumo de la fuente de carbono. Los moles de carbono experimentales para cada muestra se calcularon a partir de los moles de glucosa, fructosa y sacarosa de cada una de ellas.

Las gráficas de biomasa, etanol y moles de carbono se muestran en la figura 3.1.



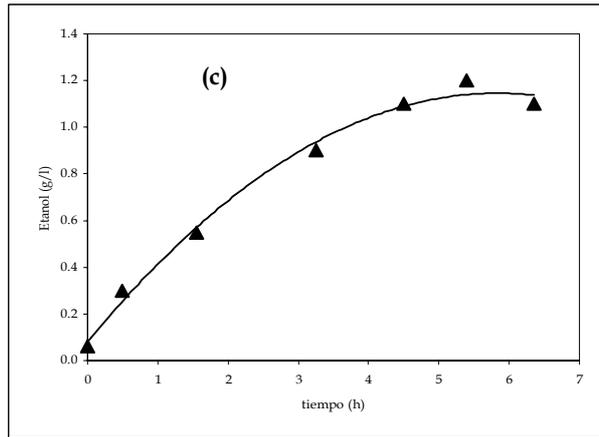


Figura 3.1: Ajuste de los valores experimentales de (a) biomasa, (b) carbono y (c) etanol por polinomios

Las evoluciones de la velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo de carbono y velocidad específica de síntesis de etanol, se muestran en la figura 3.2.

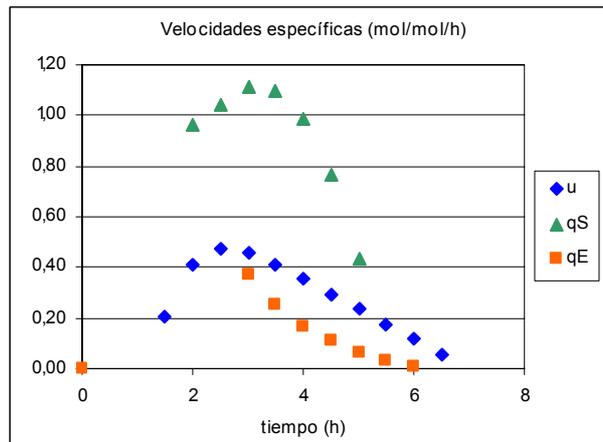


Figura 3.2: Velocidad específica de crecimiento, velocidad específica de consumo de carbono y velocidad específica de síntesis de etanol para un cultivo de *S. cerevisiae* 1328 en medio definido de glucosa

El curso de la velocidad específica de consumo de sustrato se asemeja al seguido por la velocidad específica de crecimiento, al aumentar q_s aumenta μ y al disminuir q_s también lo hace μ . La velocidad de producción de etanol es mayor a tiempos de cultivo pequeños. Conforme avanza la fermentación, esta velocidad va disminuyendo hasta hacerse prácticamente cero cuando $t = 5$ horas (cuando se ha consumido la glucosa). A partir de este tiempo se consume etanol y los valores de velocidad específica serán negativos si se calculan como velocidades de formación.

En la tabla 3.2 se detallan los valores de velocidades específicas máximas para cada uno de los medios de cultivo.

Medio de cultivo	μ máxima (1/h)	q_s máxima (mol/mol/h)	q_E máxima (mol/mol/h)
Medio definido glucosa	0.473	0.929	0.29
Medio definido sacarosa	0.333	0.697	0.43
Medio definido fructosa	0.486	0.876	0.28
Melazas sintéticas	0.470	0.843	0.49
Melazas industriales sin sales	0.447	1.302	0.41
Melazas industriales con sales	0.612	1.380	0.98
Melazas industriales con corn steep liquor	0.656	1.373	1.24

Tabla 3.2: Velocidades específicas máximas de crecimiento, consumo de carbono y producción de etanol de *S. cerevisiae* 1328 para distintos medios de cultivo

Otros valores obtenidos para la velocidad específica de crecimiento máxima de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en un cultivo batch son:

$$\mu=0.32-0.33 \text{ h}^{-1} \text{ (Olsson y Nielsen, 2000)}$$

$$\mu=0.45 \text{ h}^{-1} \text{ a partir de glucosa (Hall, 1981)}$$

$$\mu=0.542 \text{ h}^{-1} \text{ a partir de sacarosa (Hall, 1981)}$$

3.2. RENDIMIENTOS: $Y_{X/S}$, $Y_{E/X}$

Como se considera que en todos los casos el sustrato se ha consumido completamente, los moles/litro de carbono consumidos en cada uno de los medios será de 0.167, que es el número de moles de carbono de partida en cada uno de ellos. En la tabla 3.3 se muestran los rendimientos de biomasa a partir del sustrato consumido.

De la figura 3.1 (c) podemos conocer el máximo valor de concentración de etanol a un determinado tiempo. El valor de biomasa correspondiente a este tiempo de cultivo se obtiene de la figura 3.1 (a). Los valores obtenidos de rendimientos de producción de etanol en función de la biomasa producida se encuentran también en la tabla 3.3.

Medio de cultivo	$Y_{X/S}$ (mol biomasa/mol C)	$Y_{E/X}$ (mol etanol/mol biomasa)
Medio definido glucosa	0.509	0.608
Medio definido sacarosa	0.478	1.296
Medio definido fructosa	0.555	0.577
Melazas sintéticas	0.479	1.042
Melazas industriales sin sales	0.343	0.917
Melazas industriales con sales	0.444	1.607
Melazas industriales con corn steep liquor	0.478	1.896

Tabla 3.3: Rendimiento biomasa/sustrato y etanol/biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* 1328 para distintos medios de cultivo

3.3. MEDIO DE CULTIVO ELEGIDO

Comparando entre sí los medios definidos (tabla 3.2 y tabla 3.3), se observa que el microorganismo crece con una mayor velocidad específica a partir de fructosa, generando un mayor rendimiento de biomasa/sustrato y una menor producción de etanol (menor $Y_{E/X}$). Para el crecimiento a partir de sacarosa ocurre todo lo contrario, μ_{max} y $Y_{X/S}$ son los valores más pequeños y $Y_{E/X}$ el más grande. Las melazas sintéticas, formadas principalmente por sacarosa, presentan una velocidad de crecimiento muy similar a la glucosa y a la fructosa (esto podría deberse a que el microorganismo disocia el disacárido de sacarosa en sus monosacáridos correspondientes para posteriormente utilizarlos como nutrientes). Los valores de rendimientos $Y_{X/S}$ y $Y_{E/X}$ para este medio sintético son muy parecidos a la sacarosa, que es el componente mayoritario.

Las melazas industriales con sales y con corn steep liquor son los medios que presentan las mayores velocidades de crecimiento. A su vez la velocidad específica de producción de etanol es bastante elevada en comparación al resto de medios. Al ser q_E elevada el rendimiento en etanol será alto. Si se desvían los átomos de carbono hacia la producción de etanol, los destinados a la producción de biomasa disminuirán según el metabolismo de la célula, obteniéndose por tanto un menor rendimiento en biomasa. También se observa de la tabla 3.2 que la velocidad de consumo de sustrato es elevada; podría entonces tener lugar un metabolismo *overflow* que explicaría el alto rendimiento en etanol y el bajo rendimiento en biomasa. Si comparamos los medios de melazas entre sí, y si nos fijamos en los valores de rendimientos de biomasa, el medio de melazas con corn steep liquor presenta un valor que es un 39.4% superior al de las melazas sin sales y un 7.6% superior al de las melazas con sales.

Aunque los medios de glucosa y fructosa son los que presentan los mayores rendimientos en biomasa, la diferencia de precio con las melazas, que es un subproducto y, por tanto, mucho más barato, hace que el coste total del proceso sea menor cuando se emplean melazas. También interesa utilizar corn steep liquor como fuente de nitrógeno para que el rendimiento en biomasa sea mayor, ya que la ausencia de nitrógeno disminuye tanto la velocidad de crecimiento como el rendimiento de biomasa. La velocidad de consumo de sustrato en los medios de melazas supera al obtenido a partir de medios definidos puros. Si nos fijamos tanto en q_E como en $Y_{E/X}$, observamos que sus valores para las melazas con corn steep liquor son los más elevados de entre todos los medios estudiados.

Se elige el medio de melazas y corn steep liquor como el más apropiado para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 1328 porque presenta una elevada velocidad de crecimiento y un alto rendimiento de biomasa (sólo superado por los medios definidos de glucosa y fructosa). Además tiene la ventaja de ser un medio de cultivo barato por tratarse de subproductos de otros procesos industriales.

Todos estos resultados los aplicamos a la cepa mutada *S. cerevisiae* MT-32, y así toda la experimentación que se va a realizar con esta cepa se desarrollará en un medio de melazas y de corn steep liquor; sin embargo, para acortar el tiempo de cultivo se disminuirá la concentración del medio que aparece en la tabla 3.1; se mantendrá la misma relación carbono:nitrógeno, pero las concentraciones a utilizar serán de 6.8g/L para las melazas y 2.4g/L para el corn steep liquor.

4. COMPARACIÓN ENTRE EL METABOLISMO DE LA CEPA SALVAJE *Saccharomyces cerevisiae* 1328 Y EL DE LA MUTADA *Saccharomyces cerevisiae* MT-32

En este apartado se comparan el crecimiento de ambas cepas en las condiciones de selección (matraz) y en las condiciones de operación (biorreactor). El medio de cultivo utilizado en la

comparación entre la cepa salvaje y la mutada mantiene la relación C/N, pero la concentración es algo inferior para intentar acortar el tiempo de fermentación (melazas 6.8g/L y corn steep liquor 2.4g/L).

4.1. CRECIMIENTO EN MATRAZ DE *S. cerevisiae* 1328 Y *S. cerevisiae* MT-32

Los resultados obtenidos de las muestras tomadas a lo largo del tiempo para cultivos en matraz de ambas cepas se muestran en la figura 3.3.

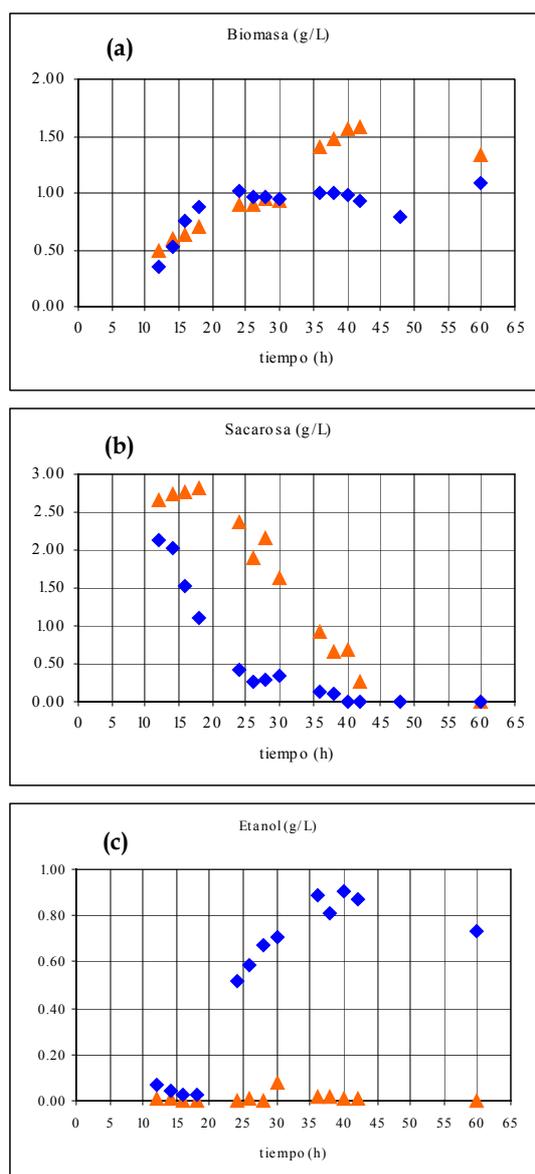


Figura 3.3: Evolución con el tiempo de la concentración de biomasa (a), concentración de sacarosa (b) y concentración de etanol en un cultivo de la cepa salvaje (▲) y otro de la cepa mutada (◆) en matraz

Si se observa la figura 3.3 (a) se aprecia que la velocidad de crecimiento es mayor inicialmente para la célula mutada, aunque la célula salvaje continúa creciendo a tiempos grandes hasta alcanzar valores de la concentración de biomasa superiores. La desaparición de sacarosa, figura 3.3 (b) confirma estos resultados, consumiéndose a tiempos menores en el cultivo de la cepa mutada. Si nos fijamos en la figura 3.3 (c) de síntesis de etanol, la cepa mutada produce una elevada concentración de

etanol mientras que la cepa salvaje produce una concentración despreciable del mismo. Teniendo en cuenta los comentarios de las dos figuras anteriores, este resultado sugiere que la limitación por oxígeno que se produce en el matraz afecta antes y de manera más intensa a la cepa mutada, de forma que bajo condiciones anaerobias en el interior de la célula se produce etanol, lo cual justifica la mayor síntesis de biomasa observada en *S. cerevisiae* 1328. Además se observa de la figura 3.3 (b) que la velocidad de consumo de sacarosa es mayor en MT-32 (0.14 [g/L sacarosa]/h) que en 1328 (0.11 [g/L sacarosa]/h); una velocidad de consumo elevada de fuente de carbono puede saturar la ruta del piruvato hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y redirigir el flujo de carbono hacia síntesis de etanol, tal como se explicó en el apartado 5 del Capítulo 1.

En cuanto al metabolismo de síntesis de GSH (ver figura 3.4) podemos decir que se encuentra más favorecido en la cepa mutada. Tanto la concentración específica de dipéptido como la de glutatión en esta cepa superan los valores obtenidos para la cepa salvaje.

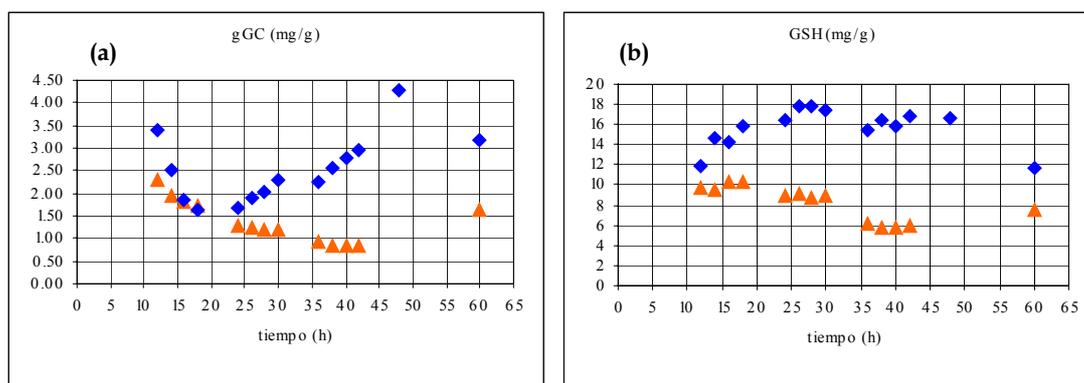


Figura 3.4: Evolución con el tiempo de la concentración específica de dipéptido (a) y concentración específica de glutatión (b) para la cepa salvaje (▲) y mutada (◆) en matraz

En la figura se aprecia que la concentración específica de dipéptido en la cepa mutada comienza a superar a la concentración en la salvaje cuando comienza a ser limitante la fuente de sacarosa. La concentración específica de gGC es un 260% superior en la cepa mutada con respecto a la salvaje a las 42 horas de cultivo. En cuanto al glutatión la diferencia entre ambas cepas se produce desde que la cepa mutada empieza a consumir sacarosa y hasta que ésta comienza a ser limitante. La concentración específica de GSH para la mutante es un 182% superior al valor obtenido para la salvaje a las 42 horas. Aunque la concentración de biomasa sea menor en *S. cerevisiae* MT-32 en comparación a la cepa salvaje, la mayor concentración específica tanto de dipéptido como de glutatión permite que esta cepa tenga valores de producción total de dipéptido y glutatión superiores a la cepa salvaje en un 112% y 66% (a las 42 horas), respectivamente. Esto se puede apreciar en la figura 3.5.

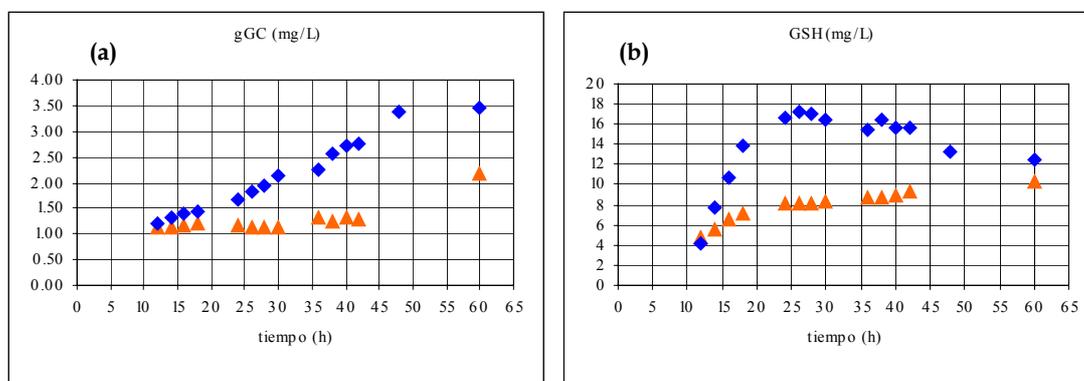


Figura 3.5: Evolución con el tiempo de la concentración total de dipéptido (a) y concentración total de glutatión (b) para la cepa salvaje (*S. cerevisiae* 1328) (▲) y la mutada (*S. cerevisiae* MT-32) (◆) en matraz

4.2. CRECIMIENTO EN BIORREACTOR DISCONTINUO DE LA CEPA SALVAJE (*S. cerevisiae* 1328) Y DE LA MUTADA (*S. cerevisiae* MT-32)

Los resultados de crecimiento de ambas cepas en un biorreactor de 2L se muestran en la figura 3.6.

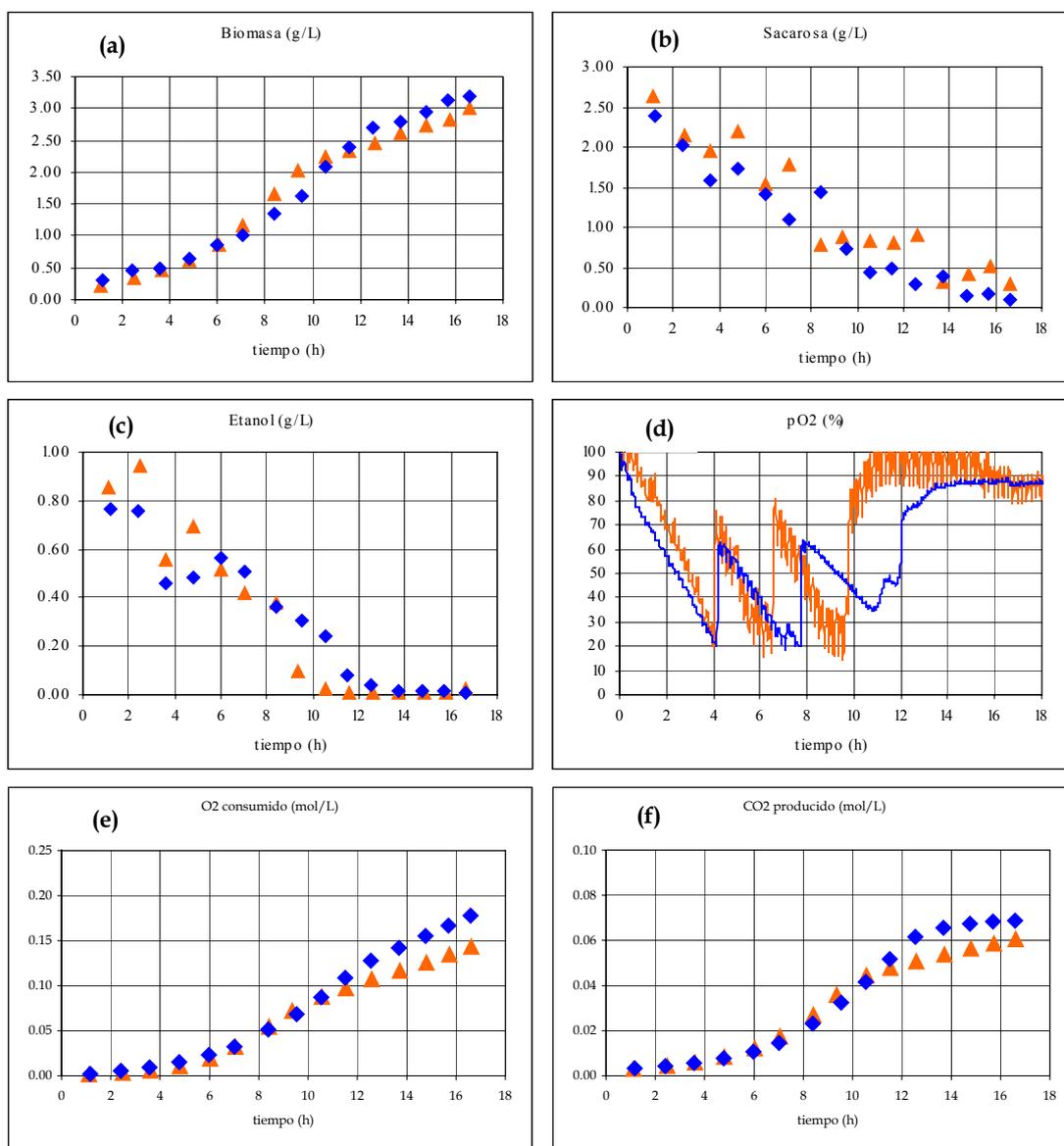


Figura 3.6: Cultivo de *S. cerevisiae* 1328 (▲, —) y *S. cerevisiae* MT-32 (◆, —) en biorreactor de 2L con medio de melazas (6.8g/L) y CSL (2.4g/L). Evolución con el tiempo de la concentración de biomasa (a), concentración de sacarosa (b), concentración de etanol (c), porcentaje de oxígeno disuelto (d), oxígeno consumido (e) y dióxido de carbono producido (f)

La única diferencia apreciable en la figura 3.6 es que el cultivo de *S. cerevisiae* 1328 alcanza el estado estacionario unas dos horas antes que *S. cerevisiae* MT-32 como se puede observar en la figura 3.6 (d) de evolución de oxígeno disuelto. La concentración inicial de etanol en el medio de cultivo procede del preinóculo y se consume a la vez que la sacarosa, figuras 3.6 (b) y (c). En la figura 3.6 (d) se puede ver la evolución del oxígeno en ambos cultivos. No se observan diferencias significativas en

el consumo de oxígeno ni producción de CO₂ entre los dos microorganismos, figuras 3.6 (e) y (f); únicamente que la cepa salvaje alcanza antes el estado estacionario.

Cuando el crecimiento del microorganismo se lleva a cabo en un biorreactor, las principales diferencias entre la cepa salvaje y la mutada están relacionadas con la concentración específica de glutatión (figura 3.7).

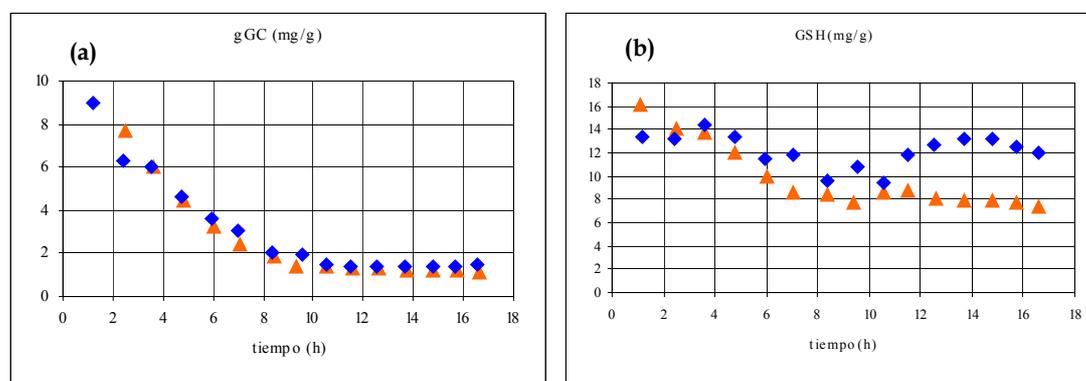


Figura 3.7: Cultivo de *S. cerevisiae* 1328 (▲) y *S. cerevisiae* MT-32 (◆) en biorreactor de 2L con medio de melazas (6.8g/L) y CSL (2.4g/L). Evolución con el tiempo de la producción específica de dipéptido (a) y producción específica de glutatión (b)

Se observa en la figura 3.7, que a partir de las 11 horas de cultivo se produce la principal diferencia entre ambas cepas; en *S. cerevisiae* 1328 la producción de GSH alcanza el estado estacionario mientras que en *S. cerevisiae* MT-32 se incrementa, dando lugar a un incremento casi del doble de la producción total (de 23 a 39mg/L) en un periodo de unas 3 horas (de 11 a 14h). Los valores de concentración total y específica de GSH de *S. cerevisiae* MT-32 con respecto a *S. cerevisiae* 1328 son superiores en un 70 y 60% respectivamente.

El metabolismo de ambas cepas en un cultivo en biorreactor difiere del metabolismo llevado a cabo en un cultivo en matraz. En el biorreactor se controlan unos parámetros de operación, como son el caudal de aire a la entrada, la agitación y el pH. Estos parámetros optimizan el proceso puesto que el microorganismo no va a tener limitación por oxígeno, hecho en el que también tiene influencia el propio diseño del equipo (baffles, palas agitadoras y difusor), y el pH durante el cultivo siempre se mantendrá en el valor óptimo correspondiente al microorganismo. Estas condiciones de crecimiento tienen como resultado una concentración de biomasa superior a cuando el cultivo se desarrolla en matraz, donde existe limitación por oxígeno y donde los parámetros de crecimiento no se mantienen en un valor óptimo.

La menor síntesis de biomasa en matraz en comparación con la de en reactor, se puede deber además a que en el biorreactor se está partiendo de una determinada concentración de biomasa y de etanol procedente del preinóculo y el microorganismo consume el etanol junto con la sacarosa. Para preparar el preinóculo del biorreactor se utiliza como medio de cultivo YEPD; en este medio y a las 32 horas, la concentración de biomasa y de etanol son elevadas, de 3.63g/L y 8.15g/L, respectivamente, que para un 10% de inóculo corresponden en el reactor a unos valores de concentración de biomasa de 0.36g/L y de etanol de 0.82g/L. En el biorreactor también se parte de una concentración específica de GSH determinada, el cual se degrada en una primera etapa. En ambas cepas el momento en que deja de degradarse glutatión parece coincidir con el momento en que cesa el consumo de sacarosa. Después la cepa *S. cerevisiae* 1328 mantiene el valor alcanzado de producción específica de GSH; sin embargo, *S. cerevisiae* MT-32 experimenta posteriormente un incremento en la producción específica de GSH durante un intervalo de 3 horas (de 11 a 14 horas de cultivo).

Podemos concluir que:

- Ante condiciones de estrés nutricional, la cepa *S. cerevisiae* MT-32 presenta una mayor respuesta en sus sistemas antioxidantes en comparación a *S. cerevisiae* 1328; esto se observa en la mayor concentración específica de GSH en *S. cerevisiae* MT-32.
- La operación en biorreactor de *S. cerevisiae* MT-32 permite una optimización con respecto al cultivo de esta misma cepa en matraz, tanto del crecimiento del microorganismo que es un 194% superior como de su concentración total de glutatión que es un 130% superior.

4.3. CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTADA *S. cerevisiae* MT-32 BAJO LIMITACIÓN DE OXÍGENO

Hemos visto que cuando el cultivo se lleva a cabo en un biorreactor, donde se pueden controlar parámetros críticos del crecimiento, como son el pH y el aporte de oxígeno, se optimiza el crecimiento de la cepa en comparación a cuando el cultivo se lleva a cabo en matraz; la síntesis de biomasa en el biorreactor llega a ser un 200% superior. Sin embargo, la producción de glutatión era mayor cuando el cultivo se desarrollaba en matraz. El estrés al que pueda estar sometido el microorganismo en un matraz, donde no se controla la cantidad de oxígeno disuelto y éste puede llegar a ser limitante, podría ser responsable de la mayor síntesis de GSH. Esto nos lleva a estudiar qué ocurriría con el metabolismo de síntesis de GSH si el cultivo se lleva a cabo en un biorreactor en el cual no se controla la cantidad de oxígeno disuelto. Los resultados obtenidos los comparamos con el experimento control en la figura 3.8.

De las gráficas de evolución de biomasa, sacarosa y etanol, se puede pensar que la limitación de oxígeno afecta principalmente a la velocidad de consumo de etanol. Si calculamos la pendiente del tramo en que se consume etanol tanto para el control como para el cultivo con limitación de O₂ tenemos que la velocidad de consumo de etanol en cada caso es de 0.083 y 0.032 (g/L etanol)/h, respectivamente. Una velocidad de consumo de etanol menor supone una menor velocidad de crecimiento. El valor máximo de biomasa obtenido en ambos casos es el mismo, lo único que ocurre es que la limitación de O₂ alarga el tiempo de cultivo.

Los valores de concentración específica de dipéptido y GSH obtenidos para el tiempo de 26 horas son prácticamente los mismos. Sin embargo, en el experimento con limitación de oxígeno no se observa ningún intervalo donde la concentración específica de GSH aumente pasando por un máximo. La elongación en el tiempo de consumo de etanol puede ser responsable de la ausencia de estrés por falta de algún nutriente del medio de melazas y corn steep liquor, y ésta puede ser la razón de que no se produzca ningún incremento en la síntesis de GSH.

Hay que tener en cuenta que en este experimento, donde la transferencia de oxígeno es limitante, no se observa una menor síntesis de biomasa con respecto al control mientras que cuando el cultivo se llevaba a cabo en matraz la biomasa parecía estar inhibida; no se producía metabolismo oxidativo sino fermentativo. Pero un cultivo totalmente anaerobio y en matraz (producción de etanol de 20g/L y biomasa de 22g/L) no presenta concentración de glutatión intracelular. Por eso consideramos que la síntesis de glutatión no tiene relación con la falta de oxígeno, parece más probable que el metabolismo de síntesis de GSH esté relacionado con algún tipo de estrés nutricional.

Además de con el estrés nutricional, podemos relacionar la producción de GSH con los radicales libres generados en la respiración. Para el control en el reactor, la zona de máximo consumo de O₂ coincide con el aumento en la síntesis de GSH y en matraz el incremento en GSH coincide con el aumento en la biomasa (consumo de O₂) y deja de sintetizarse cuando se genera etanol (fermentación) y no hay consumo de oxígeno.

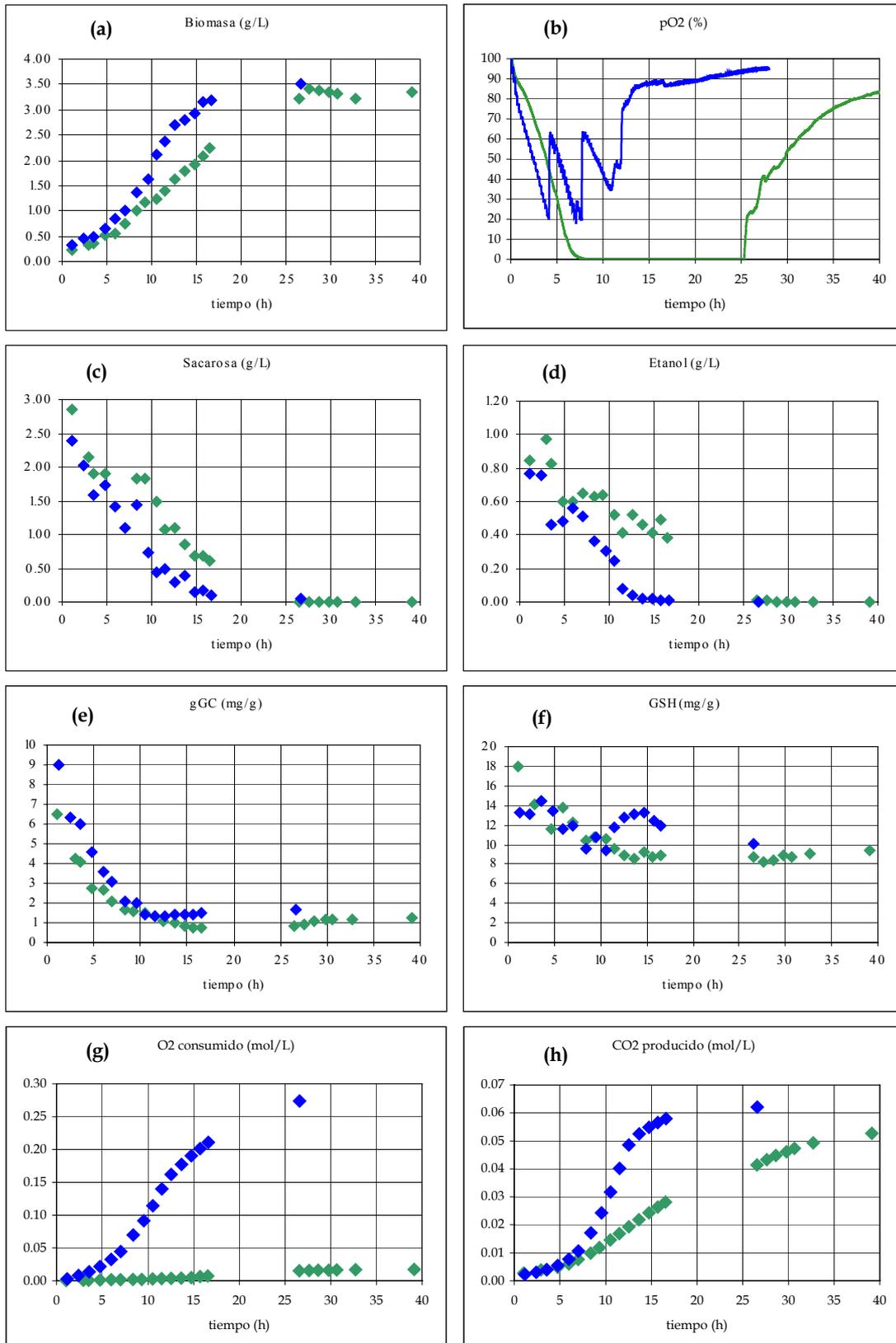


Figura 3.8: Cultivo de *S. cerevisiae* MT-32 con control del oxígeno disuelto por encima de un 20% (♦, —) y sin control del oxígeno disuelto (◆, —) en biorreactor de 2L con medio de melazas (6.8g/L) y CSL (2.4g/L). Evolución con el tiempo de la concentración de biomasa (a), porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (b), concentración de sacarosa (c), concentración de etanol (d), concentración específica de gamma-glutamilcisteína (e), concentración específica de glutatión (f), oxígeno consumido (g) y dióxido de carbono producido (h)

5. CONTROL Y MONITORIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 Y PRODUCCIÓN DE GSH EN MEDIO DE MELAZAS Y CORN STEEP LIQUOR, EN REACTOR DISCONTINUO

Hay una serie de variables de las cuales conocemos su valor de manera instantánea puesto que están siendo monitorizadas a lo largo de la fermentación. Estas variables son los gases a la entrada y salida del biorreactor, el pH, volúmenes de ácido y base añadidos y la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. De la evolución de estas variables se desprende un mayor entendimiento del cultivo.

5.1. CONSUMO DE OXÍGENO Y PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO

Para gases que se comportan como ideales, la fracción molar es equivalente a la fracción volumétrica. A través del espectrómetro de masa EGAS-8 (B. Braun Biotech International) se registran los porcentajes volumétricos de oxígeno tanto en la corriente de aire seco a la entrada como en el caudal de aire que sale del biorreactor (figura 3.9).

En los periodos en los que se produce una bajada del oxígeno en la corriente de salida el microorganismo está creciendo y dividiéndose. Al finalizar la etapa en la que el consumo de oxígeno es máximo cesa dicho consumo y los caudales de oxígeno a la entrada y salida del biorreactor tienden a igualarse. Para tiempos grandes de cultivo se puede decir que el microorganismo ha dejado de consumir oxígeno. La figura 3.9 nos muestra en qué estado de crecimiento se encuentran las células; cualquier cambio brusco en los valores de concentración de oxígeno a la salida puede equivaler a un crecimiento a partir de diferentes sustratos. Cuando las concentraciones a la entrada y a la salida tienden a igualarse se sabe que se ha alcanzado la fase estacionaria del crecimiento.

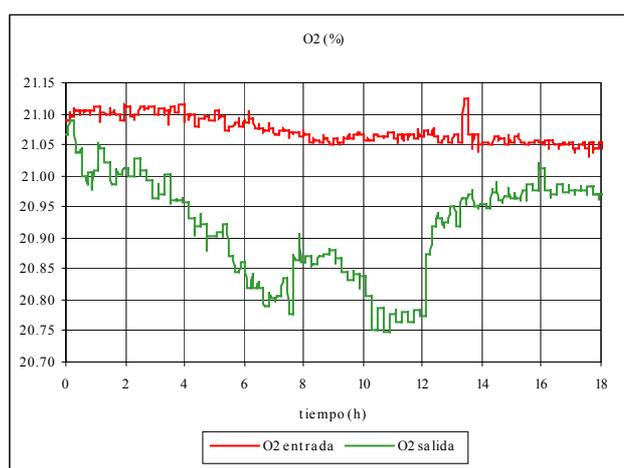


Figura 3.9: Fracción volumétrica de oxígeno en la corriente de entrada (—) y salida (—) en un cultivo de *S. cerevisiae* MT-32 en un biorreactor de 2L

Se observa de la figura 3.9 que a partir de las 14 horas de cultivo se alcanza el estado estacionario y deja de consumirse oxígeno.

Al igual que en el seguimiento del proceso de consumo de oxígeno, para conocer la dinámica de formación de dióxido de carbono se registran en el tiempo los porcentajes de CO₂ en las corrientes de entrada y salida, como se muestra en la figura 3.10.

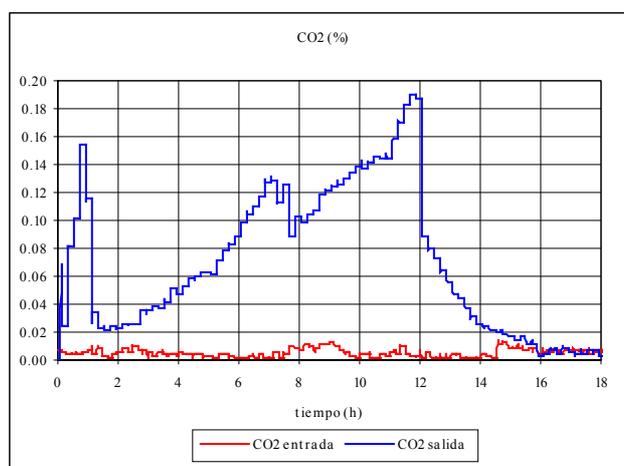


Figura 3.10: Fracción volumétrica de dióxido de carbono en la corriente de entrada (—) y salida (—) en un cultivo de *S. cerevisiae* MT-32 en un biorreactor de 2L

El primer pico que se observa en la figura 3.10, entre 0 y 2 horas, es debido al periodo de inoculación al reactor. A continuación se producen una serie de picos en la concentración de CO₂ en el caudal de aire de salida; la diferenciación puede deberse a que coincidan con el crecimiento a partir de distintas fuentes. Al igual que ocurría con el oxígeno, cuando las concentraciones de CO₂ a la entrada y a la salida tienden a igualarse, se puede decir que se ha alcanzado la fase estacionaria del crecimiento.

5.2. CONTROL DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO

Hay un sensor para el control del oxígeno disuelto que se maneja a través del software. Se establece un límite mínimo para el oxígeno disuelto y al alcanzarse dicho límite se activarán elementos de control para aumentar la cantidad de oxígeno presente en el medio.

La transferencia de oxígeno a la célula durante la aeración del biorreactor implica la transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire a la solución, desde la solución a la célula y la absorción del oxígeno por parte de la célula. La transferencia de oxígeno a partir de las burbujas de aire a la solución es la etapa limitante del proceso, debido a la baja solubilidad del oxígeno en fase líquida. Los factores que influyen en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, $K_L a$, son: velocidad de flujo de aire, grado de agitación, viscosidad del cultivo y formación de espuma. Los elementos empleados para controlar el oxígeno disuelto son la velocidad de flujo de aire y el grado de agitación.

El control de la espuma se realiza por incorporación de un agente químico antiespumante específico al medio (CLEROL LQ217, Cognis Iberia S.L.).

En la figura 3.11 se puede observar la evolución del oxígeno disuelto con el tiempo. Se pueden distinguir las distintas fases de la receta de control desarrollada en el apartado 3.4 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos. Cada cambio producido bien en la agitación o bien en la aeración (cuando $p_{O_2} < 20\%$) se traduce en un aumento de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

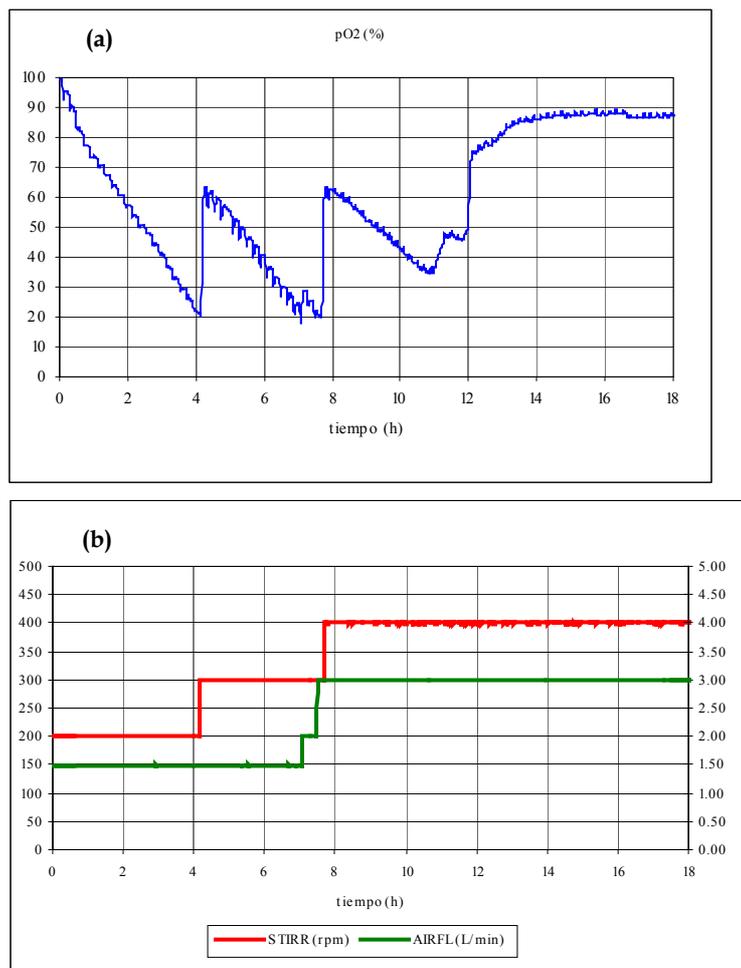


Figura 3.11: Control de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (a), mediante cambios en la agitación (STIRR) y aeración (AIRFL), (b)

5.3. CONTROL DE pH: ADICIÓN DE BASE Y ÁCIDO

La figura 3.12 muestra el proceso de control de pH mediante la adición de ácido o base según corresponda, para mantener un valor constante de pH 5 a lo largo del cultivo.

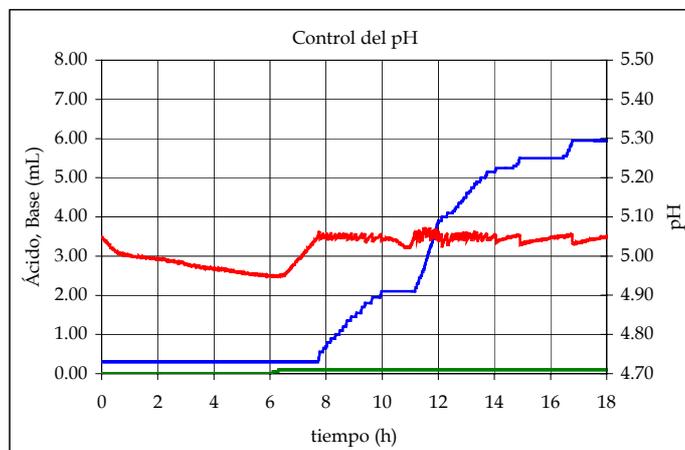


Figura 3.12: Proceso de control a pH=5 (—) mediante adición de H3PO4 2N (—) o KOH 2M (—) en un cultivo de *S. cerevisiae* MT-32 en un biorreactor de 2L

Como se observa, figura 3.12, hasta un tiempo de 8 horas no se produce ningún tipo de adición. A continuación tiene lugar una subida de pH con la consiguiente adición de ácido. Después hay una fase lag (sin adición) seguida de una nueva subida del pH (adición de ácido); sin embargo la velocidad de adición de ácido en ambas etapas es diferente. Posteriormente, no se producen modificaciones en el pH, permanece estable en el setpoint (no hay adiciones), lo cual nos hace saber que se ha alcanzado el estado estacionario. Las curvas de ácido y base nos dan una idea del tipo de compuesto que se puede estar consumiendo; por ejemplo, si se estuviera consumiendo algún componente ácido del medio, se produciría una subida de pH y por tanto observaríamos adición de ácido.

5.4. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL METABOLISMO DE *S. cerevisiae* MT-32 SIN LIMITACIÓN DE O₂

Se ha descrito el comportamiento de una serie de variables de proceso en función del tiempo de cultivo y cómo cada una de ellas varía durante la fermentación. Como todo el metabolismo celular está interrelacionado, vamos a intentar describir el posible funcionamiento del metabolismo con el tiempo, relacionando el comportamiento de los metabolitos entre sí.

Durante las primeras horas (de 3 a 4) tiene lugar una etapa lag en el crecimiento debido a que las células se están adaptando a las nuevas condiciones del cultivo. La fase lag es apreciable en las gráficas de biomasa (no se genera), figura 3.6 (a), de oxígeno (no hay consumo), figura 3.6 (e) y de dióxido de carbono (no se genera), figura 3.6 (f). Justo al final de la fase lag se produce algo de consumo de etanol, figura 3.6 (c).

Luego, y hasta las 7 horas, se puede decir que empieza la fase exponencial del crecimiento. Debido probablemente a que la concentración de sacarosa es elevada, figura 3.6 (b), y esté saturada la ruta del piruvato hacia el ciclo de TCA, se produce algo de generación de etanol. Esta etapa coincide con una primera fase del consumo de oxígeno y no se producen cambios notables en el pH del medio (figura 3.12). Hay una primera fase de síntesis de biomasa, para la cual la velocidad de crecimiento no es muy alta.

A partir de las 7-8 horas y hasta las 11 horas el microorganismo consume tanto sacarosa como etanol. Este cambio del metabolismo se hace evidente en las gráficas de consumo de oxígeno, de producción de CO₂ y síntesis de biomasa. Como se produce consumo de etanol, tiene lugar una subida de pH del medio y se observa que se produce adición de ácido (figura 3.12). El nivel de síntesis de biomasa es el más elevado de todo el periodo de crecimiento desde la inoculación y hasta el estado estacionario.

A partir de las 10-11 horas se ha consumido prácticamente toda la sacarosa y el etanol, a partir de este momento y hasta las 13-14 horas se consumen las bajas concentraciones tanto de sacarosa como de etanol que quedan en el medio, y aumenta la velocidad de consumo de etanol. En esta fase el consumo de oxígeno pasa por un máximo al igual que lo hace la producción de CO₂. La velocidad de síntesis de biomasa es inferior a la del periodo anterior. Se observa además un incremento en la concentración específica de GSH, figura 3.7 (b), y cesa la desaparición de dipéptido, figura 3.7 (a). En la gráfica de la evolución del ácido se produce una fase lag desde las 10 hasta las 11 horas y que coincide con este nuevo cambio (a condiciones más restrictivas) y desde las 11 hasta las 14 horas sigue añadiendo ácido, aunque a dos velocidades distintas (figura 3.12). La mayor velocidad de adición de ácido tiene lugar desde las 11 hasta las 12 horas; este periodo de tiempo coincide con la mayor velocidad de síntesis de glutatión, mayor consumo de oxígeno y mayor producción de CO₂.

Ya una vez agotada las fuentes de nutrientes la célula entra en estado estacionario, no se produce consumo de oxígeno ni producción de CO₂. No se observa proliferación celular y por tanto el GSH al ser un metabolito primario también alcanza el estado estacionario.

Las curvas de adición de ácido y base nos permiten conocer el estado del metabolismo en el que se encuentra la célula. Además tienen la ventaja de mostrar el estado real del metabolismo y de manera instantánea, ya que se están registrando los valores en cada momento (cada 15 segundos).

6. REFERENCIAS

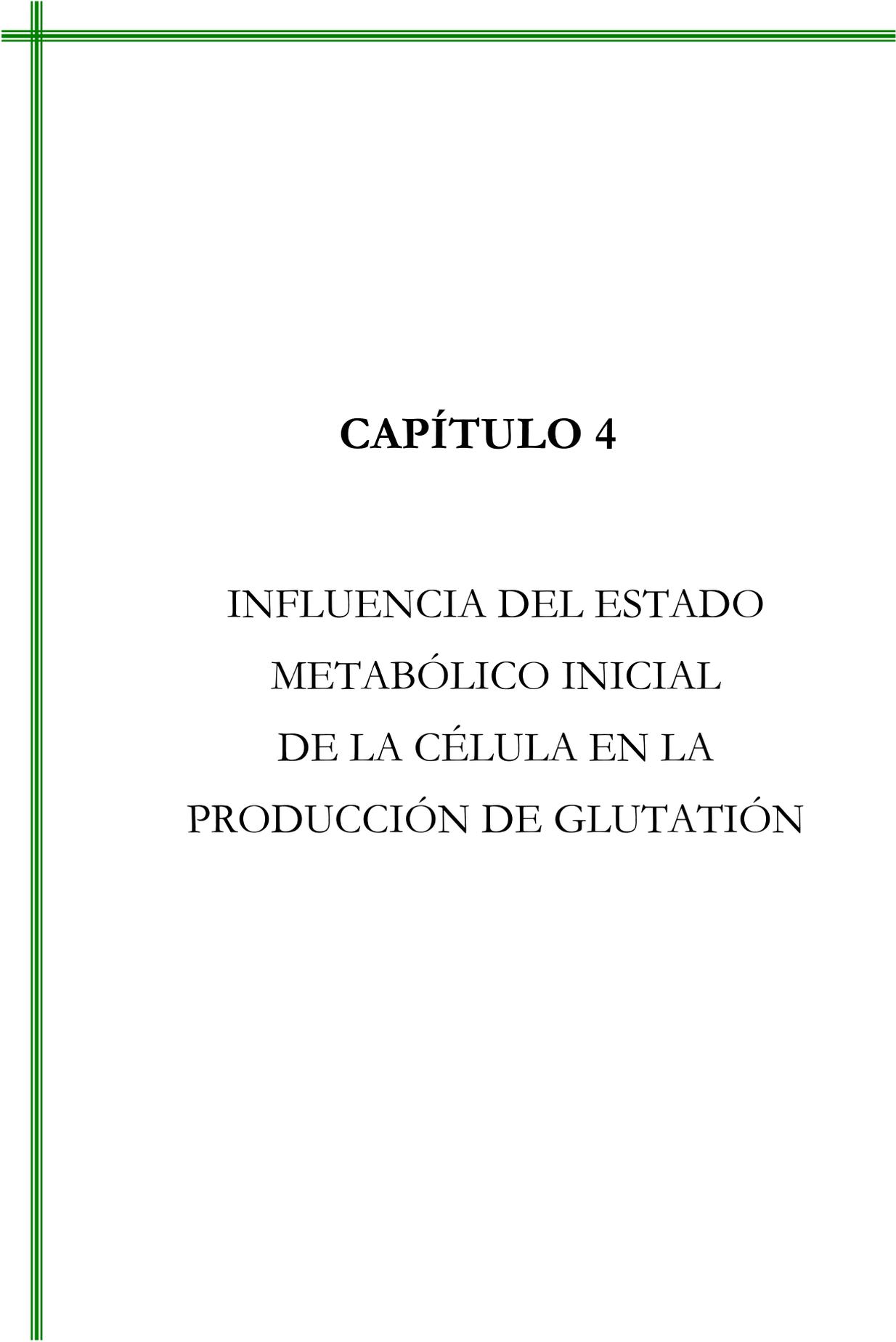
Alvero C.C. 1998. Biología de los microorganismos y células de interés industrial. En: "Ingeniería Bioquímica". Editorial Síntesis S.A.

Crueger W. y Crueger A. 1989. "Biotecnología: Manual de microbiología industrial". Editorial Acribia S.A.

Hall R.J. 1981. Simulation of the integration of the internal energy metabolism and the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 23: 1763-1795.

Olsson L. and Nielsen J. 2000. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. Enzyme and Microbial Technology 26: 785-792.

R&H Hall, Technical Bulletins: www.rhhall.ie/bulletins/molasses_4.htm



CAPÍTULO 4

INFLUENCIA DEL ESTADO METABÓLICO INICIAL DE LA CÉLULA EN LA PRODUCCIÓN DE GLUTATIÓN

CAPÍTULO 4 INFLUENCIA DEL ESTADO METABÓLICO INICIAL DE LA CÉLULA EN LA PRODUCCIÓN DE GLUTATIÓN

1. INTRODUCCIÓN	99
2. ESTUDIO DE LAS VELOCIDADES DE ALIMENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS	99
3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS EN DIFERENTES FASES DEL CRECIMIENTO	101
3.1. FASES DEL CRECIMIENTO ANALIZADAS	101
3.2. RESPUESTA EN EL CRECIMIENTO DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS	103
3.3. SÍNTESIS DE DIPÉPTIDO Y GLUTATIÓN EN FUNCIÓN DEL MOMENTO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS	106
3.4. ANÁLISIS DEL ESTADO INICIAL DE LA CÉLULA	108
4. REFERENCIAS	110

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo principal que nos planteamos en este trabajo es estudiar la influencia de los aminoácidos constituyentes del GSH en su metabolismo de producción en la cepa mutada. La respuesta de la levadura ante el estrés, y, por tanto, la síntesis de sus sistemas antioxidantes, entre ellos el glutatión, depende de las condiciones del medio que cambian durante la evolución del cultivo, y del estado de desarrollo de la levadura. Por eso, primero nos planteamos estudiar el estado metabólico de la levadura en el que la adición de cisteína, glutamato o glicina, pueda tener mayor influencia sobre la formación de GSH.

La mejor manera de realizar este estudio sería conociendo el modo de alimentación óptimo, en pulsos o de forma continua, y la concentración óptima de cada aminoácido. Sin embargo, ocurre que para la elección de estos dos factores también haría falta conocer el momento de alimentación óptimo. Se trata de un problema circular y consideramos que el momento de alimentación es el primer problema que se debe resolver y una vez optimizado éste, se profundizará en las condiciones de alimentación.

Vamos a realizar el estudio de la influencia del estado metabólico inicial de la célula en la producción de glutatión con adición tanto de cisteína como de glutamato, para asegurarnos una producción elevada de dipéptido y, por tanto, de glutatión. La estrategia que se ha elegido seguir es alimentar los aminoácidos de manera continua y con caudales constantes para asegurarnos que no exista limitación de éstos, empleando distintas relaciones de velocidades de alimentación (glutamato/cisteína). Con la mejor relación de velocidades se pasa a analizar la velocidad de alimentación de cisteína óptima, al ser éste el aminoácido limitante.

Al final de esta experimentación conoceremos unos valores de velocidades de alimentación de cisteína y glutamato que nos garantizarán una mayor producción de GSH en comparación a un cultivo normal. Se utilizarán estas velocidades a diferentes tiempos de cultivo para conocer en qué estado metabólico de la célula tendrá mayor efecto una alimentación de aminoácidos sobre el metabolismo del glutatión.

Según la evolución que se observe en las diferentes variables de proceso podremos elegir cuál es el estado metabólico óptimo para efectuar un estudio posterior de estrategias de control mediante adición de aminoácidos sobre el metabolismo del glutatión.

2. ESTUDIO DE LAS VELOCIDADES DE ALIMENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Para que el estudio del momento de adición de aminoácidos sea significativo debemos partir de unos valores de velocidad de alimentación para ambos aminoácidos que tengan un efecto claro sobre la síntesis tanto de dipéptido como de glutatión. Por eso realizamos en primer lugar dos estudios previos en los cuales se analizarán la mejor relación entre los caudales de ambos aminoácidos y la mejor velocidad de alimentación.

Los resultados obtenidos para las distintas relaciones estudiadas: 0.5, 1.0 y 2.1 (mmol glutamato/h) / (mmol cisteína/h), se muestran en la figura 4.1. El momento de adición en todos los casos coincide con el estado estacionario de la etapa de batch, es decir, cuando ya no se consume oxígeno ni se produce dióxido de carbono. Los valores se comparan para el momento en el que se consigue la concentración específica máxima de GSH para cada caso.

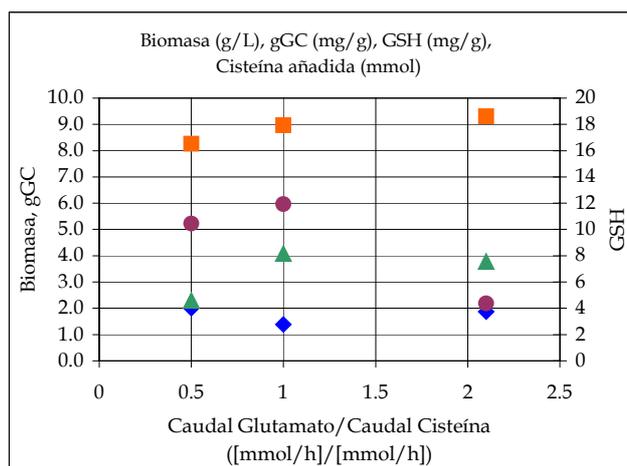


Figura 4.1: Evolución de: ◆ biomasa (g/L), ▲ concentración específica de dipéptido (mg/g), ■ concentración específica de GSH (mg/g) y ● cisteína añadida (mmol) para distintas relaciones entre la velocidad de alimentación de glutamato con respecto a la velocidad de alimentación de cisteína

Se observa de la figura 4.1 que los valores de concentración específica de dipéptido y de GSH para las relaciones de 1.0 y 2.1 son iguales, se ha alcanzado el estado estacionario; sin embargo, la biomasa es algo mayor para la relación más alta. Si nos fijamos en la cantidad de cisteína añadida en el punto de máxima concentración específica de GSH, vemos que ésta disminuye en el último valor de relación de caudales estudiada. En la tabla 4.1 se muestran las velocidades de alimentación de cisteína y glutamato utilizadas para cada estudio. A mayor velocidad de alimentación de cisteína (tabla 4.1) mayor es la cisteína añadida en el punto de máxima concentración específica de GSH (figura 4.1).

Relación Qglu/Qcys	Glutamato (mmol/h)	Cisteína (mmol/h)
0.5	0.25	0.50
1.0	0.77	0.77
2.1	0.56	0.26

Tabla 4.1: Velocidades de alimentación de cisteína y glutamato correspondientes a cada valor de relación de caudales estudiada

La relación más elevada entre velocidad de glutamato con respecto a la velocidad de cisteína utiliza la velocidad de alimentación de cisteína más baja y se consiguen las máximas concentraciones específicas tanto de dipéptido como de GSH. Esta razón económica nos conduce a elegir como relación de caudales a utilizar en posteriores estudios el de 2.1 (mmol glutamato/h)/(mmol cisteína/h). Vamos a modificar el momento de alimentación en la experimentación posterior puesto que en los resultados obtenidos en este caso se producía un descenso en la biomasa por estar trabajando en la fase de muerte celular.

Manteniendo constante la relación entre ambas velocidades en 2.1, vamos a estudiar qué ocurre al cambiar los valores de concentración; el estudio lo realizamos en función de la cantidad de cisteína alimentada, aunque también estamos alimentando glutamato. La alimentación de aminoácidos se realizó a las ocho horas de cultivo y se utilizan las siguientes velocidades de alimentación de cisteína: 0.48, 0.96, 1.30 y 1.59mmol/h junto con las velocidades de adición de glutamato de 1.02, 2.03, 2.73 y 3.41mmol/h respectivamente. Los valores en estado estacionario alcanzados se muestran en la figura 4.2.

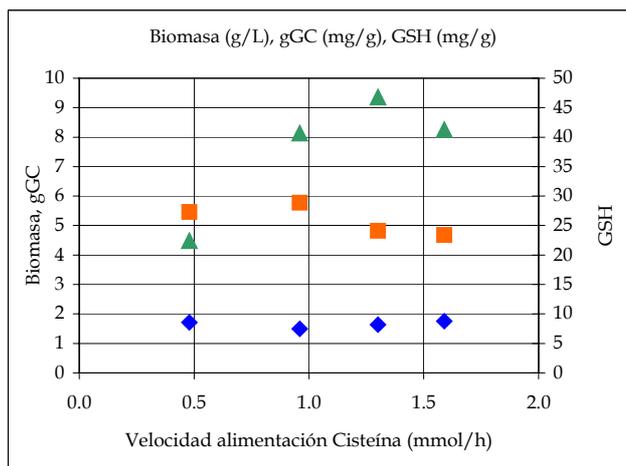


Figura 4.2: Evolución de: ◆ biomasa (g/L), ▲ concentración específica de dipéptido (mg/g) y ■ concentración específica de GSH (mg/g) para distintas velocidades de alimentación de cisteína

Mientras que la biomasa y la síntesis de GSH son muy parecidos para todas las velocidades de alimentación de cisteína estudiadas, se observa una variación en la síntesis de dipéptido el cual aumenta y luego alcanza el estado estacionario a partir de una velocidad de alimentación de cisteína de 0.96mmol/h. Una concentración de dipéptido elevada podrá dar lugar a una mayor producción de GSH si se produce la segunda reacción de síntesis de GSH, la catalizada por el enzima glutatión sintetasa. Por eso, elegimos como concentración óptima aquélla que permita maximizar tanto la concentración específica de dipéptido como la de glutatión. De la figura 4.2 se observa que esto ocurre a partir de la velocidad de alimentación de cisteína de 0.96mmol/h, y elegimos esta concentración como la óptima, puesto que además se estará alimentando la mínima cantidad de aminoácido necesaria. La velocidad de adición de glutamato será 2.1 veces la de cisteína.

En conclusión, elegimos como velocidades de alimentación de cisteína y glutamato, las de 0.96 y 2.03 mmol/h, respectivamente, que equivalen a una relación de 2.1 (mmol glutamato/h)/(mmol cisteína/h).

3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS EN DIFERENTES FASES DEL CRECIMIENTO

3.1. FASES DEL CRECIMIENTO ANALIZADAS

Para determinar la influencia del estado metabólico de la célula en la producción de glutatión añadiremos cisteína y glutamato en distintas fases del crecimiento. La curva de biomasa del cultivo de *S. cerevisiae* MT-32 en biorreactor, analizada en la figura 3.6 (a) del Capítulo 3, nos permite conocer las diferentes fases del crecimiento del microorganismo para el medio de melazas (6.8g/L) y corn steep liquor (2.4g/L).

Se eligen como momentos para la adición los siguientes:

1. **Inicio de la fermentación:** justo tras inocular donde la velocidad específica de crecimiento es nula.
2. **Mitad de la exponencial:** la velocidad específica de crecimiento es máxima e igual a 0.20h^{-1} .
3. **Declinación de la exponencial:** Se produce una bajada en la velocidad específica de crecimiento a $\mu=0.12\text{h}^{-1}$.
4. **Estado estacionario:** las células están entrando en la fase estacionaria del crecimiento debido a falta de nutrientes; en este momento $\mu=0.05\text{h}^{-1}$.

Debido a las diferencias que podrían originarse porque las condiciones del preinóculo no eran exactamente las mismas en todos los casos (cada preinóculo está en un baño de vaselina diferente y con un termostato para controlar la temperatura), se necesita de alguna variable online para controlar y conocer el estado en que se encuentra el cultivo. Como se vio en el Capítulo 3 las curvas de adición de ácido y base coinciden con las distintas etapas de consumo de nutrientes, formación de biomasa, síntesis de dipéptido y glutatión, consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, y por eso las elegimos como referencia para la adición.

Así nos fijamos en las curvas de adición de ácido y base para el experimento control (figura 4.3). La adición de ácido es la que marca las distintas fases en el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 y nos permitirá conocer cuándo debemos alimentar los aminoácidos para coincidir con los distintos estados metabólicos en los que queremos realizar el estudio.

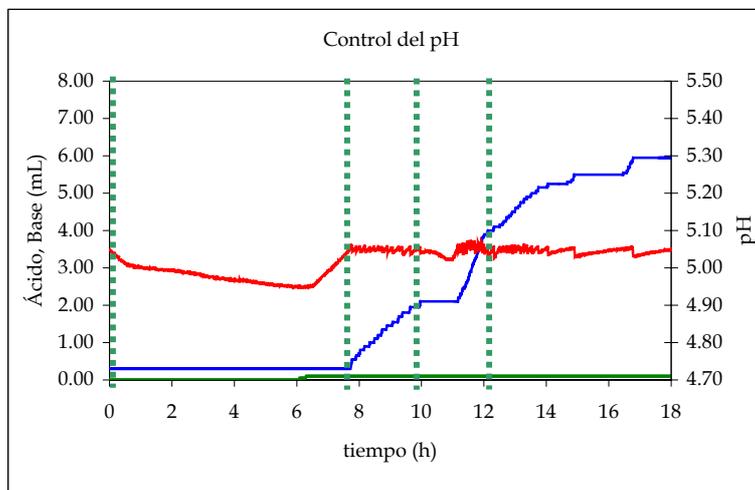


Figura 4.3: Proceso de control a pH=5 (—) mediante adición de H_3PO_4 2N (—) o KOH 2M (—) en un cultivo de *S. cerevisiae* MT-32 en un biorreactor de 2L

Así cuando se observe que empieza a añadirse ácido es cuando se alimentarán cisteína y glutamato para el estado metabólico de mitad de exponencial. Para $\mu=0.12\text{h}^{-1}$, fase de declinación, se añadirán cuando termine esta primera etapa de adición de ácido, es decir cuando se observe que la pendiente del volumen de ácido añadido es cero. Después de este momento tiene lugar una segunda etapa de adición de ácido y cuando se observe que la pendiente del volumen añadido cambia (disminuye) es cuando se alimentarán los aminoácidos para el estado metabólico de principio de estado estacionario.

3.2. RESPUESTA EN EL CRECIMIENTO DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS

El consumo de sacarosa sigue la misma evolución cuando las adiciones se realizan después del comienzo de la fase exponencial (figura 4.4). Sin embargo, cuando los aminoácidos se alimentan al principio de la fermentación provocan un consumo bastante menor de sacarosa.

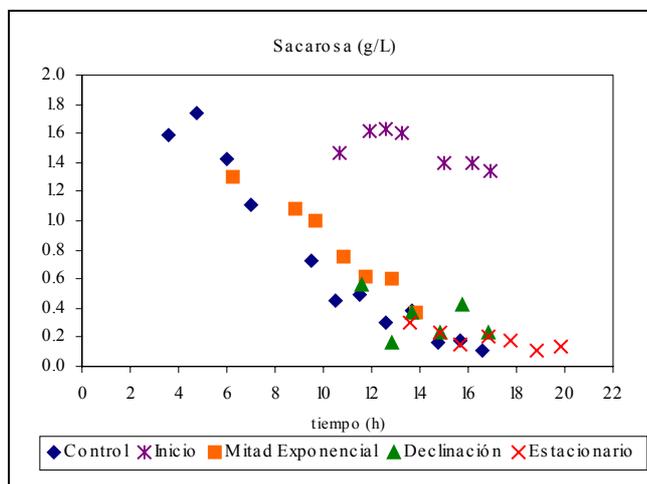


Figura 4.4: Consumo de sacarosa con el tiempo

Cuanto antes se produzca la adición menos biomasa se obtiene, como se observa de la figura 4.5, la síntesis se detiene justo tras alimentar los aminoácidos. Este efecto puede ser debido a la inhibición en el crecimiento producida por la cisteína tal y como lo describen Udeh y Achremowicz (1994) y que está relacionada con la inhibición que provoca la cisteína sobre el consumo de etanol.

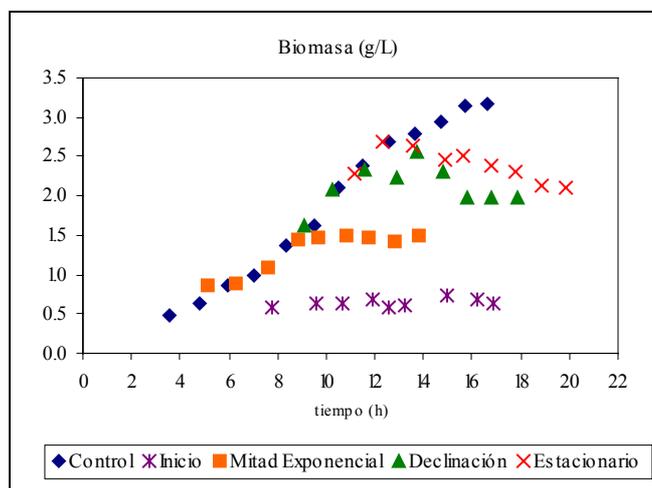


Figura 4.5: Síntesis de biomasa

Cuando se añaden los aminoácidos sí que parece que el consumo de etanol se inhibe; se puede observar en la figura 4.6, que conforme el momento de adición se aleja del estado estacionario se consume menos etanol y esto puede ser la causa de la menor síntesis de biomasa observada en la figura 4.5. Puede ser que incluso parte de la sacarosa consumida que no se utiliza en síntesis de biomasa, se puede estar utilizando en sintetizar algo de etanol además de emplearse en el mantenimiento de las células.

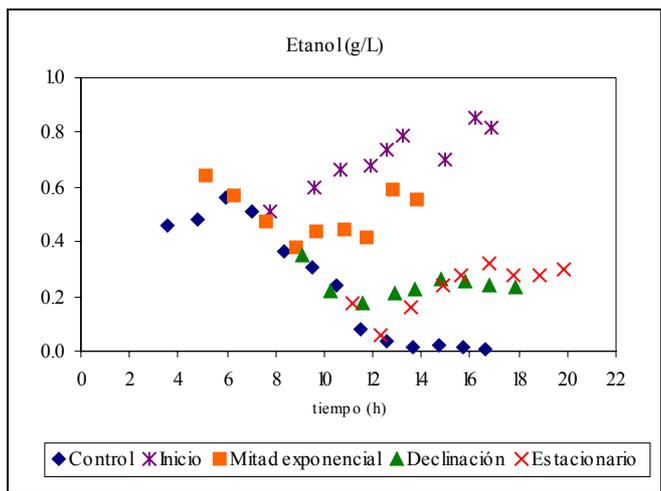


Figura 4.6: Evolución de la concentración de etanol

El momento de adición de aminoácidos también es determinante en el consumo de oxígeno y síntesis de dióxido de carbono. Así cuanto más cerca del inicio de la fermentación se realice la adición y mayor sea la inhibición en el crecimiento, se consume menos oxígeno y se sintetiza menos CO₂ (ver figura 4.7).

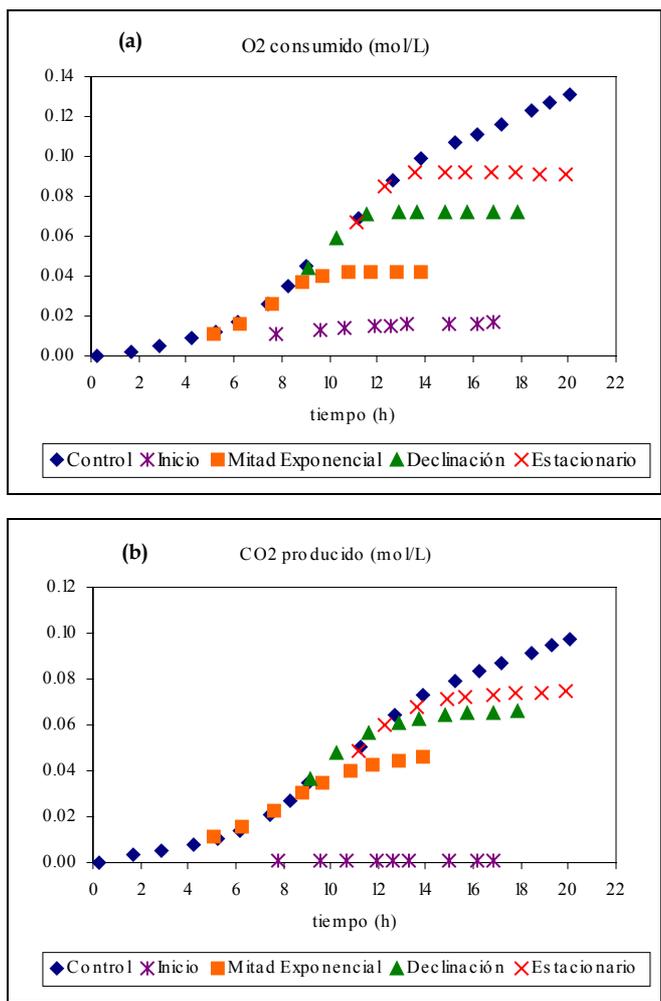


Figura 4.7: (a) Consumo de oxígeno y (b) síntesis de CO₂

Para ver mejor dónde se dirige el flujo de carbono vamos a realizar un balance de moles de carbono. Para calcular la cantidad de carbono consumida tenemos en cuenta los moles de carbono consumidos a partir de la sacarosa, rafinosa, glucosa, fructosa y etanol; para calcular la cantidad de carbono formada se tiene en cuenta los moles de carbono formados de biomasa, etanol y CO₂. En la tabla 4.2 se muestran los resultados obtenidos para los distintos experimentos de adición de aminoácidos y para el control.

Fases del crecimiento	Tiempo (h)	mol C consumido de Sacarosa	mol C consumido de R+G+F	mol C consumido de EtOH	mol C formado de biomasa	mol C formado de EtOH	mol C formado de CO ₂	mol C consumido total	mol C formado total
Control	18.43	0.1499	0.0074	0.0581	0.1380	0.0054	0.1235	0.2154	0.2669
Inicio	15.00	0.0763	0.0037	0.0000	0.0214	0.0107	0.0014	0.0801	0.0335
Mitad Exp.	13.85	0.1295	0.0064	0.0168	0.0652	0.0120	0.0680	0.1527	0.1452
Declinación	17.86	0.1485	0.0073	0.0231	0.0958	0.0052	0.0986	0.1788	0.1996
Estacionaria	19.86	0.1413	0.0069	0.0492	0.1049	0.0162	0.1136	0.1975	0.2347

Tabla 4.2: Balance de carbono para el experimento control y los experimentos con adición de aminoácidos en diferentes fases del crecimiento. R: rafinosa, G: glucosa, F: fructosa

De la tabla 4.2 se observa que en algunos casos el balance de carbono no se cumple, es decir, se sintetiza una cantidad mayor a la consumida. Asumimos que esto ocurre debido a que no tenemos en cuenta el aporte de carbono de otras muchas fuentes que forman parte de las melazas y del líquido de maceración del maíz, como pueden ser por ejemplo una gran cantidad de aminoácidos. Lo que hacemos para subsanar este error es considerar para el caso del control que los moles de carbono formados y que no proceden de las fuentes conocidas procederán de otras fuentes de las cuales no tenemos medidas directas. Para el control la diferencia entre los moles de carbono formados y los consumidos es de 0.0515, y ésta es la cantidad que suponemos que procede de otras fuentes de carbono del medio de cultivo. Sin embargo, como en cada uno de los experimentos la cantidad de carbono consumida es diferente, consideramos que el carbono consumido a partir de otras fuentes será también diferente. Por eso relacionamos la cantidad de carbono consumida de otras fuentes con la consumida a partir de la sacarosa en el control (0.0515/0.1499) y para estimar el carbono consumido a partir de otras fuentes para los diferentes experimentos multiplicaremos este cociente por los moles de carbono consumidos de sacarosa en cada caso. Así los balances expuestos en la tabla 4.2 se modifican y quedan tal y como se presentan en la tabla 4.3.

Fases del crecimiento	Tiempo (h)	mol C consumido otras fuent.	mol C consumido total	mol C formado total	% Carbono consumido dirigido a Biomasa	% Carbono consumido dirigido a CO ₂	% Carbono consumido dirigido a Etanol	% Carbono consumido procedente de Etanol
Control	18.43	0.0515	0.2669	0.2669	51.69	46.30	2.01	21.77
Inicio	15.00	0.0262	0.1063	0.0335	20.15	1.30	10.10	0.00
Mitad Exp.	13.85	0.0445	0.1971	0.1452	33.06	34.49	6.11	8.54
Declinación	17.86	0.0510	0.2298	0.1996	41.66	42.91	2.28	10.04
Estacionaria	19.86	0.0515	0.2461	0.2347	42.64	46.18	6.54	20.00

Tabla 4.3: Balance de carbono para el experimento control y los experimentos con adición de aminoácidos en diferentes fases del crecimiento, teniendo en cuenta que existe una cierta cantidad de moles de carbono que se consume a partir de otras fuentes de las que no se tienen medidas directas. Además calculamos los porcentajes de carbono consumido que se dirige hacia biomasa, etanol o CO₂, o bien que procede del etanol

En la tabla 4.3 ya sí se cumple que la cantidad de carbono consumida supera a la cantidad de carbono formada. Además se observa en dicha tabla que conforme el momento de adición de

aminoácidos se acerca al estado estacionario, se tiene mayor similitud con el experimento control; aumenta el porcentaje de carbono consumido que se dirige tanto a biomasa como a CO₂ y aumenta el porcentaje de carbono consumido que procede del consumo de etanol.

Los rendimientos totales de biomasa en función del carbono total consumido se muestran en la tabla 4.4. El cálculo se realiza considerando consumo total de la sacarosa y la cantidad de etanol consumida hasta el momento en que se realiza la adición de aminoácidos.

Estado metabólico en función de la velocidad de crecimiento	$Y_{X/S}$ (mol biomasa / mol C consumido)
Control	0.83
Principio de la fermentación $\mu=0.00 \text{ h}^{-1}$	0.28
Mitad de la fase exponencial $\mu=0.20 \text{ h}^{-1}$	0.59
Fase de declinación $\mu=0.12 \text{ h}^{-1}$	0.65
Principio de la fase estacionaria $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$	0.73

Tabla 4.4: Rendimiento biomasa/carbono consumido para distintos estados metabólicos

De la tabla 4.4 se deduce que si la alimentación de aminoácidos tiene lugar en etapas del crecimiento próximas a la fase estacionaria, el rendimiento $Y_{X/S}$ se aproxima al valor de rendimiento máximo ($Y_{X/S \text{ max}} = 0.83$). Esto ocurre así porque se produce un mayor consumo de etanol. El rendimiento tan bajo obtenido cuando la adición se realiza al comienzo del batch se debe a que también se produce inhibición en el consumo de sacarosa, tal y como se ve en la tabla 4.2.

Teniendo en cuenta sólo los metabolitos relacionados con el crecimiento, podríamos concluir que el mejor momento para realizar una adición de aminoácidos al medio de cultivo es aquél que sea más próximo al estado estacionario, puesto que no se observará inhibición en el crecimiento ni cambios considerables en los rendimientos. No obstante, puesto que la adición de aminoácidos se realiza con el objeto de incrementar la producción de glutatión, y también de dipéptido si da lugar, nos interesa además analizar que ocurre con estos dos metabolitos cuando se alimentan los aminoácidos en distintos estados metabólicos de la célula.

3.3. SÍNTESIS DE DIPÉPTIDO Y GLUTATIÓN EN FUNCIÓN DEL MOMENTO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS

La mayor concentración de dipéptido, tal y como se observa en la figura 4.8, se obtiene cuando la alimentación de aminoácidos tiene lugar en la mitad de la fase exponencial. En este caso llega un momento en que la concentración de dipéptido alcanza el estado estacionario. Hay una diferencia con los casos de adición en estados metabólicos posteriores y es que en estos últimos experimentos la producción de dipéptido aumenta desde el momento de la adición y no alcanza el estado estacionario. Cuando la adición de cisteína y glutamato se produce a tiempo cero, parece ser que se favorece la producción específica de dipéptido y también se alcanza el estado estacionario, que es el mismo que cuando la adición se realiza en la mitad de la fase exponencial. Podemos decir que a medida que el momento de adición de aminoácidos se aleja del estado estacionario, se consigue un mayor incremento en la concentración específica de dipéptido.

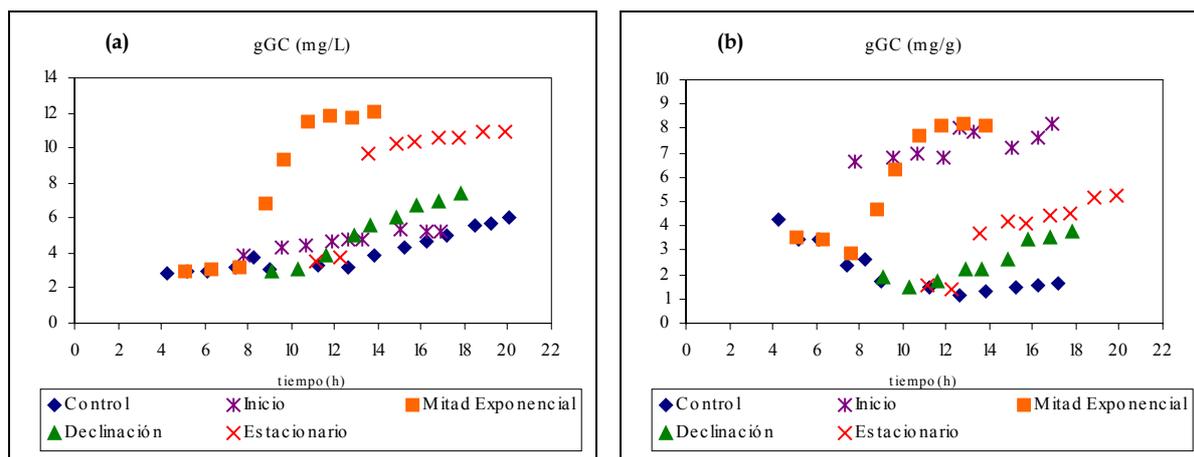


Figura 4.8: Acumulación de dipéptido expresado como (a) mg/L y (b) mg/g biomasa

La concentración total de glutatión, mostrada en la figura 4.9 (a), excepto en el caso en que la adición se produce a tiempo cero, alcanza el mismo valor en todos los casos. La concentración específica de GSH, en la figura 4.8 (b), aumenta a medida que el momento en que se adicionan los aminoácidos se aleja del estado estacionario. Es decir, la síntesis de glutatión sigue el mismo comportamiento que el dipéptido y es totalmente contrario a la evolución que siguen los metabolitos representativos del crecimiento celular.

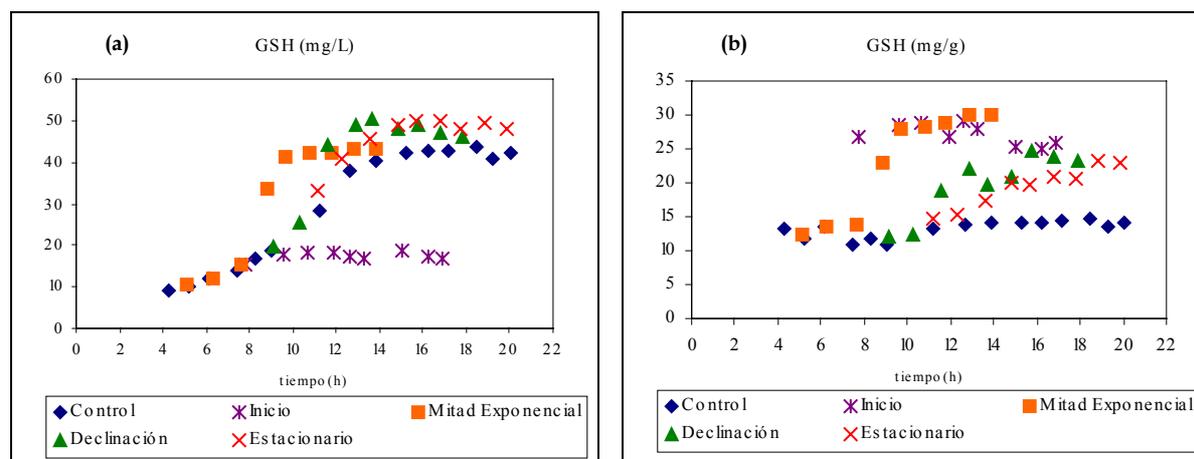


Figura 4.9: Síntesis de glutatión expresado como (a) mg/L y (b) mg/g biomasa

Cuando se alimentan cisteína y glutamato al empezar la fermentación, parece ser que se favorece la producción específica de GSH, la cual alcanza el mismo valor que cuando la adición se produce a mitad de la fase exponencial. Sin embargo la concentración total de glutatión es bastante inferior a la obtenida en los otros experimentos debido a la cantidad tan reducida de biomasa presente en el medio.

Los estudios que siguen de adición de aminoácidos se llevarán a cabo para el estado metabólico de la célula que corresponde a la mitad de la fase exponencial puesto que los valores de concentración específica de dipéptido y glutatión son los más elevados y aunque se produce inhibición de biomasa no es tan drástica como cuando se alimentan los aminoácidos al principio. Esta fase se puede reconocer online porque en ella empieza a consumirse etanol que provoca una subida de pH; siguiendo la evolución del ácido añadido al biorreactor cuando se produzca una primera adición

de ácido, se procederá a llevar a cabo la estrategia de adición del aminoácido que corresponda (suele coincidir con un tiempo de cultivo comprendido entre 7 y 8 horas).

3.4. ANÁLISIS DEL ESTADO INICIAL DE LA CÉLULA

Conocer el estado inicial de la célula nos permite tener suficiente información para poder aplicar diferentes estrategias dirigidas a aumentar la síntesis de GSH. Es decir, si por ejemplo se conociera la velocidad de crecimiento para la cual el incremento en la concentración de glutatión es mayor, se podría llevar a cabo un cultivo fed-batch que nos permitiera mantener esa velocidad específica a lo largo de toda la fermentación.

En la tabla 4.5 se muestran los valores de la velocidad específica de crecimiento, de consumo de sacarosa y de etanol, y las velocidades específicas de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, así como el coeficiente respiratorio (RQ) para los puntos donde se realizan las adiciones de cisteína y glutamato.

Estado metabólico	μ (h ⁻¹)	q_s (g/g h)	q_E (g/g h)	q_{O_2} (mmol/g h)	q_{CO_2} (mmol/g h)	RQ
Mitad de exponencial	0.20	0.31	0.056	9.21	6.95	0.75
Declinación	0.12	0.15	0.035	7.74	5.55	0.72
Comienzo de la fase estacionaria	0.05	0.07	0.015	3.72	3.37	0.91

Tabla 4.5: Velocidad específica de crecimiento, de consumo de sacarosa, etanol y oxígeno, velocidad específica de producción de CO₂ y coeficiente respiratorio para diferentes estados metabólicos de la célula

Según los valores de la tabla 4.5 y según las concentraciones de dipéptido y glutatión (figuras 4.8 y 4.9, respectivamente), parece ser que cuando la adición se realiza cuando las velocidades específicas son mayores se puede aumentar más la síntesis de gGC y GSH. En estos casos la concentración de etanol presente en el medio extracelular es más elevada (figura 4.6).

Además, en la figura 4.10 se puede observar la evolución del coeficiente respiratorio con el tiempo para el experimento control (sin alimentación de aminoácidos) y se puede relacionar con el consumo de sacarosa y de etanol.

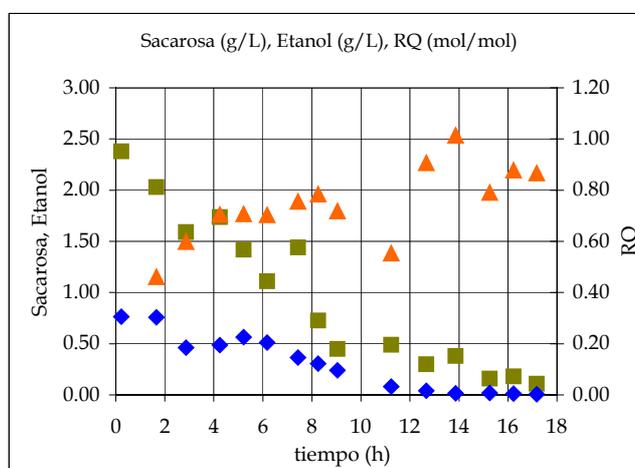


Figura 4.10: Evolución del coeficiente respiratorio (▲), concentración de sacarosa (■) y de etanol (◆) en un cultivo de la cepa mutada en un biorreactor de 2 L

Según el valor de RQ se puede conocer el estado metabólico de la célula (tabla 4.6). La evolución en el coeficiente respiratorio de nuestro experimento control (figura 4.10), indica que el microorganismo está consumiendo sacarosa y etanol de manera conjunta ($0.6 < RQ < 0.9$).

Estado metabólico	RQ
Formación de etanol	>1
Crecimiento oxidativo	0.9-1
Oxidación de azúcar y etanol	0.6-0.9
Oxidación de etanol	<0.6

Tabla 4.6 (Sakato y Tanaka, 1992): Valores del coeficiente respiratorio en función del estado metabólico de la célula

Coincide que la adición de aminoácidos tiene mayor influencia en el metabolismo de síntesis de glutatión cuanto mayor sean las velocidades específicas de consumo de oxígeno y de producción de dióxido de carbono. En la figura 4.11 se muestran las evoluciones de ambas velocidades para un cultivo control de la cepa mutante. La mitad de la fase exponencial coincide con el máximo de la velocidad específica de consumo de oxígeno y de producción de CO_2 , y al comienzo de la fase estacionaria ambos valores están decayendo. Los resultados obtenidos parecen establecer una relación entre el oxígeno consumido y el momento óptimo de adición de aminoácido para favorecer el metabolismo de síntesis de GSH.

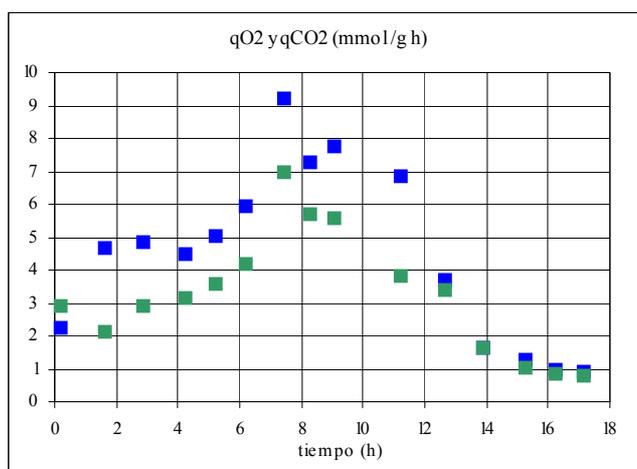


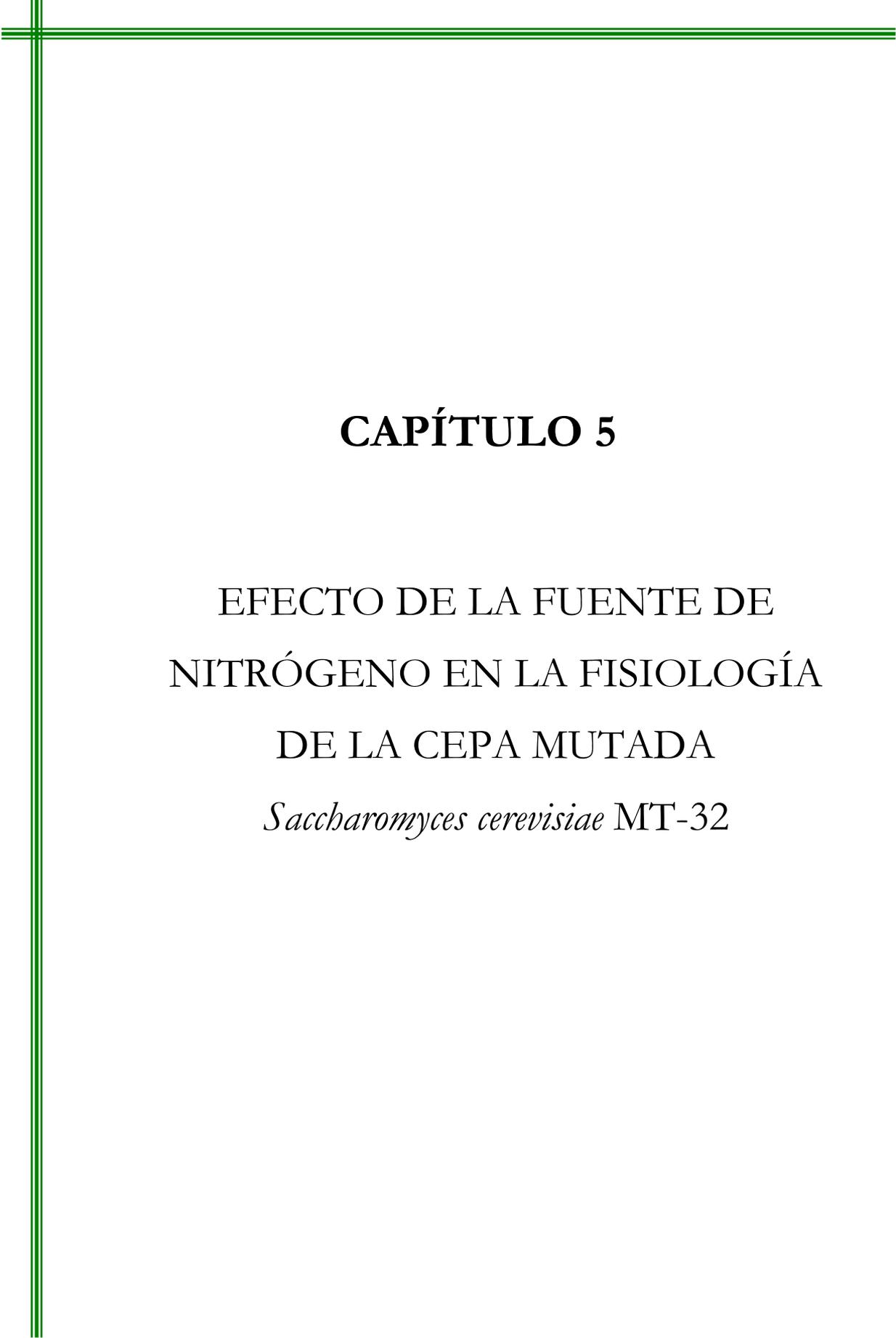
Figura 4.11: Velocidad específica de consumo de oxígeno (■) y velocidad específica de producción de CO_2 (■) para el control de *S. cerevisiae* MT-32

Ya que durante el proceso de respiración se están generando radicales libre de oxígeno (ROS), una mayor velocidad de consumo de oxígeno debe ser responsable de una mayor generación de antioxidantes, entre ellos el GSH. Si en este punto estamos alimentando aminoácidos precursores del GSH, parece razonable que este momento sea bastante favorable para que los aminoácidos se inviertan en el metabolismo del glutatión.

Los resultados de la figura 4.5 muestran que la alimentación conjunta de cisteína y glutamato al medio de cultivo provocan inhibición en el crecimiento y que el grado de inhibición depende del estado metabólico en que se encuentre la célula y de las velocidades específicas de crecimiento. Además un nivel mayor de inhibición supone un menor consumo de etanol (figura 4.6). Las concentraciones de glutatión (figura 4.9) y de dipéptido son dependientes del momento de adición y aumentan a medida que el momento de adición se aleja del estado estacionario (figura 4.8).

4. REFERENCIAS

Udeh K.O. and Achremowicz B. 1994. Production of yeast biomass with elevated content of glutathione. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 3/44 (1): 93-100.



CAPÍTULO 5

EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN LA FISIOLOGÍA DE LA CEPA MUTADA

Saccharomyces cerevisiae MT-32

CAPÍTULO 5 EFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN LA FISIOLÓGÍA DE LA CEPA MUTADA *Saccharomyces cerevisiae* MT-32

1. INTRODUCCIÓN	115
2. METODOLOGÍA	116
3. UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES	117
3.1. INFLUENCIA EN EL RENDIMIENTO DE BIOMASA	118
3.2. EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES EXTRACELULARES	119
4. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO	121
5. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO UTILIZADA EN LA SÍNTESIS DE GSH	123
6. DISCUSIÓN	124
7. REFERENCIAS	126

1. INTRODUCCIÓN

Muchos microorganismos tienen la capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos nitrogenados como fuente del nitrógeno celular. Esta habilidad necesita de permeasas para el transporte de estos compuestos, y de enzimas para la generación de amonio por su metabolismo. Una vez dentro de la célula el amonio puede producir glutamato, y puede reaccionar con el glutamato para producir glutamina. El nitrógeno amino del glutamato constituye el 85% del total de nitrógeno celular y el grupo amida de la glutamina constituye el 15% restante (Magasanik y Kaiser, 2002).

El glutamato es uno de los aminoácidos requeridos para la síntesis de glutatión y puede estar presente en el medio tal cual, o bien puede sintetizarse a partir de una fuente de amonio como puede ser el sulfato amónico. El estudio de la fuente de nitrógeno a utilizar es interesante desde el punto de vista de la producción industrial, ya que el sulfato amónico es más barato y es un compuesto habitual utilizado para aportar nitrógeno en el medio de cultivo. Sin embargo, estas dos alternativas pueden variar la fisiología de la levadura al poder ser utilizadas como fuente de nitrógeno de manera distinta. Además, una de las diferencias entre una fuente de nitrógeno como el amonio y fuentes como el glutamato o la glutamina es que la primera no participa en el catabolismo de la célula mientras que las otras dos sí lo hacen (Aon y Cortassa, 2001). El objetivo de este capítulo es el estudio del efecto de la fuente de nitrógeno en la fisiología de la levadura y en la síntesis de GSH.

La levadura *S. cerevisiae* es capaz de asimilar nitrógeno de diferentes fuentes como amonio, urea, alantoína o aminoácidos (Cooper, 1982). Las rutas que permiten sintetizar compuestos con grupos $-NH_2$ constituyen el metabolismo central del nitrógeno (CNM) (van Riel et al., 1998). El metabolismo central del nitrógeno está directamente relacionado con el ciclo de los ácidos tricarbónicos a través del α -oxoglutarato. La regulación de nitrógeno (represión catabólica del nitrógeno) es el mecanismo que previene o reduce el flujo de la capacidad sintética de las células hacia la formación de enzimas, o permeasas, necesarias para la utilización de compuestos que no son fuentes ricas de glutamato o glutamina cuando existe presencia de fuentes ricas (Magasanik y Kaiser, 2002). Las rutas de asimilación de fuentes de nitrógeno consisten en una serie de reacciones destinadas a la producción de glutamato y glutamina; estas reacciones se esquematizan en la figura 5.1.

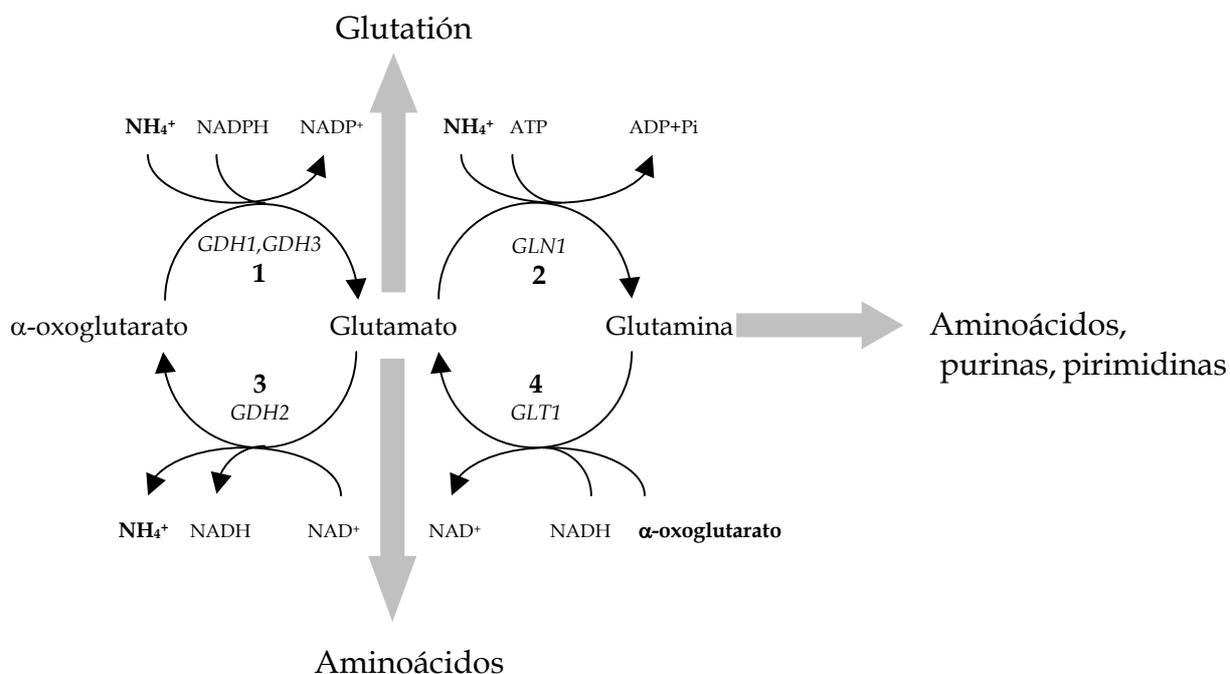


Figura 5.1 (Magasanik y Kaiser, 2002; Magasanik, 2003): Rutas centrales del metabolismo del nitrógeno. Los enzimas que catalizan las diversas reacciones son: Reacción 1: Glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente; Reacción 2: Glutamina sintetasa; Reacción 3: Glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente; Reacción 4: Glutamato sintetasa

Cuando las células tienen una fuente abundante de amonio, el enzima glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente (NADP-GDH) es responsable de la síntesis de glutamato a partir de amonio y de α -oxoglutarato y el enzima glutamina sintetasa (GS) permite sintetizar glutamina a partir de glutamato y amonio. Si se utiliza glutamina como única fuente de nitrógeno, ésta puede transformarse en glutamato mediante el enzima glutamato sintetasa. Si se utilizara el glutamato como única fuente de nitrógeno el enzima glutamato deshidrogenasa NAD-dependiente (NAD-GDH) es responsable de la síntesis de amonio necesaria para sintetizar posteriormente glutamina a partir de glutamato mediante el enzima glutamina sintetasa (Magasanik y Kaiser, 2002).

El objetivo de este estudio es analizar la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno, glutamato y sulfato amónico, sobre el crecimiento y formación de glutatión en la cepa *S. cerevisiae* MT-32.

2. METODOLOGÍA

Se alimentará nitrógeno al medio de cultivo de manera continua y cuando la célula se encuentre en el estado metabólico correspondiente a la mitad de la fase exponencial. Se alimenta sulfato amónico a las velocidades de 0.25, 0.50, 1.30 y 2.00mmol/h y se alimenta glutamato a las velocidades de 2.70, 5.00 y 7.00mmol/h.

Si suponemos que el nitrógeno añadido, en forma de sulfato amónico o glutamato, es la única fuente de nitrógeno (despreciamos el nitrógeno de los aminoácidos y del medio de cultivo) podemos conocer el nitrógeno consumido por diferencia con el nitrógeno residual en el medio. En el caso de utilizar sulfato amónico el nitrógeno residual se puede obtener por medida de la concentración de amonio en el medio (método descrito en el apartado 4.4 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos), y cuando se utiliza glutamato, el nitrógeno residual se conoce por medida de la concentración libre de glutamato en el medio extracelular (protocolo descrito en el apartado 4.5 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos).

Para poder calcular la cantidad de nitrógeno consumida debemos conocer en primer lugar la cantidad de nitrógeno añadida, según:

$$\text{Nitrógeno añadido} = Q_N t_{\text{adición}} \frac{\gamma_N (\text{mmol})}{\text{mmol fuente nitrógeno}}, \text{ mmol}$$

donde:

- $t_{\text{adición}}$: tiempo durante el que se está alimentando la fuente de N_2 (h)
- Q_N : Velocidad de alimentación de sulfato amónico o de glutamato (mmol/h)
- γ_N : tendrá un valor de 2 para el caso del sulfato amónico y un valor de 1 para el glutamato

A partir de las medidas de amonio (en el caso del sulfato amónico) o del glutamato en el medio extracelular, conoceremos la cantidad de nitrógeno añadida que no se ha consumido, es decir, el nitrógeno residual:

$$\text{Nitrógeno residual} = NH_4^+ \text{ residual (mg/L)} \frac{\text{mmol } NH_4^+}{18\text{mg}} \frac{\text{mmol } N}{\text{mmol } NH_4^+} V(L), \text{ mmol}$$

$$\text{Nitrógeno residual} = \text{Glutamato residual (mmol/L)} \frac{\text{mmol N}}{\text{mmol glutamato}} V(L), \text{ mmol}$$

donde: NH_4^+ residual: Amonio medido en el filtrado de la muestra (mg/L)
 Glutamato residual: Se obtiene de la medida de glutamato en el filtrado de la muestra (mM)
 V: Volumen en el reactor antes de tomar la muestra (L)

Con los valores de nitrógeno añadido y nitrógeno residual en cada una de las muestras tomadas, podremos conocer el nitrógeno consumido por las células como sigue:

$$\text{Nitrógeno consumido} = \sum_{i=1}^{i=n} [(N \text{ añadido entre muestras})_i + (N \text{ residual})_{i-1} - (N \text{ residual})_i], \text{ mmol}$$

donde: i: número de muestra (1...n). La muestra 1 equivale a la primera muestra que se haya tomado a partir de la alimentación de la fuente rica en nitrógeno. La muestra n equivale a la muestra a la que queremos realizar la comparativa
 $N_{\text{añadido entre muestras}}$: Son los milimoles de nitrógeno añadidos en el intervalo en el que queremos realizar el análisis

3. UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO A PARTIR DE DIFERENTES FUENTES

Comparamos el nitrógeno total consumido por parte de la célula para las distintas fuentes utilizadas, sulfato amónico o glutamato, y durante el periodo de tiempo comprendido desde el inicio de la alimentación de la fuente correspondiente y hasta el momento en que la sacarosa y el etanol se hacen limitantes. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.1.

Caudal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mmol/h)	Tiempo considerado (h)	Nitrógeno añadido (mmol)	Nitrógeno consumido (mmol)
0.25	14.89	3.49	3.05
0.50	14.90	7.46	2.56
1.30	14.89	17.22	2.64
2.00	14.91	31.28	2.79

Caudal Glutamato (mmol/h)	Tiempo considerado (h)	Nitrógeno añadido (mmol)	Nitrógeno consumido (mmol)
2.70	13.27	14.50	15.19
5.00	13.73	29.65	30.22
7.00	13.74	41.37	41.96

Tabla 5.1: Valores de nitrógeno añadido y nitrógeno consumido para diferentes experimentos de alimentación de fuentes ricas en nitrógeno (sulfato amónico y glutamato)

De la tabla 5.1 se observa que si se emplea sulfato amónico como fuente de nitrógeno, e independientemente de la cantidad de nitrógeno añadida, siempre se consume la misma cantidad de nitrógeno. Sin embargo, cuando el glutamato es la fuente de nitrógeno, se consume todo el nitrógeno añadido (las pequeñas diferencias entre los valores se deben a errores experimentales).

En este punto sería interesante conocer hacia dónde se dirige el nitrógeno consumido para poder dar una explicación del porqué la cantidad de nitrógeno consumida depende de la fuente utilizada; en principio, suponemos que se dirige todo hacia síntesis de biomasa. Vamos entonces a comparar los rendimientos de biomasa en función del nitrógeno consumido para las dos fuentes utilizadas, sulfato amónico y glutamato.

3.1. INFLUENCIA EN EL RENDIMIENTO DE BIOMASA

En la tabla 5.2 se muestran los valores de rendimientos $Y_{X/N}$ experimentales para las diferentes velocidades de alimentación de sulfato amónico.

Caudal (NH ₄) ₂ SO ₄ (mmol/h)	Tiempo considerado (h)	Biomasa (mol)	Nitrógeno consumido (mol)	Nitrógeno en biomasa (mol) ^(a)	$Y_{X/N}$ (mol/mol)
0.25	14.89	0.169	0.00305	0.0322	55.6
0.50	14.90	0.169	0.00256	0.0322	66.2
1.30	14.89	0.169	0.00264	0.0321	63.9
2.00	14.91	0.155	0.00279	0.0294	55.5

(a) Nitrógeno en biomasa (mol) = Biomasa (mol) · 0.19 (mol N/ mol biomasa)

Tabla 5.2: Rendimiento biomasa/nitrógeno consumido ($Y_{X/N}$) para diferentes velocidades de alimentación de sulfato amónico, calculado a partir de la biomasa producida y del nitrógeno consumido. También se muestra la cantidad de nitrógeno contenido en la biomasa suponiendo que la composición de nitrógeno de la biomasa es de 0.19mol N/mol biomasa (Nielsen y Villadsen, 1994)

Tomamos como fórmula molecular de la biomasa la considerada por Nielsen y Villadsen (1994): CH_{1.78}O_{0.6}N_{0.19}. Si suponemos que todo el nitrógeno de la biomasa procede del nitrógeno consumido bien del sulfato amónico o bien del glutamato, se tendrá un rendimiento máximo de biomasa en función del nitrógeno consumido de: $Y_{X/N} = 1/0.19 = 5.3$. Los rendimientos obtenidos en la tabla 5.2 son muy superiores al rendimiento máximo calculado suponiendo que todo el nitrógeno de la biomasa procede del nitrógeno consumido. Si la cantidad de nitrógeno consumido fuera mayor, se conseguiría una disminución en el rendimiento, y éste llegaría a ser inferior al rendimiento máximo teórico. Esto conduce a la conclusión de que el nitrógeno de la biomasa procede de otras fuentes como podría ser el medio de cultivo. El amonio, tal como vieron Aon y Cortassa (2001) actúa como un sustrato anabólico y no catabólico y da lugar a glutamato. Podemos entonces suponer que todo el nitrógeno de la biomasa, en los experimentos con adición de sulfato amónico, procede del medio de cultivo. Si de la tabla 5.2 suponemos que todos los moles de nitrógeno de la biomasa son aportados por el medio de cultivo, obtenemos un valor medio de 0.0315 moles.

Cuando se alimenta glutamato al medio los valores de biomasa que se obtienen son mayores a los obtenidos para el sulfato amónico. Suponiendo que el medio de cultivo aporta 0.0315 moles de nitrógeno para síntesis de biomasa, hemos calculado (tabla 5.3) los moles de nitrógeno de la biomasa que proceden del consumo de glutamato. Se observa que a medida que aumenta la velocidad de

alimentación de glutamato y los moles de nitrógeno consumidos aumenta la incorporación de nitrógeno en la biomasa hasta alcanzar un máximo (ver valores para los caudales de glutamato iguales a 5.00 y 7.00mmol/h). También a medida que aumenta el consumo de nitrógeno aumenta la cantidad de nitrógeno que se incorpora en otras posibles rutas diferentes a la de síntesis de biomasa.

Caudal Glutamato (mmol/h)	Tiempo considerado (h)	Biomasa (mol)	Nitrógeno en biomasa (mol) ^(a)	Nitrógeno consumido (mol)	Nitrógeno en biomasa procedente del glutamato (mol) ^(b)	Nitrógeno consumido del glutamato en otras rutas (mol) ^(c)
2.70	13.27	0.183	0.0348	0.0144	0.0033	0.0111
5.00	13.73	0.205	0.0389	0.0302	0.0074	0.0228
7.00	13.74	0.204	0.0388	0.0420	0.0073	0.0347

(a) Nitrógeno en biomasa (mol) = Biomasa (mol) · 0.19 (mol N/mol biomasa)

(b) Nitrógeno en biomasa procedente del glutamato (mol) = Nitrógeno en biomasa (mol) - 0.0315 (mol)

(c) Nitrógeno consumido del glutamato en otras rutas (mol) = Nitrógeno consumido (mol) - Nitrógeno en biomasa procedente del glutamato (mol)

Tabla 5.3: Nitrógeno consumido a partir del glutamato añadido (a distintas velocidades) y utilizado tanto en síntesis de biomasa como en otras posibles rutas. Se considera que 0.0315 moles de nitrógeno de la biomasa proceden del medio de cultivo

Para las velocidades de alimentación de glutamato estudiadas, el porcentaje de nitrógeno consumido que se dirige hacia otras posibles rutas está comprendido entre un 78 y 85% del nitrógeno total consumido. El glutamato a diferencia del amonio participa en el catabolismo, contribuye a la generación de energía mediante su incorporación al ciclo de Krebs y provee precursores para la síntesis de biomasa (Aon y Cortassa, 2001). Se puede también incorporar directamente en proteínas además de su función de donador de nitrógeno o grupos $-NH_2$.

En nuestros cálculos hemos supuesto una composición de biomasa constante, pero diversos autores, entre ellos Mauch et al. (2000), establecen que la composición de la biomasa varía en función de la velocidad de crecimiento. Si variara su composición en función del nitrógeno consumido, podría ser que todo el nitrógeno se incorporara en biomasa y eso no lo hemos tenido en cuenta. Otra posibilidad es que el excedente de nitrógeno que no pasa a formar parte de la biomasa se utilice en síntesis de aminoácidos. Esta hipótesis la tratamos en el apartado siguiente 3.2.

3.2. EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES EXTRACELULARES

Para comprobar si el excedente de glutamato consumido se dirige hacia rutas de síntesis de aminoácidos, comparamos la concentración de aminoácidos libres extracelulares en el estado estacionario para diferentes velocidades de alimentación de glutamato (apartado 4.5 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos). Hemos obtenido la tabla 5.4 en la que se ve que a medida que aumenta la velocidad de alimentación, o lo que es lo mismo, el consumo de glutamato, aumenta también la concentración total de aminoácidos. El aminoácido que parece más dependiente del consumo de glutamato es la serina, la cual experimenta un incremento considerable con el consumo de glutamato, aunque alcanza un valor máximo para velocidades de alimentación de glutamato mayores a 5mmol/h. También aumenta la síntesis de amoniaco al incrementarse la velocidad de alimentación; esto puede ser representativo del flujo que se dirige hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos.

Aminoácido (μM)	Glutamato (2.70mmol/h)	Glutamato (5.00mmol/h)	Glutamato (7.00mmol/h)
Ac. Aspártico	44.203	123.963	85.595
Ac. Glutámico	60.851	141.969	130.776
Serina	3558.338	15976.318	16812.260
Histidina	50.477	329.428	53.853
Glicina	27.785	164.133	186.363
Arginina	45.149	31.733	15.397
Treonina	12.297	22.629	20.059
Alanina	107.924	209.111	116.753
Prolina	5.163	78.392	6.046
Cisteína	21.287	21.519	30.827
Tirosina	8.718	45.213	24.493
Valina	18.427	201.335	60.310
Metionina	3.748	9.279	7.489
Lisina	16.806	37.273	0.000
Isoleucina	30.039	70.335	51.122
Leucina	21.871	22.122	8.528
Fenilalanina	13.075	18.378	11.642
Amoniaco	31.149	226.262	537.654
TOTAL	4046	17503	17622

Tabla 5.4: Aminoácidos libres extracelulares para diferentes velocidades de alimentación de glutamato

Si comparamos la concentración de aminoácidos libres extracelulares cuando se alimenta sulfato amónico para distintas velocidades de adición y en comparación al control (tabla 5.5), se observa que apenas se modifica la composición en aminoácidos. Esto es lógico puesto que la cantidad de nitrógeno consumida era la misma para todas las velocidades de alimentación de sulfato amónico empleadas (tabla 5.1).

Aminoácido (μM)	Control	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5mmol/h)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1.3mmol/h)
Ac. Aspártico	18.268	25.036	26.369
Ac. Glutámico	4.779	69.621	80.781
Serina	4.900	22.150	21.894
Histidina	30.345	42.861	50.912
Glicina	0.000	6.336	5.572
Arginina	8.856	20.358	27.658
Treonina	14.172	36.687	34.089
Alanina	3.175	57.113	88.380
Prolina	14.981	7.990	5.511
Cisteína	19.360	21.421	21.003
Tirosina	51.403	11.587	20.187
Valina	11.178	33.086	50.855
Metionina	5.071	6.284	6.148
Lisina	45.081	40.848	28.501
Isoleucina	18.472	27.201	27.260
Leucina	4.155	6.412	6.913
Fenilalanina	4.417	7.972	9.993
TOTAL	259	443	512

Tabla 5.5: Aminoácidos libres extracelulares para diferentes velocidades de alimentación de sulfato amónico y para el control

Podemos decir que el nitrógeno que se consume a partir del glutamato se invierte en sintetizar biomasa y aminoácidos, pero los valores obtenidos son los mismos para velocidades de alimentación de glutamato por encima de 5mmol/h, aunque la cantidad de nitrógeno consumida no sea la misma como se observaba en la tabla 5.1. Pero como la concentración de amoniaco sí es mayor en el caso de la velocidad de glutamato de 7mmol/h en comparación a la velocidad de 5mmol/h, podemos decir que el excedente de nitrógeno consumido en este caso da lugar a un flujo mayor hacia el ciclo de Krebs.

4. ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

Para una misma velocidad de alimentación de nitrógeno a partir de sulfato amónico y glutamato, vamos a comparar los posibles cambios fisiológicos del microorganismo. La velocidad de alimentación de nitrógeno que se compara para ambas fuentes es de 2.70mmol/h, que supone una velocidad de alimentación de sulfato amónico de 1.30mmol/h y una velocidad de alimentación de glutamato de 2.70mmol/h.

Como hemos visto en el apartado anterior, parte del nitrógeno consumido a partir del glutamato se utiliza en sintetizar biomasa. Los valores de biomasa en los experimentos con alimentación de glutamato y en el estado estacionario son algo superiores a los valores obtenidos en el control y en los experimentos con alimentación de sulfato amónico. Las concentraciones de biomasa a lo largo del tiempo en estos dos últimos casos coinciden. El consumo de nutrientes (sacarosa y etanol) siguen el mismo curso que en el experimento control. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura 5.2, el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono se ven alterados según la fuente de nitrógeno que se utilice.

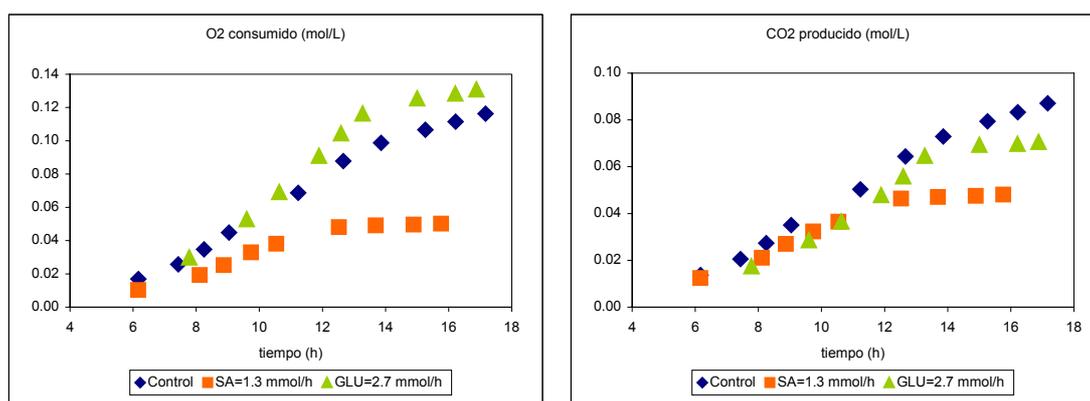


Figura 5.2: Evolución en el consumo de oxígeno y en la producción de CO₂ según la fuente de nitrógeno que se utilice, sulfato amónico o glutamato

La evolución en el oxígeno consumido y CO₂ producido al emplear glutamato para el aporte de nitrógeno, es muy similar al control (figura 5.2). Cuando se utiliza sulfato amónico el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono son bastante inferiores, y a partir de las 12 horas de cultivo aproximadamente, las dos variables alcanzan prácticamente el estado estacionario.

A partir de los resultados expuestos en la figura 5.2, se puede concluir que el aporte de nitrógeno a través del sulfato amónico provoca una inhibición tanto en el consumo de oxígeno como en la síntesis de dióxido de carbono.

Para un análisis más completo de lo que ocurre en el metabolismo de la célula calculamos una serie de variables cinéticas a partir de las muestras tomadas en cada uno de los experimentos, como la velocidad específica de crecimiento, de consumo de sacarosa y etanol, de consumo de oxígeno y de síntesis de dióxido de carbono (apartado 5 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos). Los resultados de velocidad específica de crecimiento y consumo de sacarosa y etanol se muestran en la figura 5.3.

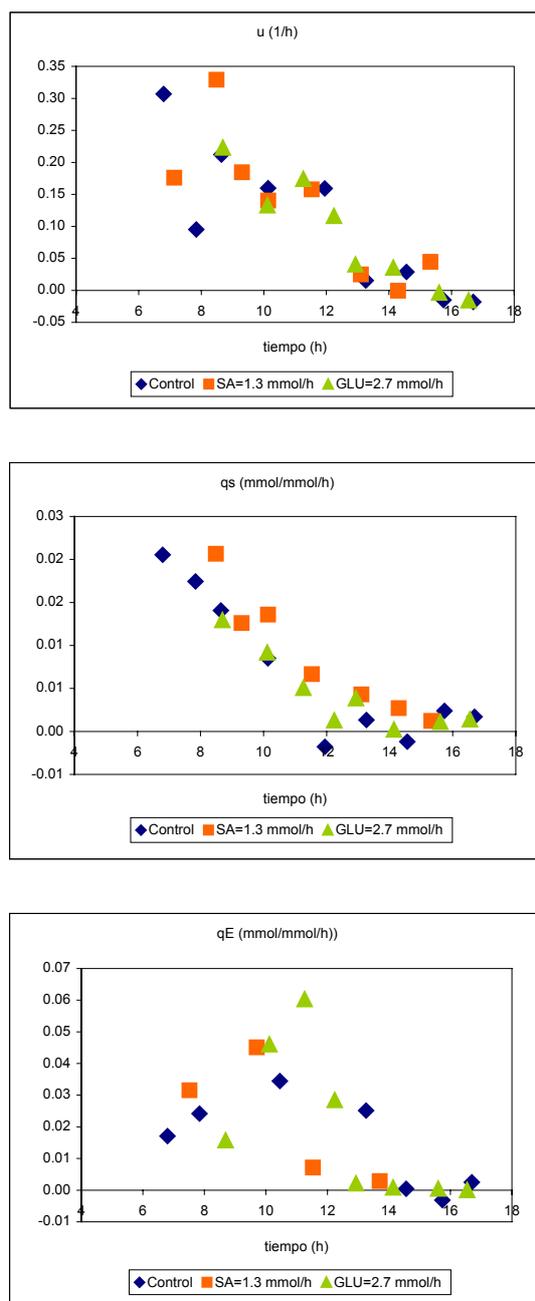


Figura 5.3: Velocidad específica de crecimiento y de consumo de sacarosa y etanol para *S. cerevisiae* MT-32 y con la misma velocidad de alimentación de nitrógeno a partir de dos fuentes: glutamato y sulfato amónico

Las velocidades específicas de crecimiento, de consumo de sacarosa y de consumo de etanol, figura 5.3, siguen la misma evolución independientemente de la fuente de aporte de nitrógeno utilizada. Sin embargo, no ocurre lo mismo para la velocidad específica de producción de dióxido de carbono y para la velocidad específica de consumo de oxígeno, como muestra la figura 5.4.

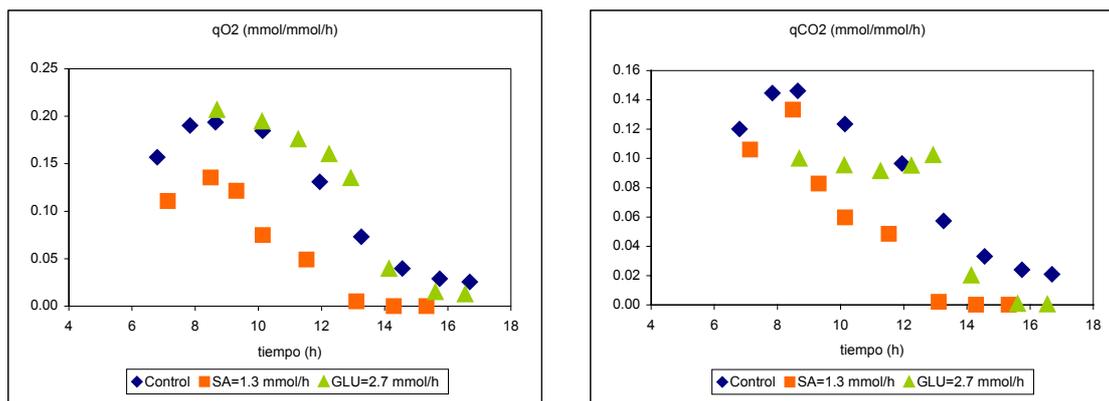


Figura 5.4: Velocidad específica de consumo de oxígeno y de síntesis de dióxido de carbono para *S. cerevisiae* MT-32 y con la misma velocidad de alimentación de nitrógeno a partir de dos fuentes: glutamato y sulfato amónico

Las velocidades específicas de consumo de oxígeno y de producción de dióxido de carbono (figura 5.4) cuando se alimenta sulfato amónico son inferiores al control. Además, en el caso del glutamato, el aumento en la velocidad específica de producción de CO₂ se produce durante un intervalo mayor de tiempo y de forma más gradual que en el control.

5. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO UTILIZADA EN LA SÍNTESIS DE GSH

Según los resultados obtenidos, además del consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, las rutas de síntesis de glutatión son los aspectos del metabolismo que pueden verse alterados según la fuente de nitrógeno que se utilice. En la figura 5.5 se representa la evolución de estas variables.

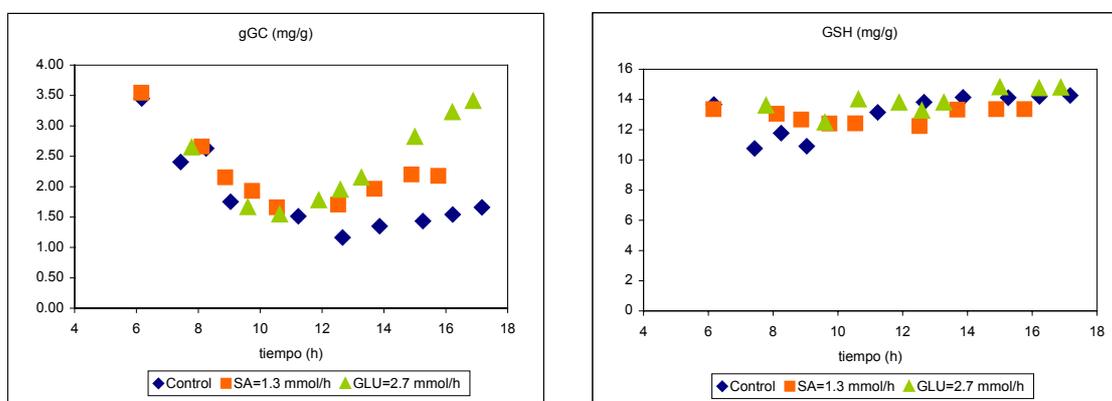


Figura 5.5: Concentración específica de dipéptido y de GSH en *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 con dos fuentes de nitrógeno: sulfato amónico y glutamato

A partir de los resultados expuestos en la figura 5.5, se puede concluir que el aporte de nitrógeno al biorreactor favorece principalmente la síntesis de dipéptido a tiempos superiores a 11 horas, siendo el incremento mayor cuando se adiciona glutamato. La fuente de nitrógeno utilizada no produce cambios en la concentración específica de GSH. Representamos también las velocidades específicas de producción de gGC y de GSH (figura 5.6).

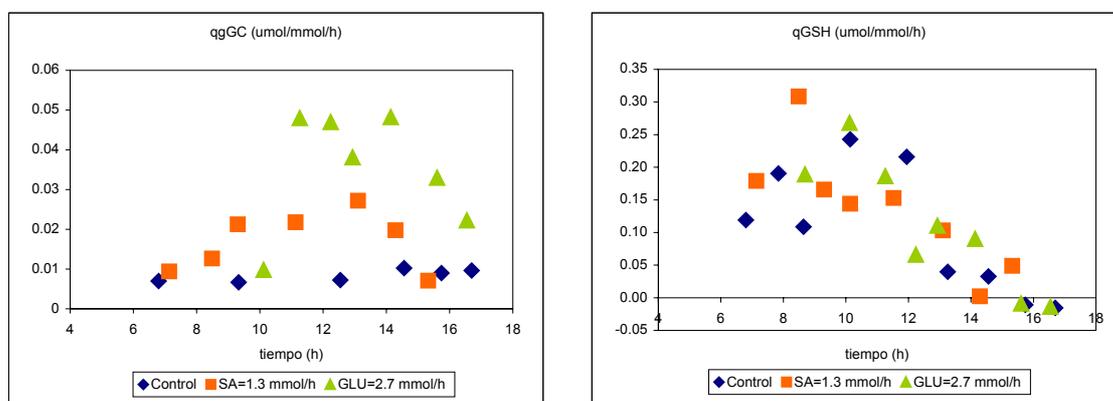


Figura 5.6: Velocidades específicas de síntesis de gGC y GSH en *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 con dos fuentes de nitrógeno: sulfato amónico y glutamato

Se hace patente que el aporte de nitrógeno tanto a partir del glutamato como del sulfato amónico, da lugar a una mayor velocidad específica de síntesis de gamma-glutamylcisteína en comparación al control, y dicha velocidad es mayor en el caso del glutamato (figura 5.6). Aunque la velocidad específica de síntesis de dipéptido se vea modificada, no ocurre lo mismo para el glutatión; éste se sintetiza a la misma velocidad específica que cuando no se alimenta nitrógeno al medio de cultivo.

6. DISCUSIÓN

Cuando alimentamos glutamato al medio de cultivo, el nitrógeno consumido es muy superior a cuando alimentamos sulfato amónico (tabla 5.1). El consumo de estos sustratos por parte de la célula se realiza a través de permeasas. En el caso del glutamato, *DIP5* además de *GAP1* (permeasa general para todos los aminoácidos), es la única permeasa importante. Mientras que *GAP1* presenta altos niveles de actividad en las fases de limitación de nitrógeno y se inactiva si se alimenta una fuente rica de nitrógeno al medio, como pueden ser glutamina, glutamato o amonio (Stanbrough y Magasanik, 1995), el promotor de *DIP5* es muy activo en presencia tanto de una fuente rica de nitrógeno como en presencia de una fuente pobre (Regenberg et al., 1998). Para el amonio, su incorporación a la célula necesita al menos de tres permeasas, productos de *MEP1*, *MEP2* y *MEP3*; estas permeasas se expresan a bajas concentraciones de amonio y se reprimen a elevadas concentraciones (ter Schure et al., 2000; Marini et al., 1997). Parece, por tanto, que la concentración de amonio ejerce una mayor represión que la concentración de glutamato sobre las permeasas correspondientes a cada uno. Así los resultados que obtenemos de consumo de nitrógeno parecen lógicos, se consume más nitrógeno en el caso del glutamato (menor represión) que para el sulfato amónico (mayor represión); esto también lo observaron Aon y Cortassa (2001).

De la tabla 5.1 se ve que al alimentar sulfato amónico al medio de cultivo, prácticamente todo el amonio alimentado se acumula en el medio extracelular; además, se aprecia (tabla 5.2) que la concentración de biomasa alcanzada para las distintas velocidades de alimentación de sulfato amónico es la misma. Los trabajos de ter Schure et al. (1995) se centran en estudiar los efectos de alimentar una concentración de amonio de 29 a 120mM en un cultivo en continuo de *S. cerevisiae*. Cuando aumentan la concentración de amonio en el alimento de 29 a 61mM observan un incremento en la biomasa de 4.9 a 8.2g/L; este aumento de biomasa demuestra que existía una limitación de amonio. Sin embargo, a concentraciones superiores a 61mM en el alimento y hasta 120mM, la concentración residual de amonio en el medio aumentaba linealmente hasta 62mM y la biomasa permanecía constante en 8.2g/L, es decir, parte del amonio alimentado se acumulaba en el medio y ya no se empleaba en sintetizar biomasa; para estas condiciones la glucosa es la que se hace limitante. Como en nuestra experimentación y al alimentar sulfato amónico se acumula todo el amonio añadido y no se observan cambios en la concentración de biomasa, podemos concluir que a las concentraciones de sulfato amónico empleadas, la célula presenta limitación de fuente de carbono y no de nitrógeno.

Con el glutamato observamos un ligero incremento en la concentración de biomasa (tabla 5.3) y un aumento en la acumulación de amoniaco en el medio extracelular (tabla 5.4). Los trabajos de ter Schure et al. (1995) demuestran que la actividad de NAD-GDH aumenta hasta concentraciones de amonio de 61mM; este enzima cataliza la síntesis de α -oxoglutarato y amonio a partir de glutamato (ver figura 5.1). De acuerdo con los resultados de ter Schure et al., podemos decir que un aumento de la actividad de este enzima da lugar a un incremento en la síntesis de biomasa y de amonio, que es lo que nosotros observamos cuando alimentamos glutamato. Esto sugiere que el glutamato se está dirigiendo hacia el ciclo de TCA, que aumenta la actividad del enzima NAD-GDH con la velocidad de alimentación de glutamato (porque a mayor velocidad se obtiene mayor acumulación de amoniaco) y que habrá mayor síntesis de biomasa. Los resultados de Aon y Cortassa (2001) muestran que se produce un mayor flujo de glutamato hacia el ciclo de Krebs cuando existe limitación de carbono, y por eso podemos decir también que en el periodo de tiempo en que alimentamos glutamato existe limitación de la fuente de carbono al igual que ocurre en el caso del sulfato amónico.

Cuando alimentamos sulfato amónico, la concentración de aminoácidos libres en el medio extracelular no presenta diferencias significativas con respecto al control, tal y como se aprecia en la tabla 5.5. Por el contrario, si alimentamos glutamato se observa un incremento en la concentración de aminoácidos en el medio extracelular, debido principalmente a una mayor síntesis de serina (ver tabla 5.4). La actividad de NADP-GDH disminuye (ter Schure et al., 1995) en todo el rango de concentraciones de amonio que utilizan; si extrapolamos estos resultados a nuestro caso, podemos decir que la síntesis de glutamato a partir de α -oxoglutarato (catalizada por NADP-GDH) estaría limitada cuando alimentamos sulfato amónico, y, por tanto, también lo estaría la síntesis de aminoácidos que dependen de la presencia de glutamato. Por otro lado, Aon y Cortassa (2001) observan que al alimentar amonio bajo limitación de carbono el flujo hacia la síntesis de glutamato es de 0.422mmol/(g h) y que el flujo del glutamato sintetizado hacia aminoácidos es despreciable; cuando alimentan glutamato, y también bajo limitación de carbono, obtienen que el flujo de glutamato hacia el ciclo de TCA es de 3.27 mmol/(g h) y el flujo hacia síntesis de aminoácidos es de 0.382 mmol/(g h). Concluimos que la alimentación de glutamato, y cuando existe limitación de carbono, favorece la síntesis de aminoácidos.

Hemos visto que la adición de fuentes de nitrógeno no modifica la concentración específica de GSH pero incrementa ligeramente la concentración específica de gGC, siendo el incremento mayor cuando se utiliza glutamato (figura 5.6). Jaspers et al. (1985) observaron que las concentraciones intracelulares de GSH en *S. cerevisiae* eran independientes de la fuente de nitrógeno. En *P. chrysogenum* el enzima responsable de la primera ruta de síntesis de GSH (gGCS) se vio que estaba estimulada por la presencia de glutamato en comparación al NH_4Cl , la formación de gGCS estaba reprimida por los iones amonio; además las concentraciones intracelulares de GSH no están influenciadas por cambios en las fuentes de nitrógeno (Emri et al., 1998), pero concentraciones elevadas de amonio daban lugar a mayores rendimientos de GSH (Schwartz et al., 1988). La formación de GSH no se ve afectada por la falta de nitrógeno en *S. cerevisiae* (Mehdi y Penninckx, 1997), pero la ausencia de nitrógeno extracelular

incrementa la actividad de γ -glutamyl transpeptidasa (gGT) permitiendo a las células degradar GSH si es necesario (Jaspers et al., 1985; Mehdi y Penninckx, 1997).

Las diferencias en las velocidades específicas con respecto al control cuando se alimenta glutamato al biorreactor se encuentran fundamentalmente en la síntesis de dipéptido y de dióxido de carbono. La velocidad específica de síntesis de dipéptido para la adición de glutamato es superior al control a partir de las once horas de cultivo. En cuanto a la velocidad específica de síntesis de CO₂, se ve que en el caso del glutamato el aumento en la velocidad específica se produce durante un intervalo mayor de tiempo y de forma más gradual.

Con el sulfato amónico como fuente de nitrógeno, las velocidades específicas de síntesis de dipéptido y de dióxido de carbono así como también la velocidad específica de consumo de oxígeno, presentan una diferencia apreciable con respecto al control. Mientras que la velocidad de síntesis de dipéptido es superior al control, las de consumo de oxígeno y síntesis de CO₂ son bastante inferiores.

Las conclusiones sobre el efecto del suministro de nitrógeno sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 cuando se utilizan glutamato y sulfato amónico, se pueden resumir en:

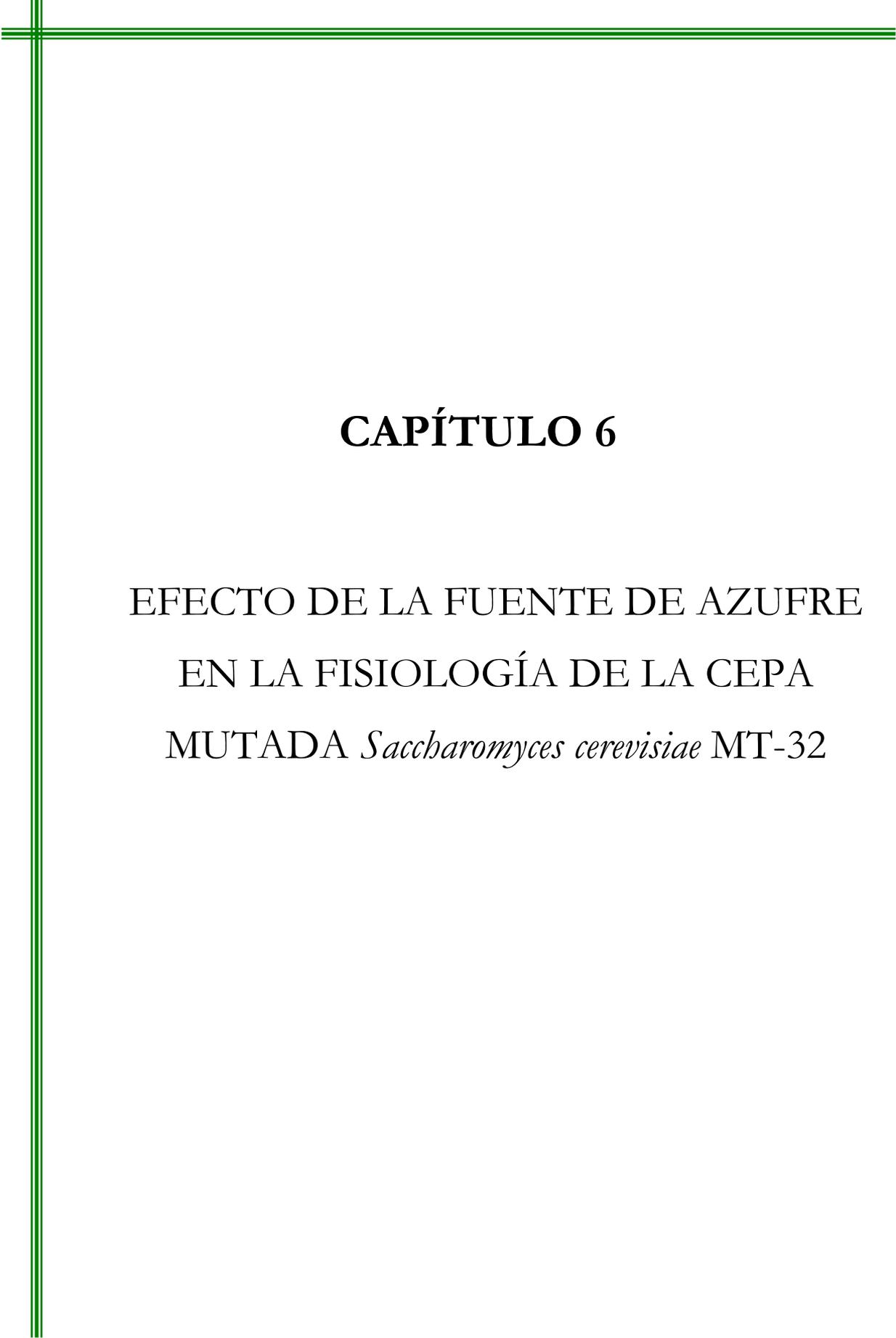
1. El aporte de nitrógeno favorece ligeramente una mayor síntesis de dipéptido, siendo mayor en el caso del glutamato en comparación al sulfato amónico (ver figura 5.5).
2. El suministro de glutamato origina un incremento continuado de la velocidad específica de producción de dióxido de carbono (figura 5.4) y una mayor velocidad específica de producción de gGC (figura 5.6).
3. El aporte de nitrógeno a través del sulfato amónico provoca una inhibición en el consumo de oxígeno y en la producción de CO₂ (figura 5.6). El estado estacionario en ambas velocidades específicas se alcanza antes que con respecto al control o al glutamato.

Los efectos producidos por el sulfato amónico en la producción específica de dipéptido, en el consumo de O₂ y producción de CO₂, se tendrán que comparar con los obtenidos teniendo en cuenta que el sulfato amónico es además fuente de azufre (Capítulo 6).

7. REFERENCIAS

- Aon J.C. and Cortassa S. 2001. Involvement of nitrogen metabolism in the triggering of ethanol fermentation in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 3: 250-264.
- Cooper T.G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In "The Molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*" (Stratarn J.N., Jones E.W. y Broach J.R. Eds.) pp 39-99, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Emri T., Pócsi I. and Szentirmar A. 1998. Changes in the glutathione (GSH) metabolism of *Penicillium chrysogenum* grown on different nitrogen, sulphur and carbon sources. *J. Basic Microbiol.* 38 (1): 3-8.
- Jaspers C.J., Gigot D. and Penninckx M.J. 1985. Pathways of glutathione degradation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 24: 703-707.
- Magasanik B. and Kaiser C.A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1-18.

- Magasanik B. 2003. Guest Commentary: Ammonia assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell 2 (5): 827-829.
- Marini A.M., Soussi-Boudekou S., Vissers S. and Andre B. 1997. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 17 (8): 4282-4293.
- Mauch K., Vaseghi S. and Reuss M. 2000. Quantitative analysis of metabolic and signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. In "Bioreaction Engineering: Modeling and control" (Schügerl K., Bellgardt K.H., Eds.) pp 435-477, Springer, Germany.
- Mehdi K. and Penninckx M.J. 1997. An important role of glutathione and γ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 143: 1885-1889.
- Nielsen J. and Villadsen J. 1994. Chapter 2. In "Bioreaction engineering principles". New York and London: Plenum Press.
- Regenberg B., Holmberg S., Olsen L.D. and Kielland-Brandt M.C. 1998. Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 33: 171-177.
- Schwartz R., Lucas M.T., Escalante L., Vázquez G. and Sánchez S. 1988. Glutathione formation in *Penicillium chrysogenum*: Stimulatory effect of ammonium. J. Gen. Microbiol. 134: 1117-1121.
- Stanbrough M. and Magasanik B. 1995. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 177 (1): 94-102.
- ter Schure E.G., Silljé H.H.W., Verkleij A.J., Boonstra J. and Verrips C.T. 1995. The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 177 (2): 6672-6675.
- ter Schure E.G., van Riel N.A.W. and Verrips C.T. 2000. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 24: 67-83.
- van Riel N.A.W., Giusseppeing M.L.F., ter Schure E.G. and Verrips C.T. 1998. A structured minimal parameter model of the central nitrogen metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: The prediction of the behavior of mutants. J. Theor. Biol. 191: 397-414.



CAPÍTULO 6

EFECTO DE LA FUENTE DE AZUFRE
EN LA FISIOLOGÍA DE LA CEPA
MUTADA *Saccharomyces cerevisiae* MT-32

CAPÍTULO 6 EFECTO DE LA FUENTE DE AZUFRE EN LA FISIOLÓGÍA DE LA CEPA MUTADA *Saccharomyces cerevisiae* MT-32

1. INTRODUCCIÓN	133
2. METODOLOGÍA	134
3. UTILIZACIÓN DE AZUFRE Y VELOCIDAD DE CONSUMO A PARTIR DE CISTEÍNA	135
4. RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LA SÍNTESIS DE BIOMASA, DIPÉPTIDO Y GSH	136
5. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE AZUFRE EN EL METABOLISMO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y EN LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓ N	137
5.1. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EN PRESENCIA DE SULFATO AMÓNICO Y CISTEÍNA	137
5.2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS	141
6. CONCLUSIÓN	142
7. REFERENCIAS	142

1. INTRODUCCIÓN

En todos los microorganismos la síntesis de aminoácidos que tengan átomos de azufre requiere de la capacidad de acumulación de átomos de azufre del medio de cultivo y de su transformación a la forma reducida S^{2-} , sulfido. *Saccharomyces cerevisiae* posee numerosas actividades bioquímicas y de transporte que le permite el uso de una amplia variedad de fuentes de azufre tanto orgánicas como inorgánicas (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997).

La cisteína es uno de los aminoácidos que intervienen en la primera ruta de síntesis de glutatión. Este aminoácido puede estar presente en el medio o bien puede sintetizarse a partir de una fuente de azufre, como puede ser el sulfato amónico. El sulfato amónico es un compuesto mucho más barato que la cisteína; resulta así interesante comparar el efecto que tendrían ambas fuentes de azufre tanto en el crecimiento de *S. cerevisiae* como en la síntesis de GSH, ya que podrían ser utilizadas de manera distinta por el microorganismo porque cada una de estas fuentes sigue una ruta metabólica diferente.

El metabolismo del azufre en *Saccharomyces cerevisiae* es muy complejo y ha dado lugar a mucha controversia. Un esquema del metabolismo del azufre en *S. cerevisiae* según Ono et al. (1999) se muestra en la figura 6.1.

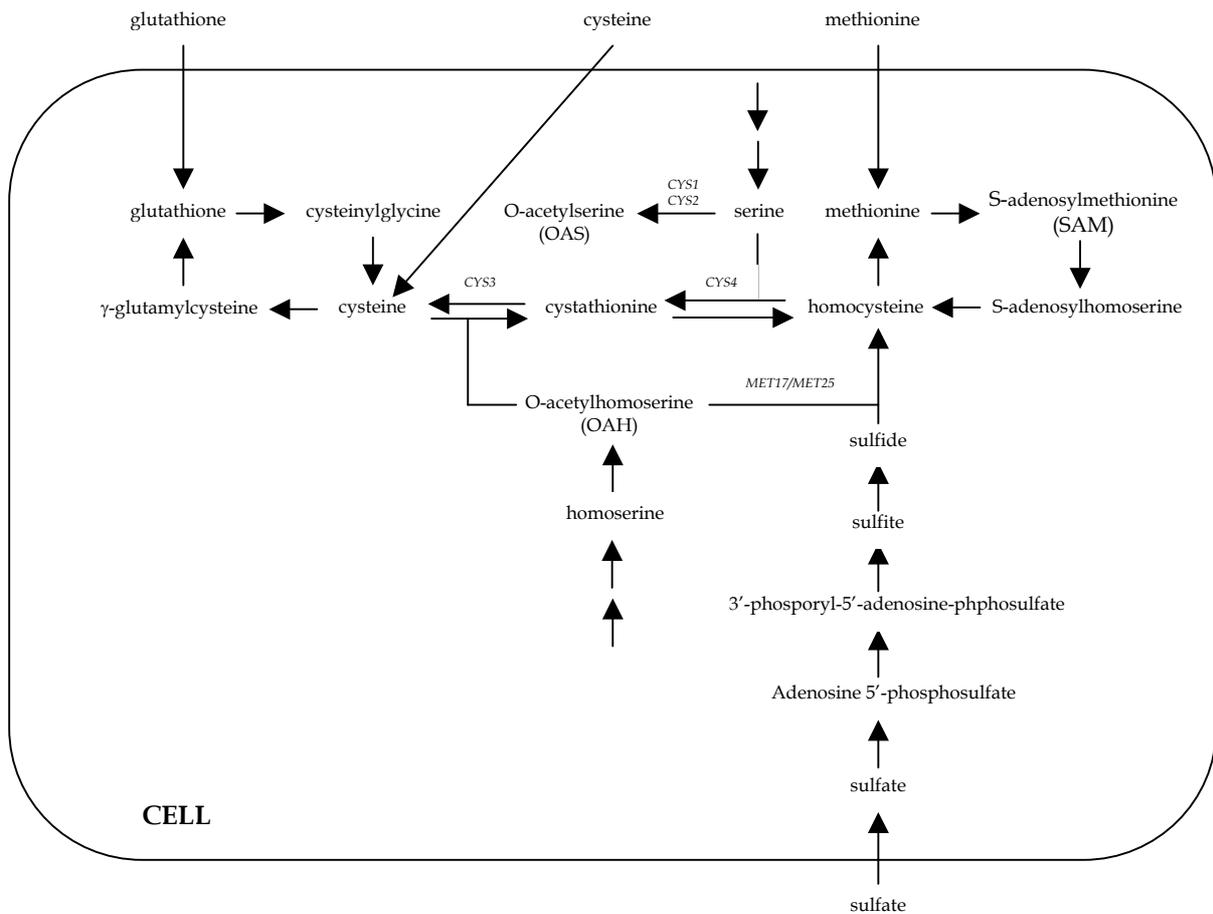


Figura 6.1 (Ono et al., 1999): Diagrama del metabolismo de azufre en *S. cerevisiae*

Como todos los nutrientes inorgánicos, el sulfato se transporta al interior de las células mediante sistemas de transporte de membrana altamente específicos; las proteínas específicas de transporte de sulfato están codificadas por los genes *SUL1* y *SUL2*; además, la transcripción de *SUL2* está regulada por el producto del gen *SUL3* (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997). Una vez que el sulfato se acumula, se reduce enzimáticamente a sulfito mediante la ruta de asimilación de azufre y es incorporado a compuestos orgánicos (Thomas y Surdin-Kerjan, 1997).

S. cerevisiae puede crecer en presencia tanto de metionina como de cisteína como únicas fuentes de azufre. Esto se debe a que las levaduras poseen dos rutas de transulfuración que catalizan la interconversión entre homocisteína y cisteína. El consumo de cisteína en *S. cerevisiae* se debe a múltiples permeasas codificadas por una serie de genes (During-Olsen et al., 1999). La homocisteína y la metionina inhiben el transporte de cisteína de forma competitiva y no competitiva, respectivamente. *S. cerevisiae* dispone de un sistema metabólico en el que estos compuestos orgánicos azufrados intercambian el azufre (Ono et al., 1999). Se pensaba que existían dos posibles rutas de síntesis de cisteína, a partir de O-acetilserina (OAS) o a partir de cistationina (CT); Ono et al. (1999) confirmaron que en *S. cerevisiae* la cisteína sólo se sintetiza a través de la ruta CT (figura 6.2).

El azufre del sulfato se incorpora a homocisteína y de aquí el flujo predominante va hacia cisteína y glutatión. Esto está de acuerdo con el hecho de que el glutatión es el mayor reservorio intracelular de azufre en *S. cerevisiae*, así como en muchos otros organismos (Elskens et al., 1991)

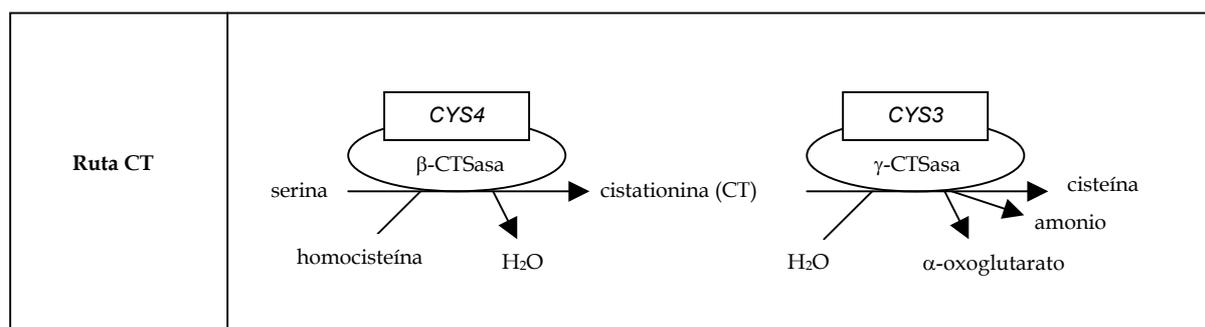


Figura 6.2 (Ono et al., 1999): Ruta de síntesis de cisteína. Las enzimas están rodeadas por una elipse y los genes correspondientes por cajas

Además la cisteína puede actuar controlando las rutas de asimilación de azufre mediante inhibición o represión de los enzimas implicados en su asimilación (Ono et al. 1991, 1996; Thomas et al., 1995), por lo que *S. cerevisiae* ha desarrollado diversos mecanismos de regulación para evitar la sobreproducción de cisteína. Esto puede ser porque la cisteína es tóxica para la célula debido a que contiene un grupo -SH muy reactivo (Ono et al., 1999).

El objetivo planteado en este capítulo es estudiar la influencia de diferentes fuentes de azufre, cisteína y sulfato amónico, sobre el crecimiento y formación de glutatión en la cepa *S. cerevisiae* MT-32.

2. METODOLOGÍA

Para el estudio se va a alimentar sulfato amónico (con velocidades: 0.25, 0.50, 1.30 y 2.00mmol/h) y cisteína (con velocidades: 0.05, 0.50, 1.30, 2.50 y 3.50mmol/h) de manera continua y a

partir de la mitad de la fase exponencial. Dichas velocidades serán también las de alimentación de átomos de azufre, ya que ambos compuestos presentan 1 mol de azufre por mol de compuesto.

Con las medidas de cisteína residual (apartado 4.5 del Capítulo 2 de Materiales y Métodos) podemos conocer la cantidad de azufre consumida de esta fuente ya que se alimenta a una velocidad conocida. Para el sulfato amónico suponemos en principio que todo el sulfato añadido se va a consumir.

La cantidad de azufre añadida en cada caso se calcula:

$$\text{Azufre añadido} = Q_S \cdot t_{\text{adición}} \frac{\gamma_S (\text{mmol})}{\text{mmol fuente azufre}}, \text{ mmol}$$

donde: $t_{\text{adición}}$: tiempo durante el que se está alimentando la fuente de azufre (h)
 Q_S : Velocidad de alimentación de sulfato amónico o de cisteína (mmol/h)
 γ_S : tiene un valor de 1 tanto para el caso del sulfato amónico como para el de la cisteína

Suponemos que cuando alimentamos sulfato amónico se consume todo el azufre; así, el azufre residual será igual a cero. Sin embargo, a partir de las medidas de cisteína en el medio extracelular, conoceremos la cantidad de cisteína añadida que no se ha consumido, es decir, el azufre residual:

$$\text{Azufre residual} = \text{Cisteína residual (mmol/L)} \frac{\text{mmol S}}{\text{mmol cisteína}} V (\text{L}), \text{ mmol}$$

donde: Cisteína residual: Se obtiene de la medida de cisteína en el filtrado de la muestra (mM)
 V : Volumen en el reactor antes de tomar la muestra (L)

3. UTILIZACIÓN DE AZUFRE Y VELOCIDAD DE CONSUMO A PARTIR DE CISTEÍNA

Vamos a comparar el azufre total consumido por parte de la célula cuando se alimenta cisteína, y durante el periodo de tiempo comprendido desde el inicio de la alimentación de la fuente hasta el momento en que la sacarosa y el etanol se hacen limitantes. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.1.

Caudal Cisteína (mmol/h)	Tiempo considerado (h)	Azufre añadido (mmol)	Azufre consumido (mmol)
0.05	13.02	0.25	0.00
0.55	12.69	2.71	0.00
1.30	13.25	6.73	1.70
2.50	13.61	14.58	8.02
3.50	13.46	20.55	13.66

Tabla 6.1: Valores de azufre añadido y azufre consumido para diferentes experimentos de alimentación de cisteína

Como podemos ver (tabla 6.1) a medida que aumenta la cantidad de cisteína añadida (azufre añadido) aumenta la cantidad de azufre consumido. Para la velocidad de alimentación de cisteína de 0.05mmol/h los valores obtenidos de azufre consumido son negativos, esto significa que se está produciendo cisteína; parece ser, por tanto, que velocidades de alimentación de cisteína bajas favorecen el metabolismo de síntesis de cisteína. En el caso de la velocidad de cisteína de 0.55mmol/h, ocurre que en un principio se observa consumo de cisteína y conforme el cultivo se aproxima al estado estacionario se observa formación de cisteína; la cantidad de cisteína producida es la misma que la cantidad consumida previamente, por eso el balance global de azufre consumido es igual a cero.

De estos resultados se constata una cierta relación entre la velocidad de alimentación de cisteína y la velocidad de consumo de azufre. En la figura 6.3 se representan las velocidades específicas de consumo de azufre para las distintas velocidades de alimentación de cisteína (apartado 5 del Capítulo 2). Al utilizar una velocidad de alimentación de cisteína mayor se consigue ir incrementando la velocidad específica de consumo de azufre con el tiempo; es decir, a mayor velocidad de alimentación de cisteína se alcanza una mayor velocidad de consumo de la misma.

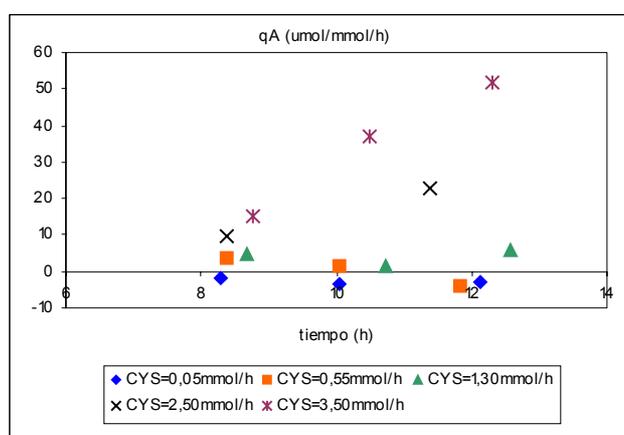


Figura 6.3: Velocidad de consumo de azufre con el tiempo para diferentes velocidades de alimentación de cisteína

4. RENDIMIENTOS OBTENIDOS EN LA SÍNTESIS DE BIOMASA, DIPÉPTIDO Y GSH

Calculamos ahora los rendimientos de biomasa, gamma-glutamilcisteína y glutatión a partir del azufre consumido y cuando se alimenta cisteína al biorreactor (tabla 6.2), ya que la alimentación de sulfato amónico, al menos a las velocidades estudiadas, no modifica el metabolismo de síntesis de GSH (ver apéndice A).

Caudal Cisteína (mmol/h)	tiempo considerado (h)	Azufre consumido (mmol)	Biomasa (mmol)	gGC (μ mol)	GSH (μ mol)	$Y_{X/A}$ (mol biom / mmol S)	$Y_{gGC/A}$ (mmol gGC / mmol S)	$Y_{GSH/A}$ (mmol GSH / mmol S)
0.55	12.69	0.76	104.09	51.26	197.49	0.137	0.067	0.260
1.30	13.25	1.70	90.09	62.45	198.85	0.053	0.037	0.117
2.50	13.61	8.02	68.20	96.38	137.03	0.009	0.012	0.017
3.50	13.46	13.66	69.77	28.67	100.64	0.005	0.002	0.007

Tabla 6.2: Rendimientos de biomasa, gGC y GSH con respecto al azufre consumido para diferentes velocidades de alimentación de cisteína

Aunque a la velocidad de alimentación de cisteína de 0.55mmol/h vimos (tabla 6.1) que todo lo consumido se utilizaba en posterior síntesis de cisteína haciendo que el balance global fuera cero, para calcular ahora los rendimientos a partir de este valor de velocidad vamos a tener en cuenta la cantidad consumida.

En la tabla 6.2 se observa que todos los rendimientos disminuyen a medida que aumenta la cantidad de azufre consumida, o lo que es lo mismo, la velocidad de alimentación de cisteína. Si nos fijamos en la cantidad de biomasa producida, ésta disminuye hasta un valor mínimo de unos 69mmol que se alcanza cuando la velocidad de alimentación de cisteína es de 2.50mmol/h; es decir, una velocidad de alimentación superior de cisteína no disminuye la concentración de biomasa. Este valor de biomasa es el que existe justo en el punto en el que comienza la adición del aminoácido. Sin embargo, para los dos últimos valores de velocidad aunque la concentración de biomasa sea la misma, el rendimiento $Y_{X/A}$ disminuye porque sigue aumentando la cantidad de azufre consumido.

El dipéptido acumulado va aumentando con la cantidad de azufre consumido y alcanza un máximo de unos 96 μ mol, que coincide con una velocidad de alimentación de cisteína de 2.50mmol/h. Una velocidad de alimentación de cisteína superior a 2.50mmol/h provoca un descenso en la cantidad de dipéptido acumulado. Aunque la cantidad de dipéptido sintetizado aumente al incrementarse la cantidad de azufre consumido, el rendimiento Y_{GCA} disminuye puesto que el incremento del azufre consumido entre un valor de velocidad de alimentación de cisteína y otro es superior al incremento que sufre la cantidad de dipéptido sintetizado.

La concentración de glutatión intracelular disminuye de manera continua con el aumento de velocidad de alimentación de cisteína (aunque los valores de 0.55 y 1.30mmol/h tienen prácticamente la misma concentración de GSH). Esto supone un descenso en el valor de rendimiento $Y_{GSH/A}$.

Estos resultados muestran una relación clara entre el crecimiento y el metabolismo del GSH con la cantidad de azufre consumida a partir de la cisteína añadida. Dicha relación se analizará en mayor detalle en el Capítulo 7.

5. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE AZUFRE EN EL METABOLISMO DE *Saccharomyces cerevisiae* Y EN LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

El azufre aportado a partir del sulfato amónico o de la cisteína, puede seguir distintas rutas dentro de la célula (figura 6.1) originando diferencias en el metabolismo. Para analizar estas diferencias, vamos a comparar el efecto de adición de azufre (con una misma velocidad) a partir de dichas fuentes, sobre el crecimiento de la levadura, síntesis de glutatión y metabolismo de los aminoácidos.

5.1. COMPARACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EN PRESENCIA DE SULFATO AMÓNICO Y CISTEÍNA

En la figura 6.4 se muestran los perfiles representativos del metabolismo de la cepa mutada cuando se alimenta azufre al biorreactor con una velocidad de 1.30mmol/h, utilizando tanto cisteína como sulfato amónico. No se incluye el consumo de sacarosa en la figura porque no se observan diferencias entre ambas fuentes con respecto al control.

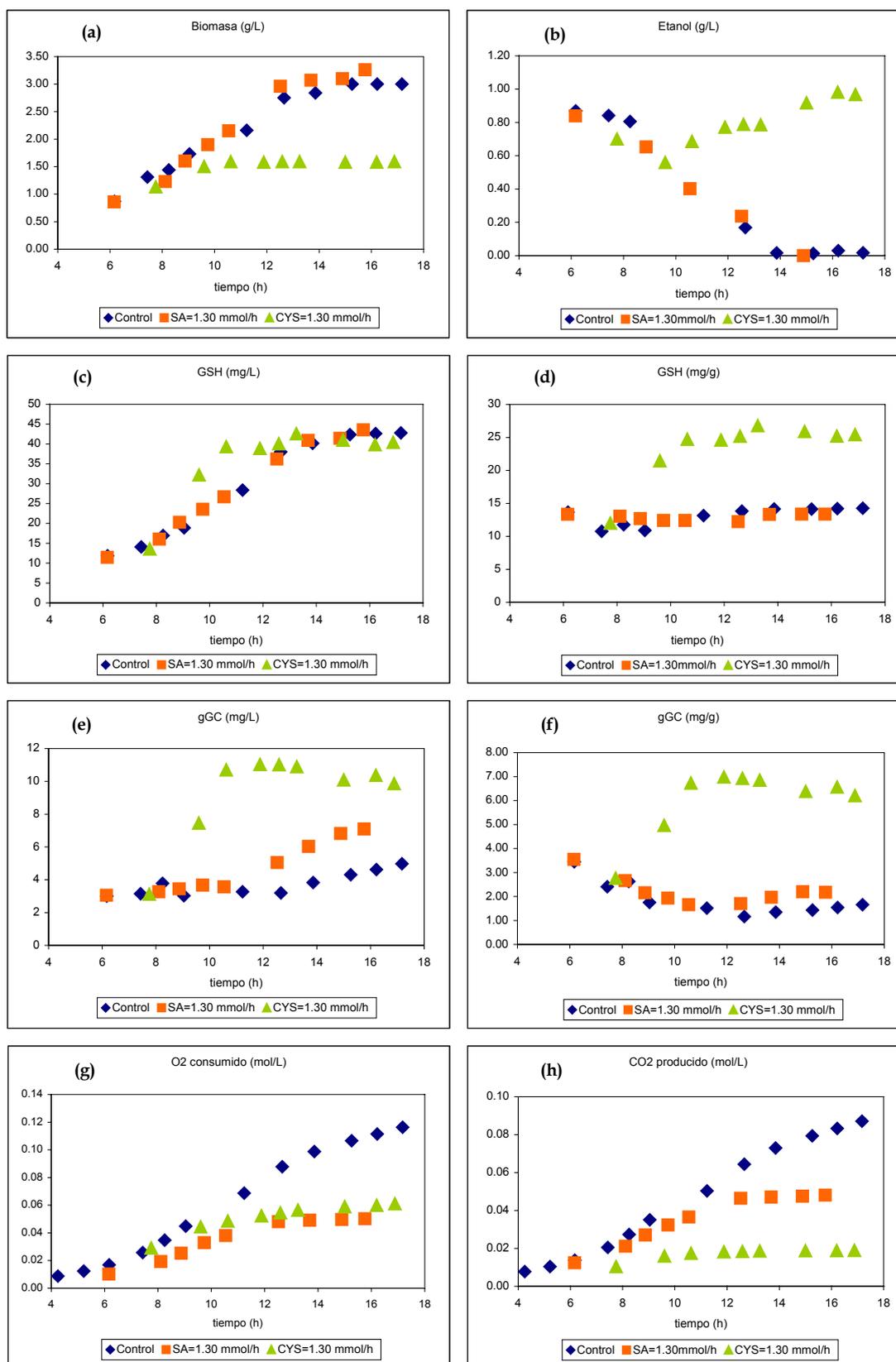


Figura 6.4: Perfiles representativos del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 con dos fuentes de azufre: cisteína (\blacktriangle) y sulfato amónico (\blacksquare), para una velocidad de alimentación de azufre de 1.30mmol/h, y en comparación al control (\blacklozenge)

Hay que hacer notar, figuras 6.4 (a) y (b), que la cisteína provoca inhibición en el crecimiento además de sintetizar etanol; la inhibición puede ser debida a que no se consume etanol y que además la sacarosa se dirige hacia el metabolismo de etanol en lugar de hacerlo hacia el de biomasa. La evolución de biomasa y etanol para el sulfato amónico es la misma que en el control.

La concentración específica de GSH se ve incrementada sólo cuando se utiliza cisteína como fuente de azufre, como se observa en la figura 6.4 (d). Sin embargo en todos los casos se alcanza la misma concentración total de GSH, figura 6.4 (c), a causa de las diferencias en la concentración de biomasa para cada caso.

El aporte de azufre favorece una mayor síntesis de dipéptido, figuras 6.4 (e) y (f); sin embargo, el efecto es diferente dependiendo de la fuente de la que procede. Si se utiliza cisteína (y a la velocidad de alimentación de 1.30mmol/h) se produce un incremento considerable en la síntesis de gGC desde el momento de la adición hasta el tiempo de unas once horas. Cuando el sulfato amónico es la fuente de azufre, la síntesis de dipéptido se ve incrementada a partir de las once horas de cultivo y en menor medida.

El suministro continuo de azufre genera inhibición de la respiración, figura 6.4 (g), que es independiente de la fuente empleada; es decir, la evolución en la concentración de oxígeno consumida es la misma tanto para la cisteína como para el sulfato amónico. En consecuencia, el aporte de azufre también provoca inhibición en la síntesis de dióxido de carbono, figura 6.4 (h). Sin embargo, la inhibición de la producción de CO₂ sí depende de la fuente utilizada y es mucho mayor cuando la cisteína es el sistema de transporte de azufre a la célula. Se puede decir que la inhibición en el consumo de oxígeno y en la producción de CO₂, debida a la adición de sulfato amónico (figura 5.2 del Capítulo 5) no procede del aporte de nitrógeno, sino del aporte de azufre.

En el experimento de sulfato amónico (figura 6.4) no observamos cambios en la síntesis de GSH con respecto al control, y lo mismo ocurre con el resto de velocidades de sulfato amónico estudiadas (apéndice A). Podemos suponer entonces que el azufre no fluye hacia síntesis de cisteína. El suponer que todo el azufre administrado como sulfato amónico se consume, no quiere decir que todo ese azufre se dirija hacia cisteína; puede dirigirse también a otros compuestos azufrados como los indicados en la figura 6.1.

Mediante las medidas de cisteína y metionina libres en el medio extracelular de dos de los experimentos con alimentación de sulfato amónico y del experimento control, podemos llegar a la conclusión de que el sulfato consumido a partir del sulfato amónico no se dirige hacia síntesis de cisteína o metionina (ver tabla 6.3); se puede estar acumulando en otros compuestos azufrados o en el interior de la célula o puede ser incluso que no se incorpore al interior de la célula tal y como habíamos supuesto.

Caudal (NH ₄) ₂ SO ₄ (mmol/h)	Tiempo considerado (h)	Azufre añadido (mmol)	Metionina (μM)	Cisteína (μM)
0.00 (control)	13.68	0.00	5.071	19.360
0.50	13.70	3.13	6.284	21.421
1.30	13.69	7.94	6.148	21.003

Tabla 6.3: Cisteína y metionina libres extracelulares en el experimento control y para velocidades de alimentación de sulfato amónico de 0.50 y 1.30mmol/h

Con el fin de apreciar otras posibles diferencias en el metabolismo, se van a analizar las velocidades específicas de: crecimiento, consumo de etanol, síntesis de dipéptido y de glutatión, de consumo de oxígeno y de síntesis de dióxido de carbono, figura 6.5

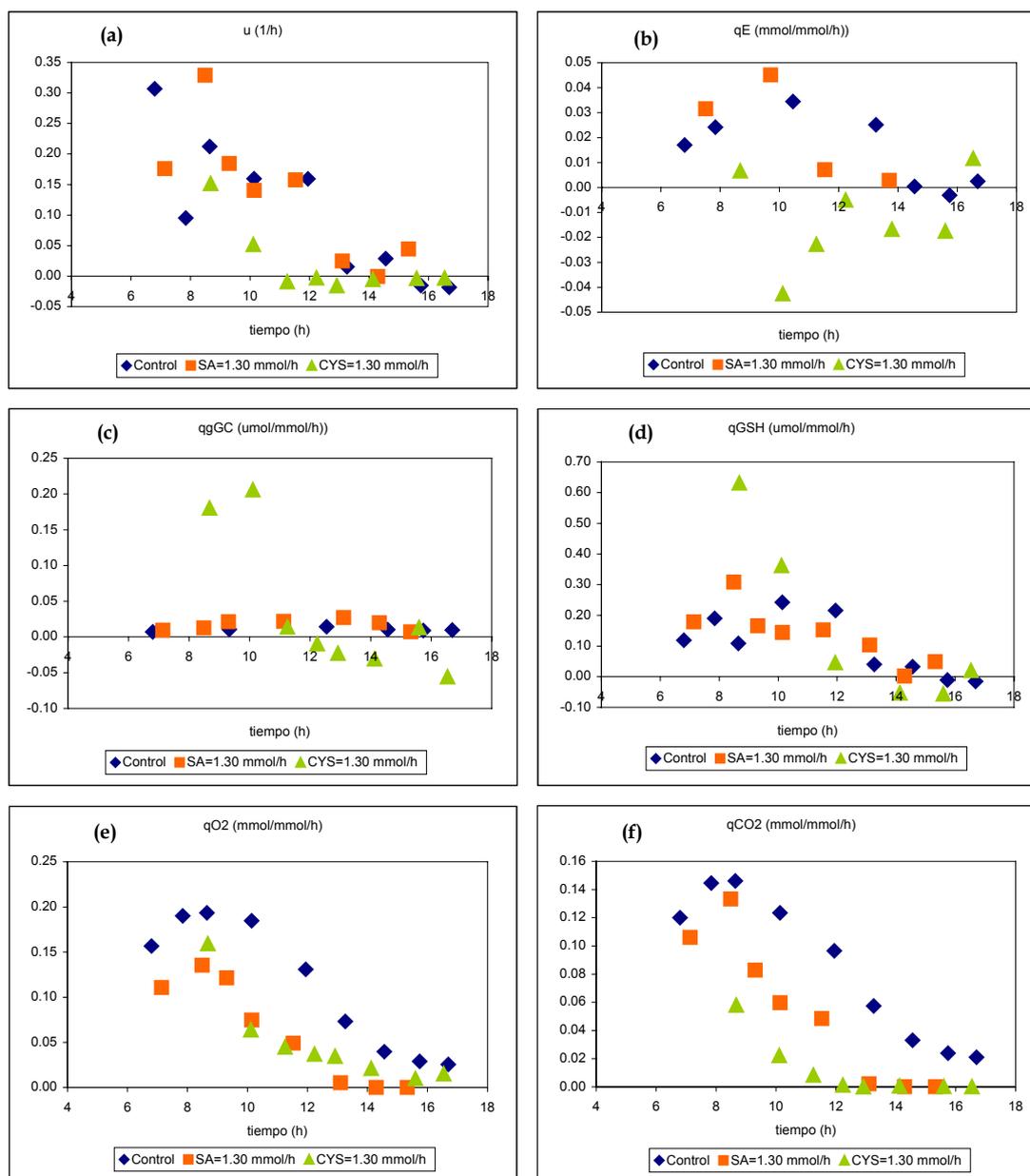


Figura 6.5: Velocidades específicas de síntesis y consumo de metabolitos representativos del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 con dos fuentes de azufre: cisteína (\blacktriangle) y sulfato amónico (\blacksquare), para una velocidad de alimentación de azufre de 1.30mmol/h, y en comparación al control (\blacklozenge)

De la figura 6.5 (a), se ve claramente que la alimentación de cisteína tiene como consecuencia la inhibición en la velocidad específica de crecimiento. Los valores negativos de la velocidad específica de consumo de etanol, figura 6.5 (b), supone que en realidad se está sintetizando etanol. Luego, se puede decir que la cisteína reconduce los flujos de manera que en lugar de consumirse etanol, éste se produce. Las velocidades específicas de síntesis de dipéptido y de GSH, figuras 6.5 (c) y (d) respectivamente, son superiores en el experimento con alimentación de cisteína y en comparación al experimento con alimentación de sulfato amónico y al control.

En general, los datos del sulfato amónico son muy próximos al control, a excepción del consumo de oxígeno y producción de CO₂. Las velocidades específicas de consumo de O₂ para la cisteína y sulfato amónico, figura 6.5 (e), son menores que en el control y en ambos sustratos siguen la misma evolución. Esto puede describir un efecto inhibitorio del azufre sobre el mecanismo

respiratorio. Las velocidades específicas de producción de dióxido de carbono, figura 6.5 (f), también son menores al control, estando q_{CO_2} en el caso de la cisteína por debajo de los valores del $(NH_4)_2SO_4$.

5.2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Deseamos comparar la concentración de aminoácidos libres extracelulares en un medio alimentado con cisteína o con sulfato amónico para el estado estacionario (tabla 6.4). Incluimos los datos para el punto inicial (antes de alimentar la fuente de azufre) y para el control en el estado estacionario (sin alimentación de azufre).

Aminoácido (μM)	Inicial	Control	Cisteína (0.50mmol/h)	Cisteína (1.30mmol/h)	$(NH_4)_2SO_4$ (0.50mmol/h)	$(NH_4)_2SO_4$ (1.30mmol/h)
Ac. Aspártico	399.241	18.268	34.426	95.036	25.036	26.369
Ac. Glutámico	882.675	4.779	129.635	194.239	69.621	80.781
Serina	985.286	4.900	29.639	270.554	22.150	21.894
Histidina	2133.984	30.345	1142.917	1442.316	42.861	50.912
Glicina	26.369	0.000	15.992	24.862	6.336	5.572
Arginina	30.822	8.856	38.820	10.092	20.358	27.658
Treonina	29.263	14.172	33.721	28.197	36.687	34.089
Alanina	2107.429	3.175	975.254	1372.454	57.113	88.380
Prolina	619.778	14.981	225.770	324.496	7.990	5.511
Cisteína	12.120	19.360	1978.545	3519.372	21.421	21.003
Tirosina	245.285	51.403	193.205	164.193	11.587	20.187
Valina	904.745	11.178	549.675	609.346	33.086	50.855
Metionina	52.604	5.071	10.647	7.795	6.284	6.148
Lisina	89.659	45.081	30.002	4.566	40.848	28.501
Isoleucina	560.851	18.472	179.542	235.648	27.201	27.260
Leucina	948.606	4.155	241.744	301.735	6.412	6.913
Fenilalanina	372.577	4.417	147.310	132.769	7.972	9.993
TOTAL	10932	259	3978	5218	443	512

Tabla 6.4: Medida de aminoácidos libres extracelulares una vez consumida toda la fuente de carbono (estado estacionario) de cultivos con alimentación de azufre a partir de cisteína o sulfato amónico a las velocidades de 0.50 y 1.30mmol/h, de un cultivo control (sin alimentación de azufre) y del momento inicial antes de alimentar la fuente de azufre. Para calcular la concentración total de aminoácidos y en el caso de la alimentación de cisteína, no se tiene en cuenta la concentración de cisteína medida en el medio extracelular

Las concentraciones de aminoácidos libres extracelulares son generalmente mayores a mayor velocidad de alimentación de cisteína y son prácticamente iguales a las distintas velocidades de alimentación de sulfato amónico. En comparación al control, la acumulación de aminoácidos en el medio extracelular cuando se alimenta cisteína es bastante mayor; cuando se alimenta sulfato amónico la diferencia es menor.

Hay una serie de aminoácidos para los cuales la concentración extracelular en las muestras finales de cultivos alimentados con cisteína es mayor que para las mismas muestras de cultivos alimentados con sulfato amónico. Estos aminoácidos son: ácido glutámico, histidina, alanina, prolina, tirosina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina. Puede ser que un menor consumo de estos aminoácidos esté relacionado con la mayor inhibición en el crecimiento. También se observa mayor concentración de aspártico y serina pero sólo en el caso de la mayor velocidad de alimentación de cisteína. Se puede concluir que a mayor velocidad de alimentación de cisteína se produce menor consumo de los aminoácidos presentes inicialmente en el medio extracelular.

6. CONCLUSIÓN

Se ha visto, figura 6.4 (d), que si utilizamos sulfato amónico como fuente de azufre no se obtiene una mayor síntesis de GSH con respecto al control; tampoco se producen cambios significativos en la producción de dipéptido, figura 6.4 (f). Según Miyake et al. (1999) la utilización de sulfato como fuente de azufre demanda mucha energía; la reducción de SO_4^{2-} a SH^- (o SH_2) requiere de 2 moléculas de ATP y 3 de NADPH. Por tanto, es razonable asumir que *S. cerevisiae* ha desarrollado sistemas de regulación para utilizar preferentemente compuestos orgánicos que contengan azufre en lugar de sulfato (Mountain et al., 1991; Thomas et al., 1992; Ono et al., 1996). Sin embargo si la concentración de glutatión es limitada, la célula se ve forzada a utilizar tanto el sulfato extracelular como el intracelular. Si extrapolamos las conclusiones de Miyake et al., podemos decir que la concentración de GSH en *S. cerevisiae* MT-32 es suficientemente alta como para que la célula necesite consumir azufre a partir de sulfato, el cual requiere de una elevada energía para su utilización; es decir, la cantidad de glutatión de la cepa es suficiente como para actuar como reserva de azufre y no necesita incorporar sulfato. Incluso puede estar ocurriendo que el nivel de cisteína que existe en el interior de la célula esté inhibiendo los enzimas de asimilación de azufre, tal como se vio en la introducción de este capítulo.

En la figura 6.4 (g) se aprecia que tanto la cisteína como el sulfato amónico provocan la misma inhibición en el consumo de oxígeno para cuando se alimentan a igual velocidad. Podemos atribuir este efecto a los átomos de azufre. Por tanto, la inhibición en el consumo de O_2 que se observaba en la figura 5.2 del Capítulo 5, se puede considerar que es debida al hecho de que el sulfato amónico además de ser fuente de nitrógeno, constituye una fuente de azufre.

La alimentación de azufre utilizando como fuente la cisteína da como resultado un aumento en las concentraciones específicas tanto de dipéptido como de glutatión, inhibición en el consumo de etanol y de oxígeno e inhibición en el crecimiento.

7. REFERENCIAS

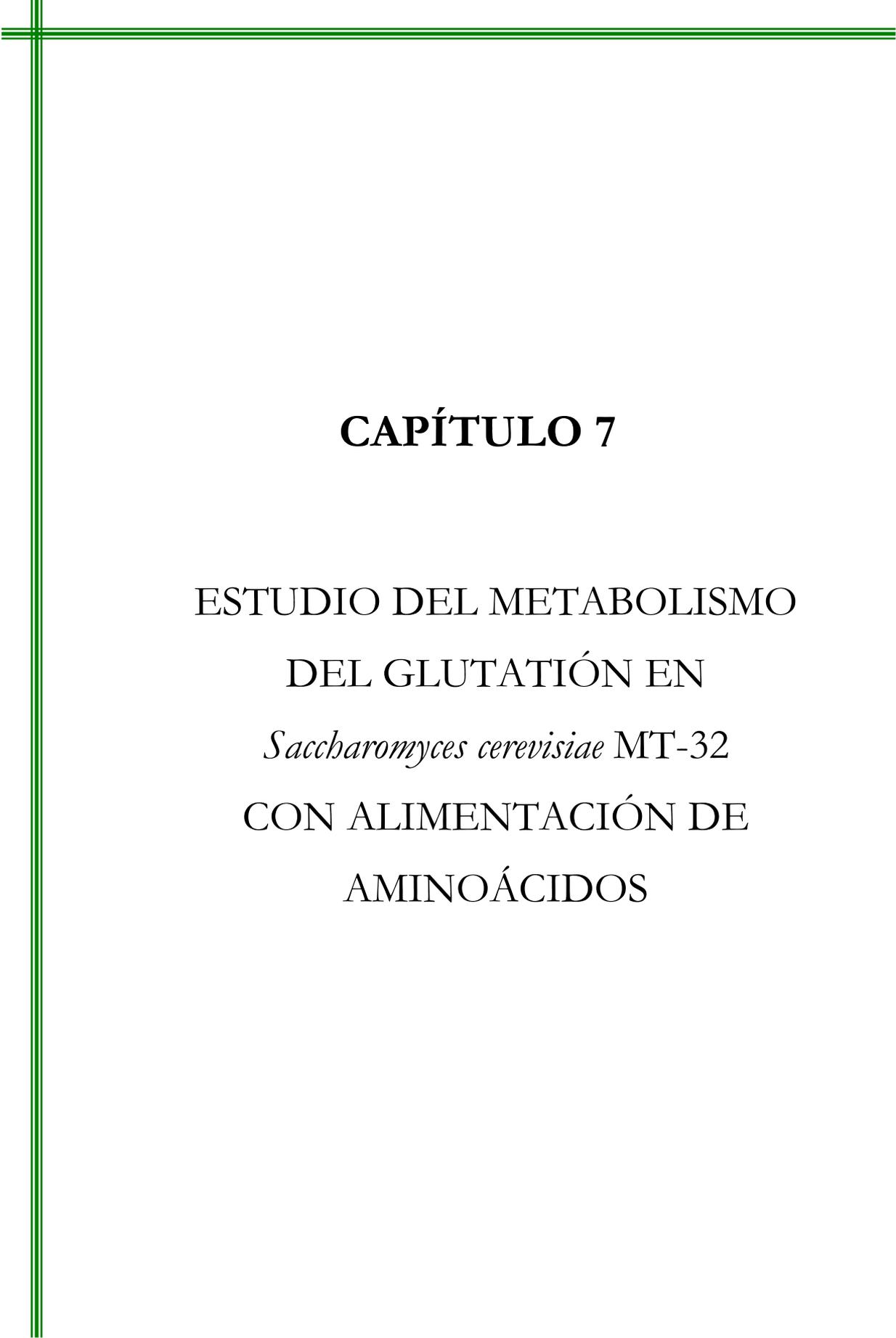
- During-Olsen L., Regenber B., Gjermansen C., Kelland-Brandt M.C. and Hansen J. 1999. Cysteine uptake by *Saccharomyces cerevisiae* is accomplished by multiple permeases. *Curr. Genet.* 35 (6): 609-617.
- Elskens M.T., Jaspers C. and Penninckx M.J. 1991. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 637-644.
- Miyake T., Sammoto H., Kanayama M., Tomochika K., Shinoda S. and Ono B. 1999. Role of the sulphate assimilation pathway in utilization of glutathione as a sulphur source by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1449-1457.
- Mountain H.A., Bystrom A.S., Larsen J.T. and Korch C. 1991. Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 781-803.
- Ono B., Naito K., Shirahige Y. and Yamamoto M. 1991. Regulation of cystathionine γ -lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 843-848.
- Ono B., Kijima K., Ihii N., Kawato T., Matsuda A., Paszewski A. and Shinoda S. 1996. Regulation of sulphate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 1153-1162.

Ono B., Hazu T., Yoshida S., Kawato T., Shinoda S., Brzvwczy J. and Paszewski A. 1999. Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. *Yeast* 15: 1365-1375.

Thomas D., Jacquemin I. and Surdin-Kerjan Y. 1992. *MET4*, a leucine zipper protein, and centromere-binding factor 1 are both required for trnascriptional activation of sulfur metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 12: 1719-1727.

Thomas D., Kuras L., Barbey R., Cherest H., Blaseau P.L. and Surdin-Kerjan Y. 1995. Met30p, a yeast transcriptional inhibitor that responds to S-adenosylmethionine, is an essential protein with WD40 repeats. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6526-6534.

Thomas D. and Surdin-Kerjan Y. 1997. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (4): 503-532.



CAPÍTULO 7

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 CON ALIMENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS

CAPÍTULO 7 ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL GLUTATIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 CON ALIMENTACIÓN DE AMINOÁCIDOS

1. INTRODUCCIÓN	149
2. ESTUDIO DEL MODO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS	149
2.1. ALIMENTACIÓN CONTINUA DE CISTEÍNA	150
2.2. ALIMENTACIÓN DE CISTEÍNA EN PULSOS	152
3. EFECTO DE LA PRESENCIA DE CISTEÍNA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	155
3.1. EVOLUCIÓN DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE CISTEÍNA	160
4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLUTAMATO EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	162
4.1. EVOLUCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE GLUTAMATO	165
5. EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLICINA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	167
5.1. EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE GLICINA	169
6. INTERPRETACIÓN DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE CISTEÍNA, GLUTAMATO Y GLICINA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	172
6.1. DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS	175
6.2. DEFINICIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL PARA LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS HACIA LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN	179
7. REFERENCIAS	183

1. INTRODUCCIÓN

El glutatión se sintetiza a partir de cisteína, glutamato y glicina por la acción de gamma-glutamilcisteína sintetasa (gGCS) y glutatión sintetasa (GS). Estudios desarrollados sobre las propiedades de gGCS y GS muestran que estas enzimas se inhiben de manera retroalimentaria por GSH y GSSG respectivamente (Murata y Kimura, 1990), siendo el primer enzima el limitante en la síntesis de glutatión. El enzima glutatión sintetasa no está sujeto a inhibición retroalimentaria por GSH (Lu, 1999).

El único enzima conocido hasta el momento que degrada el glutatión es gamma-glutamyltranspeptidasa (gGT, EC 2.3.2.2). Este enzima está unido a la membrana de la vacuola y cataliza la transferencia del resto gamma-glutamyl a un aminoácido, formando gamma-glutamylaminoácido y cisteinilglicina, que bajo la acción de diversos enzimas darán lugar en último término a glutamato, cisteína y glicina (ver figura 1.1 del Capítulo 1).

La cisteína es el aminoácido clave para aumentar la síntesis de GSH, no sólo debido a su función como precursor, sino también debido a una función como inductor (Udeh y Achremowicz, 1994). El efecto positivo de los átomos de azufre en el contenido de GSH es consistente con la observación realizada por Elskens et al. (1991) de que las células crecidas en presencia de un exceso de átomos de azufre acumulan mayores niveles de GSH; concluyen que el exceso de átomos de azufre suprime la actividad de gamma-glutamyl transpeptidasa (gGT) que es responsable de la degradación de GSH. Por otro lado, Kumar et al. (2003) describen la importancia del enzima gGT para generar principalmente fuente de nitrógeno y de sus estudios suponen que la utilización de glutatión como fuente de azufre es independiente tanto de la actividad de gGT como de la fuente de nitrógeno; esto demuestra la existencia de una ruta alternativa, independiente de gGT, para la degradación del GSH cuando la fuente de azufre es limitante.

Puesto que la cisteína es altamente reactiva, su exceso debe ser tóxico para la célula. Por tanto, se puede entender que los organismos desarrollan procesos para mantener los niveles celulares de cisteína lo más bajos posibles; acumulan cisteína en forma de glutatión, que es menos tóxico para la célula que la cisteína (Miyake et al., 1998).

El objetivo que nos planteamos en este capítulo es estudiar el efecto que tendría la adición de cisteína, glutamato o glicina sobre el metabolismo de *S. cerevisiae* MT-32; es decir, el efecto sobre el crecimiento, consumo de nutrientes, consumo de O₂, producción de CO₂, y síntesis de gGC y GSH. También vamos a estudiar el mejor modo de adición.

A partir de los resultados que obtengamos de los diferentes experimentos con adición de aminoácidos, podremos desarrollar un análisis de flujos centrado en las reacciones de síntesis de GSH y que nos permita posteriormente definir una estrategia de control dirigida a aumentar la concentración tanto de dipéptido como de glutatión.

2. ESTUDIO DEL MODO DE ADICIÓN DE AMINOÁCIDOS

El momento de alimentación de aminoácidos y el modo de operación son dos aspectos críticos en la mejora de la síntesis de GSH. La optimización del primero se llevó a cabo en el Capítulo 4. Vamos a estudiar cuál es el mejor modo de alimentación utilizando sólo cisteína; los resultados que obtengamos serán aplicables al resto de experimentos con alimentación de algún sustrato.

Nos planteamos llevar a cabo dos estrategias de adición de cisteína:

1. Adición **continua** de cisteína: Se añade al biorreactor un medio de cisteína a una velocidad constante y de manera continua. Elegimos tres valores de velocidades de alimentación de cisteína: una baja (0.05mmol/h), una intermedia (0.55mmol/h) y una elevada (1.30mmol/h).
2. Adición de cisteína **en pulsos**: La cantidad de moles añadidos de manera continua se añadirán en modo de pulsos, bien sea a través de un solo pulso o bien a través de una serie de pulsos espaciados en el tiempo.

Del estudio sobre el momento de alimentación, se ve que el óptimo coincide con la mitad de la fase exponencial; luego a este tiempo empezaremos la alimentación de cisteína en continuo o en pulsos.

2.1. ALIMENTACIÓN CONTINUA DE CISTEÍNA

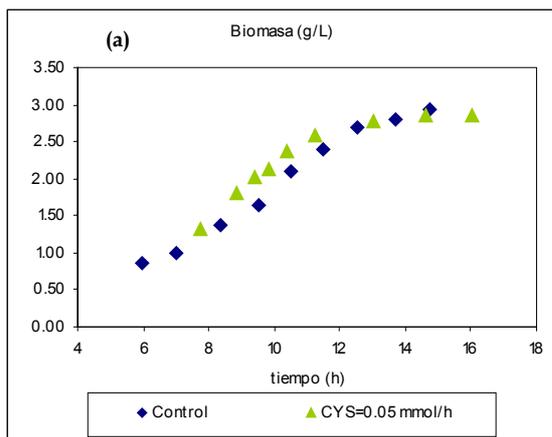
En la figura 7.3 se muestran los resultados de la concentración de biomasa cuando alimentamos cisteína de manera continua a las velocidades de 0.05, 0.55 y 1.30mmol/h. La adición de cisteína, como se observa en la figura 7.3, provoca inhibición en el crecimiento cuanto mayor sea la velocidad de alimentación empleada. Para poder conocer la concentración de cisteína que produce esta inhibición, calculamos las concentraciones de cisteína en el medio y las concentraciones específicas para cada una de las muestras tomadas; los resultados están plasmados en la tabla 7.1.

Para la velocidad de alimentación de 0.05mmol/h, figura 7.3 (a), no se produce inhibición en el crecimiento; la concentración de cisteína inhibitoria deberá ser entonces superior a 0.3mM o a 0.10mmol/g (tabla 7.1).

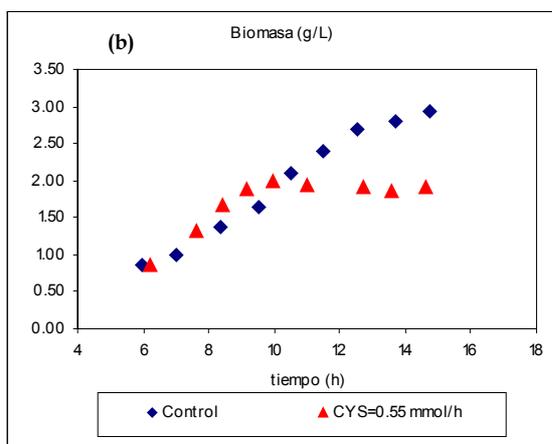
Vemos que a partir de las 9.60 horas de cultivo, figura 7.3 (c), ya no se sintetiza más biomasa; a dicho tiempo es cuando se toma la primera muestra a partir de la adición de cisteína; por tanto, la concentración inhibitoria de cisteína será menor a 1.42mM o inferior a 0.96mmol/g (tabla 7.1).

En la figura 7.3 (b), la inhibición en el crecimiento se produce a partir de la muestra tomada a tiempo de 9.14 horas; así, la concentración de cisteína a partir de la cual se produce inhibición en el crecimiento se establece como la concentración que existe a este tiempo, y que es de 0.53mM ó 0.28mmol/g (tabla 7.1).

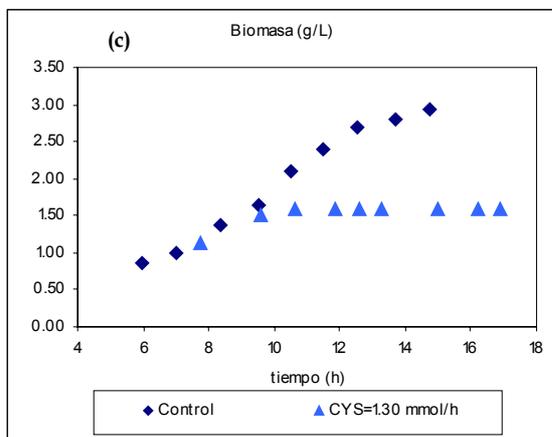
Alfajara et al. (1992b) notaron que no se producía inhibición en el crecimiento si la dosis de cisteína era inferior a 0.7mmol/g. Por su parte Maw (1961) expresó que no se producía inhibición en el crecimiento cuando la concentración de cisteína era menor a 0.78mM. Las diferencias que tenemos con estos autores en los valores de concentración de cisteína puede deberse a que se trabaja con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* diferentes.

**0.05mmol cisteína/h**

Tiempo (h)	Concentración de Cisteína añadida al reactor (mM)	mmol Cisteína añadida / g biomasa
7.74	-	-
8.84	0.03	0.02
9.38	0.05	0.02
9.86	0.07	0.03
10.41	0.09	0.04
11.25	0.12	0.05
13.02	0.18	0.07
14.65	0.24	0.09
16.03	0.30	0.10

**0.55mmol cisteína/h**

Tiempo (h)	Concentración de Cisteína añadida al reactor (mM)	mmol Cisteína añadida / g biomasa
7.60	-	-
8.45	0.26	0.16
9.14	0.53	0.28
9.94	0.85	0.43
10.97	1.26	0.66
12.69	1.96	1.04
13.60	2.35	1.29
14.65	2.8	1.49

**1.30mmol cisteína/h**

Tiempo (h)	Concentración de Cisteína añadida al reactor (mM)	mmol Cisteína añadida / g biomasa
7.75	-	-
9.60	1.42	0.96
10.62	2.31	1.47
11.88	3.41	2.19
12.59	4.06	2.59
13.25	4.69	2.99
15.00	6.26	4.02
16.20	7.35	4.72
16.88	8.03	5.12

Figura 7.3: Comparación de biomasa entre el experimento control (sin cisteína, \blacklozenge) y los experimentos con alimentación continua de cisteína a las velocidades de 0.05mmol/h (\blacktriangle), 0.55mmol/h (\blacktriangle) y 1.30mmol/h (\blacktriangle)

Tabla 7.1: Concentraciones de cisteína en el reactor a distintos tiempos para las diferentes velocidades de alimentación continua de cisteína

En la figura 7.4, se representan las concentraciones específicas tanto de dipéptido como de glutatión. Independientemente de la velocidad de alimentación de cisteína utilizada, la concentración específica de GSH aumenta de manera considerable con respecto al control; es aproximadamente un 79% superior. Por el contrario, la concentración específica de dipéptido depende, de manera lineal, de la concentración de cisteína.

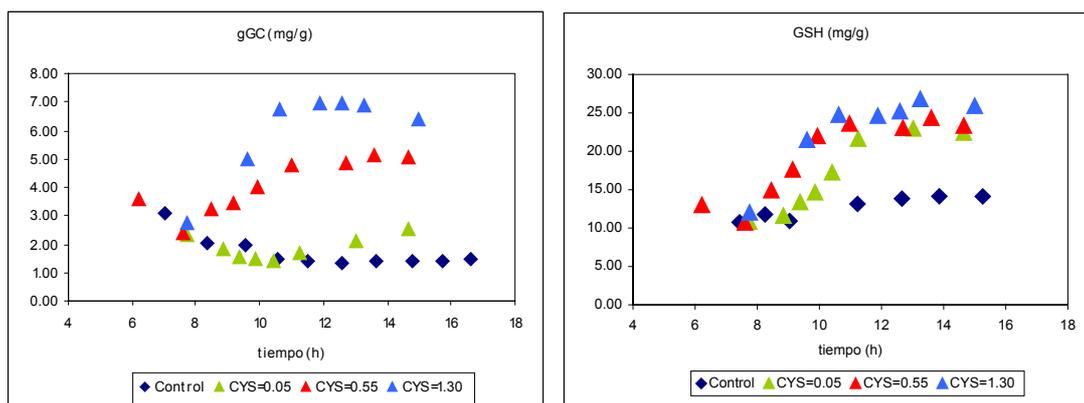


Figura 7.4: Concentración específica de dipéptido (mg/g) y de glutatión (mg/g) cuando se alimenta cisteína de manera continua a las velocidades de 0.05mmol/h (▲), 0.55mmol/h (▲) y 1.30mmol/h (▲), y en comparación al control (◆)

Para comparar el modo de adición en continuo con la adición en forma de pulsos, elegimos la velocidad de alimentación de cisteína en continuo de 1.30mmol/h, puesto que presenta las mayores concentraciones específicas tanto de dipéptido como de glutatión.

2.2. ALIMENTACIÓN DE CISTEÍNA EN PULSOS

Nos planteamos desarrollar dos experimentos en pulsos que nos permitan comparar el efecto del modo de adición de cisteína sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Vamos a añadir, a partir de la mitad de la fase exponencial, la misma cantidad de cisteína del modo de operación en continuo pero en un solo pulso y en una serie de pulsos espaciados en el tiempo.

Al utilizar una velocidad de alimentación de 1.30mmol/h (velocidad elegida para realizar la comparativa), se llegan a adicionar al medio de cultivo 6.35mmol de cisteína a lo largo del experimento. Las estrategias a seguir son:

- ① Añadir en un solo pulso 6.35mmol de cisteína, lo que supone una concentración inicial de cisteína en el reactor de 4.2mM.
- ② Añadir siete pulsos de cisteína con un intervalo de tiempo de 45 minutos entre pulsos, aportando cada uno la cantidad de 0.907mmol de cisteína. Si asumimos que este tiempo es suficiente para que la cisteína añadida se consuma, esto originaría, tras cada pulso, una concentración de cisteína en el medio de 0.605mM.

A partir de los resultados del apartado anterior, estaríamos en el límite de concentración de cisteína que provocaría inhibición en el crecimiento.

En la figura 7.5 comparamos el efecto del modo de adición de cisteína en continuo frente al modo en pulsos, con respecto a la síntesis de biomasa, consumo de sacarosa y síntesis/consumo de etanol.

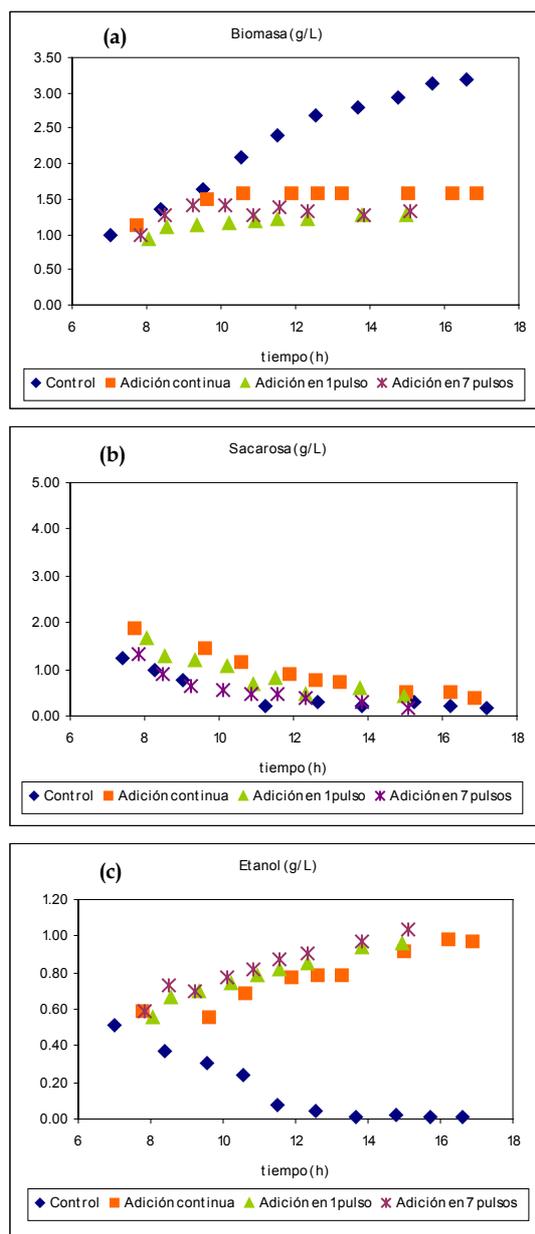


Figura 7.5: Efecto de la alimentación continua de cisteína (■), en un solo pulso (▲) o en una serie de pulsos (✱) sobre la síntesis de biomasa (a), consumo de sacarosa (b) y síntesis/consumo de etanol (c). También se representa el experimento control (◆)

No se observan cambios ni en el consumo de sacarosa, ni en la evolución de etanol entre los distintos modos de adición de cisteína. En la figura 7.5 (a) parece que el modo de adición en continuo provoca menos inhibición en el crecimiento, pero las diferencias son muy pequeñas. La alimentación de cisteína, tanto en continuo como en pulsos, comparada con el control, provoca inhibición en la biomasa y formación de etanol en lugar de consumo.

Sin embargo, si representamos la evolución de dipéptido, glutatión, consumo de oxígeno y producción de CO_2 , sí se pueden apreciar diferencias entre los modos de adición (figura 7.6).

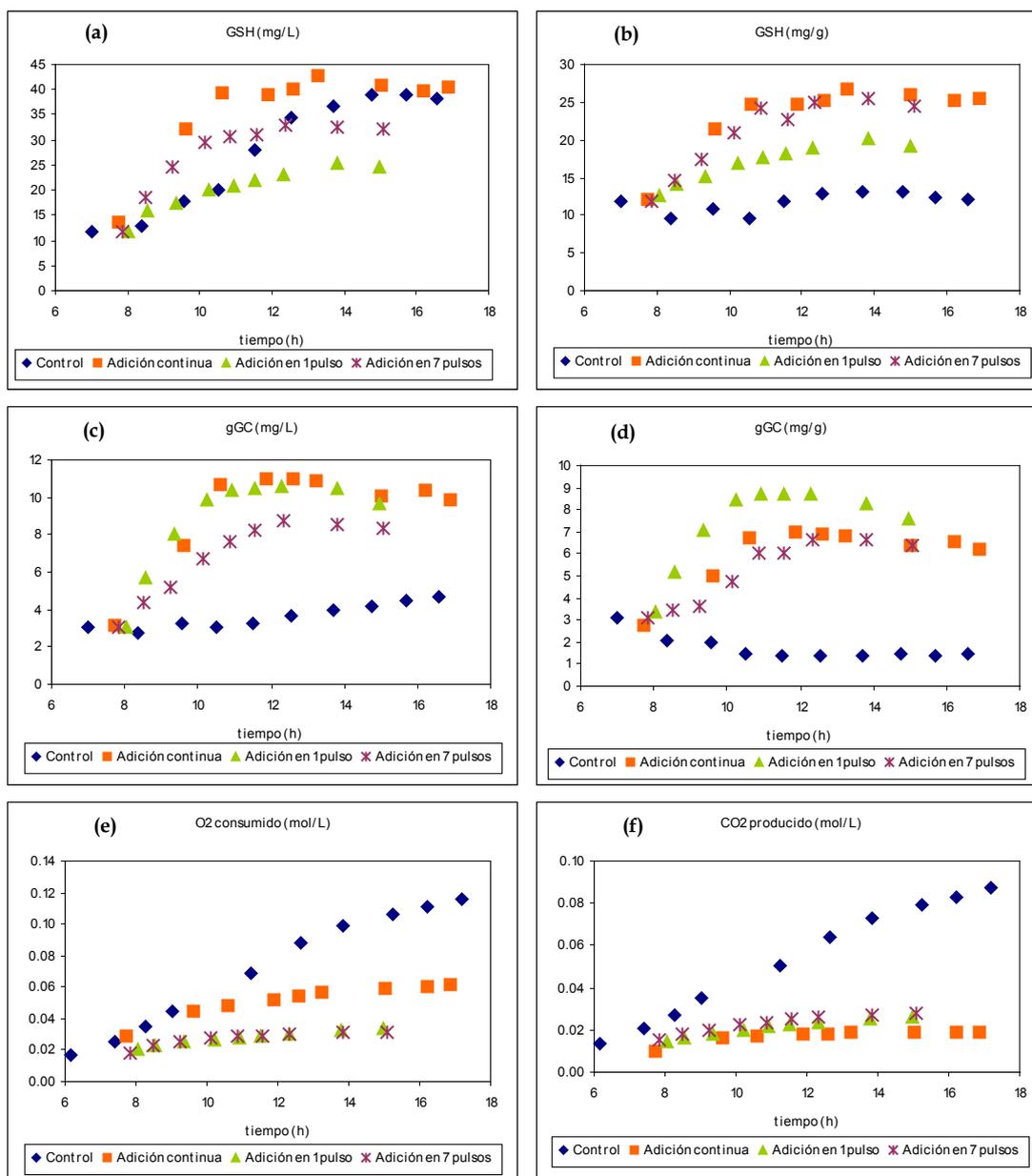


Figura 7.6: Perfiles representativos de la concentración total de GSH (a), específica de GSH (b), total de gGC (c) y específica de gGC (d); consumo de O₂ (e) y producción de CO₂ (f) con tres modos de adición de cisteína: ■ Adición continua de cisteína a una velocidad de 1.30mmol/h, ▲ Adición de 6.35mmol de cisteína en un solo pulso, y ✱ Adición de 6.35mmol de cisteína en 7 pulsos, en comparación al control ◆

Se puede decir de la figura 7.6 que las concentraciones específicas de dipéptido y glutatión coinciden cuando se añade cisteína de forma continua y cuando se añade la misma cantidad en siete pulsos, pero la concentración total de ambos metabolitos es mayor en el modo continuo ya que la inhibición en el crecimiento es algo menor. Cuando la adición se realiza en un solo pulso ocurre que se obtiene una mayor concentración específica de dipéptido y una concentración específica de GSH menor en comparación a los otros dos modos de adición. Esto se puede deber a que la mayor concentración de cisteína que se consigue en un sólo instante con este modo de operación esté provocando una inhibición en el segundo enzima de síntesis de GSH, y que por eso se acumule más dipéptido y menos GSH. Los distintos modos de alimentación provocan inhibición en la respiración y en la producción de CO₂; en 7.6 (e) se observa que en el modo de operación en continuo la disminución en el consumo de oxígeno con respecto al control es menor que cuando se utiliza el modo de operación en pulsos.

Podemos concluir que la adición continua de cisteína permite alcanzar el mayor valor de concentración específica de glutatión en comparación a cuando la adición se realiza en un solo pulso, y la mayor concentración total de glutatión en comparación a la adición de cisteína en una serie de pulsos. Con el modo de operación en continuo nos aseguramos que nunca haya limitación del aminoácido que corresponda. Estas razones nos llevan a elegir el modo de operación en continuo para posteriores análisis como son el efecto del glutamato, de la glicina y de combinaciones de los tres aminoácidos, sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32.

3. EFECTO DE LA PRESENCIA DE CISTEÍNA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

Para estudiar el efecto de la adición de cisteína en el metabolismo de síntesis de glutatión, se han llevado a cabo cinco experimentos en los que se alimenta cisteína al biorreactor, a la mitad de la fase exponencial, con velocidades de: 0.05, 0.55, 1.30, 2.50 y 3.50 mmol/h.

Con los valores de cisteína añadida y cisteína residual en cada una de las muestras tomadas, podremos conocer la cisteína consumida por las células. Los valores se muestran en la tabla 7.2.

Velocidad alimentación de cisteína (mmol/h)	Cisteína añadida (mmol)	Cisteína consumida (mmol)
0.05	0.25	0.00
0.55	2.71	0.76
1.30	6.73	1.70
2.50	14.58	8.02
3.50	20.55	13.66

Tabla 7.2: Concentraciones de cisteína añadidas y consumidas en el estado estacionario para diferentes velocidades de alimentación del aminoácido

No toda la cantidad de cisteína añadida se consume, pero a mayor cantidad de cisteína añadida aumenta la proporción de cisteína que se consume (tabla 7.2). Así, la velocidad específica de consumo de cisteína aumenta con la velocidad de alimentación, figura 7.7.

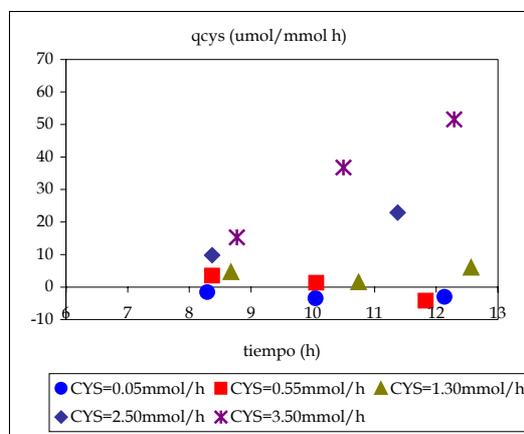


Figura 7.7: Velocidad de consumo de cisteína con el tiempo para diferentes velocidades de alimentación del aminoácido

En la figura 7.8 se ve que para velocidades de alimentación de cisteína menores a 3.50mmol/h, no se modifica la velocidad a la que la levadura consume la sacarosa procedente del medio de cultivo. Así la evolución en el consumo de sacarosa es muy similar en todos los casos. Sin embargo, cuando se alimenta cisteína a 3.50mmol/h no se produce consumo de sacarosa desde el momento de la adición.

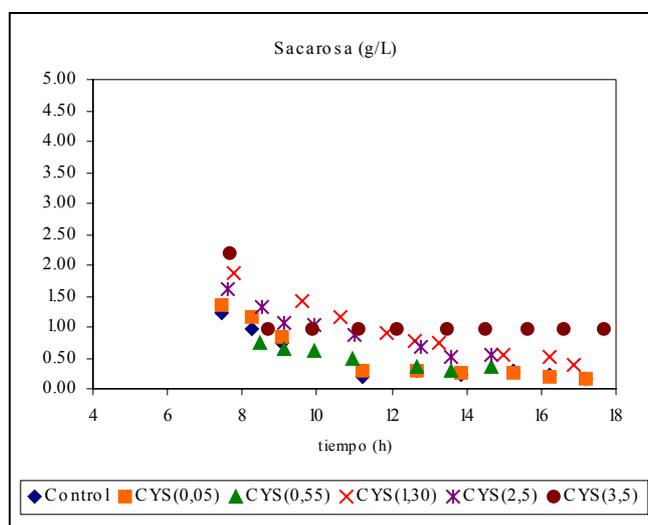


Figura 7.8: Consumo de sacarosa con el tiempo para experimentos con velocidades de alimentación de cisteína de 0.05, 0.55, 1.30, 2.50 y 3.50mmol/h, y para el experimento control

La síntesis de biomasa se ve altamente modificada por la velocidad de alimentación de cisteína como se aprecia en la figura 7.9. La cisteína provoca inhibición del crecimiento y a mayor velocidad de alimentación mayor es dicha inhibición. Sólo cuando la velocidad de alimentación es baja, la biomasa sigue prácticamente la misma evolución que en el caso en que no se produce dicha adición (control). Se constata también de la figura 7.9 que los valores de biomasa para los experimentos con alimentación de cisteína a 2.50 y 3.50mmol/h son los mismos, y que además este valor coincide con la concentración de biomasa existente en el biorreactor justo antes de empezar la adición.

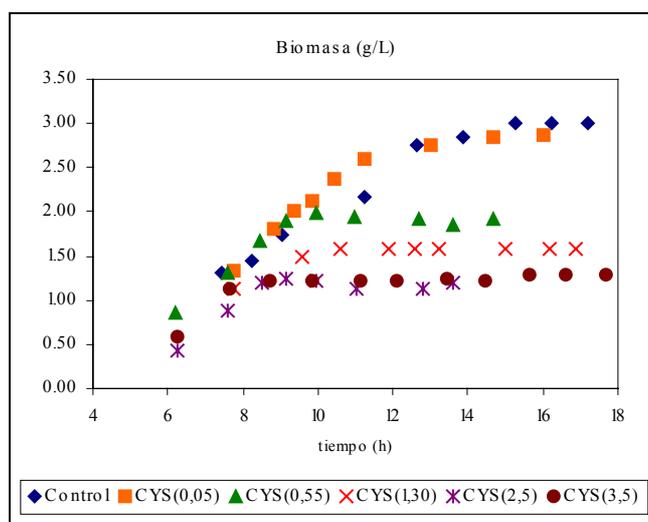


Figura 7.9: Síntesis de biomasa para experimentos con velocidades de alimentación de cisteína de 0.05, 0.55, 1.30, 2.50 y 3.50mmol/h y para el experimento control

En el control, sobre las ocho horas de cultivo, la levadura comienza a consumir el etanol presente en el medio y el consumo total tiene lugar sobre las 13-14 horas. La medida de etanol del medio extracelular, figura 7.10, revela distintos comportamientos del metabolismo en función de la velocidad de alimentación de aminoácido. Si la velocidad es baja, el consumo de etanol sigue el mismo ritmo que en el control. En los experimentos con caudal de cisteína igual o mayor a 0.55mmol/h se observa inhibición en el consumo de etanol, con lo cual el valor acumulado o bien se mantiene en el mismo que tenía antes de la adición (como es el caso de velocidad de adición de cisteína de 0.55mmol/h) o bien empieza a aumentar (para velocidades mayores). Los resultados obtenidos indican que a mayor velocidad de alimentación se produce más etanol. Sin embargo, a la mayor velocidad estudiada ocurre que no se sintetiza etanol ni se consume; la concentración se mantiene constante.

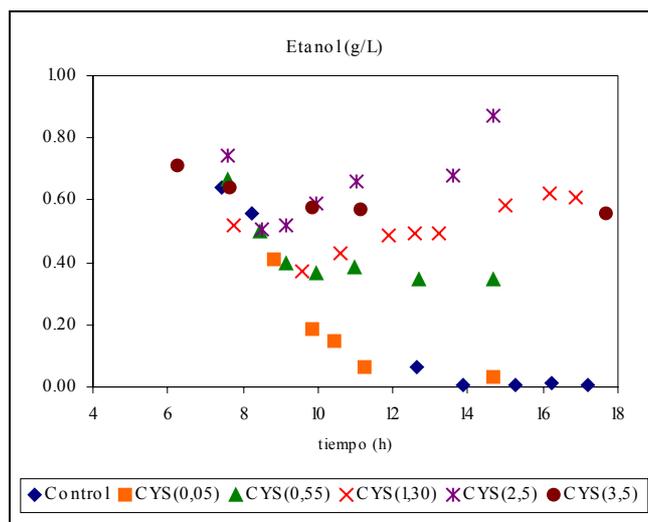


Figura 7.10: Evolución del etanol con el tiempo para experimentos con velocidades de alimentación de cisteína de 0.05, 0.55, 1.30, 2.50 y 3.50mmol/h, y para el experimento control

Durante el proceso de fermentación se analizan de manera continua los gases a la salida y entrada del biorreactor. Esto permite conocer en todo momento la cantidad de oxígeno consumida y la de dióxido de carbono producida (figura 7.11).

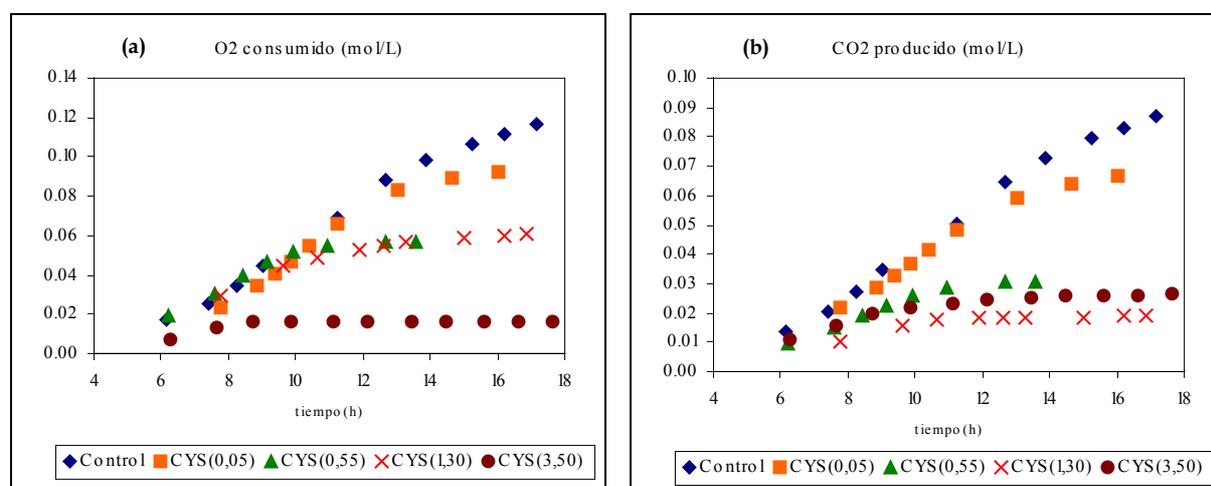


Figura 11: (a) Consumo de oxígeno y (b) síntesis de CO₂ para experimentos con velocidades de alimentación de cisteína de 0.05, 0.55, 1.30 y 3.50mmol/h y para el experimento control

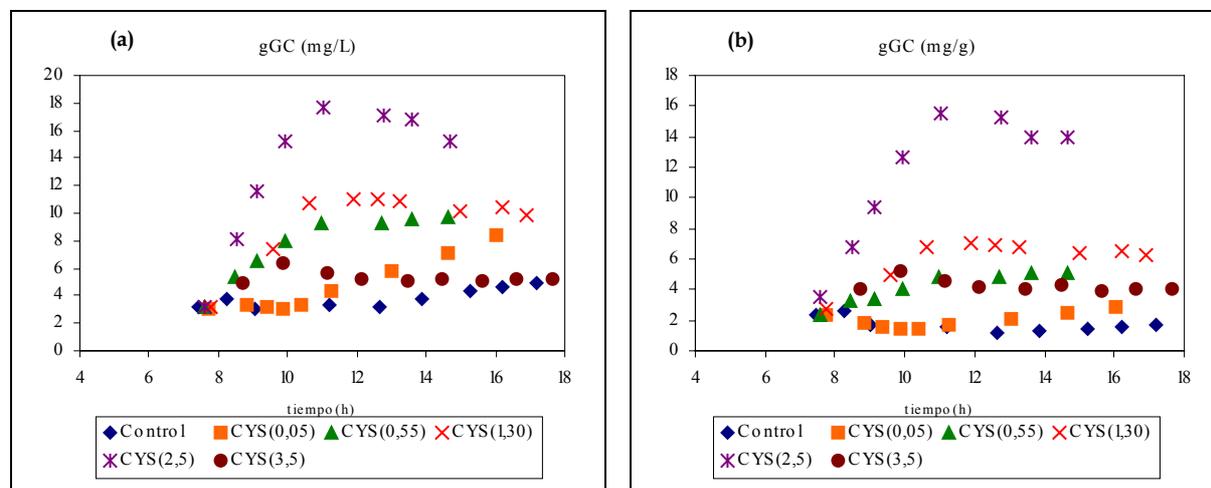
La cisteína afecta a la respiración (figura 7.11), de modo que a mayor velocidad de alimentación del aminoácido el oxígeno consumido será menor y el CO₂ producido también. Cuando el crecimiento de la célula es aerobio, la glucólisis se dirige hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, donde los equivalentes reductores generados son transferidos a la cadena respiratoria generando ATP. Si la cisteína provoca menor consumo de oxígeno, quiere decir que el flujo que se dirige hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos será menor. Si existe consumo de la fuente de carbono, éste va hacia otras rutas, como por ejemplo la de generación de etanol; este fenómeno es el que tiene lugar para velocidades de alimentación de cisteína superiores a 0.05mmol/h (figura 7.10). Además se observa una disminución en la síntesis de biomasa que puede estar relacionada con el menor consumo de carbono en el ciclo de Krebs (figura 7.9).

Taherzadeh (1999) describe que los requerimientos de energía cuando el crecimiento es anaerobio fuerzan a la célula a obtener ATP a partir de glucosa por la glucólisis. Sin embargo, el metabolismo anaerobio no puede detenerse en el piruvato. El NAD⁺ se debe regenerar del NADH producido en la glucólisis. Si esto no ocurre así la glucólisis (y la formación de ATP) no tendrían lugar. Para resolver este problema la levadura produce etanol (Nissen et al., 2000).

Hay autores que han descrito que la cisteína produce inhibición en el consumo de etanol y éste se acumula en el medio. Alfafara et al. (1992b) expresan que la ausencia de crecimiento en la fase de consumo de etanol indica que la cisteína puede inhibir la asimilación de etanol.

Como conclusión se puede decir que la cisteína tiene un efecto negativo en el metabolismo celular, inhibiendo el consumo de sustratos (etanol, oxígeno) y la producción de metabolitos (biomasa, dióxido de carbono).

En la figura 7.12 se muestran los valores experimentales obtenidos para la concentración de dipéptido intracelular en todos los casos de estudio.



Cuando la velocidad de adición de cisteína es baja, el dipéptido sigue la misma evolución que cuando no se produce adición. Si empieza a aumentar la velocidad de adición de aminoácido, el dipéptido también empieza a aumentar su velocidad de acumulación y lo hace desde el momento en que se añade cisteína al medio. Para valores elevados de velocidad de adición, a partir de las once horas de fermentación ya no aumenta la concentración específica de dipéptido. Sin embargo para la

mayor velocidad de alimentación (3.50mmol/h) en lugar de aumentar la concentración específica de gGC con respecto al valor de velocidad inmediatamente inferior, se produce un descenso hasta un valor parecido al obtenido con una velocidad de alimentación de 0.55mmol/h. Es decir, la síntesis de dipéptido pasa por un máximo en función del flujo de cisteína consumido.

Para velocidades de alimentación iguales o superiores a 0.55mmol/h se detiene la síntesis de gGC a tiempos por encima de las once horas. Cuando la velocidad de alimentación de cisteína es de 0.05 mmol/h se observa una ligera síntesis de dipéptido a partir de este tiempo (figura 7.12). Se podría considerar que en este punto existe un control homeostático; es decir, si la concentración de dipéptido en el momento en que se produce falta de nutrientes es superior a un valor crítico no se producirá mayor síntesis, pero si el valor acumulado en ese punto es inferior al crítico, tendrá lugar una activación de su metabolismo de síntesis.

En la figura 7.13 (a) se ve que la adición de cisteína al medio de cultivo tiene un efecto significativo sobre la concentración específica de GSH; ésta aumenta desde unos 14mg/g (control) hasta unos 25mg/g en el rango de velocidades entre 0.05 y 2.50mmol/h, siendo la velocidad de acumulación de glutatión prácticamente la misma en todos los casos. Sin embargo, la velocidad más elevada de alimentación de cisteína presenta una diferencia con respecto al comportamiento del resto de velocidades; la concentración específica de GSH es de sólo 17mg/g. Por tanto, se concluye que también la síntesis de glutatión pasa por un máximo en función del flujo de cisteína empleado.

Anteriormente se pudo ver, figura 7.9, que a mayor velocidad de alimentación de cisteína menor es la síntesis de biomasa. Así como la concentración específica de GSH es prácticamente la misma para los casos de suministro de cisteína comprendidos entre 0.55 y 2.50mmol/h, figura 7.13 (b), no ocurre lo mismo para la concentración total, figura 7.13 (a); cuanto mayor es la velocidad de alimentación de aminoácido, menor será la concentración total de GSH puesto que hay menos síntesis celular, pudiendo llegar incluso a ser menor al caso en que no se produce adición, aún cuando la concentración específica sea mayor (como se observa para 2.50 y 3.50mmol/h).

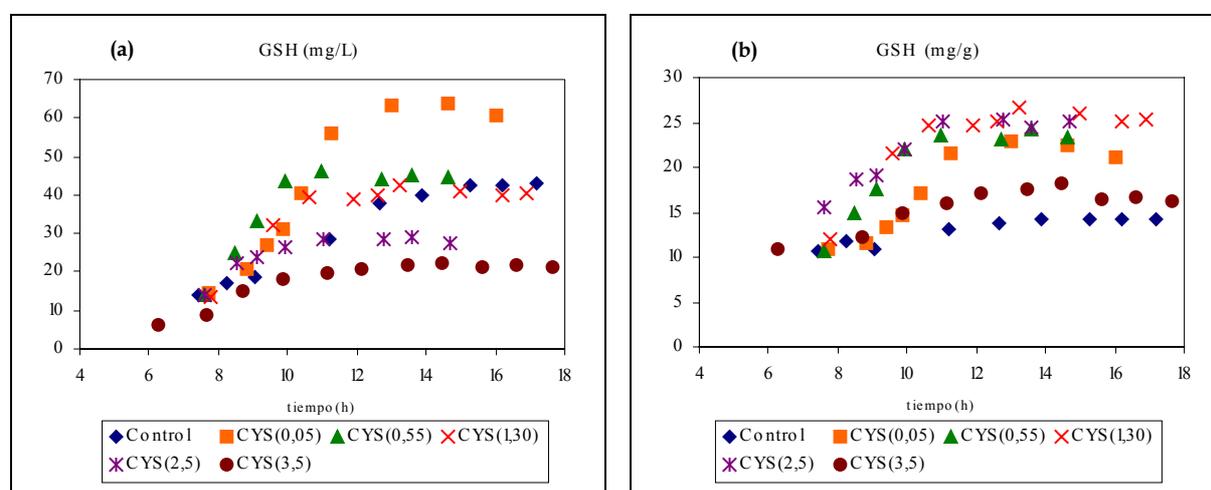


Figura 7.13: Síntesis de glutatión expresado como (a) mg/L y (b) mg/g para experimentos con velocidades de alimentación de cisteína de 0.05, 0.55, 1.30, 2.50 y 3.50mmol/h y para el experimento control

Se ha descrito que el glutatión es un reductor esencial durante el proceso metabólico normal de las levaduras y que es necesario para un crecimiento celular normal (Grant et al., 1996). Para conocer directamente la influencia de la cisteína en la síntesis de GSH hay que referirse a las figuras 7.12 y 7.13, en las cuales se muestra la evolución en las concentraciones intracelulares de gGC y de GSH respectivamente. Como ya se ha mencionado, la evolución de ambos metabolitos es dependiente de la alimentación de cisteína. Así cuando la velocidad de alimentación es baja y no se observa

inhibición en el consumo de etanol, en el consumo de oxígeno, ni en la síntesis de biomasa, el comportamiento del dipéptido es también muy parecido al control, aunque la concentración de GSH se asemeja a la obtenida a velocidades mayores. Cuando la velocidad de adición de aminoácido es mayor, el dipéptido se empieza a acumular y posteriormente permanece estable. La concentración específica de GSH cuando la velocidad de alimentación es igual o inferior a 2.50mmol/h, es muy similar en todo el rango de velocidades y está muy por encima de los valores del control, aproximadamente un 79% superior. La evolución que sigue la concentración de GSH se asemeja a la descrita para el dipéptido; se sintetiza y después se mantiene estable. Sin embargo cuando se emplea una velocidad de alimentación de cisteína de 3.50mmol/h, las concentraciones específicas tanto de dipéptido como de GSH son menores y más parecidas en su valor al control, aunque la evolución sigue siendo semejante a la mencionada anteriormente.

La adición de cisteína al medio de cultivo tiene una serie de efectos sobre el metabolismo de crecimiento celular, que se resumen en menor síntesis de biomasa, menor consumo de etanol, inhibición en el proceso respiratorio, menor producción de dióxido de carbono y mayor acumulación intracelular tanto de GSH como de gGC. Los metabolitos objeto de estudio dependen directamente de la velocidad de adición de cisteína y, por tanto, de la velocidad de consumo.

3.1. EVOLUCIÓN DEL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE CISTEÍNA

La alimentación de cisteína al biorreactor se realiza sobre las ocho horas de cultivo y en la mayoría de los casos es a partir de las trece horas cuando no aumenta la concentración de glutatión. Por tanto, se elige realizar el análisis de aminoácidos antes de la adición, y a tres tiempos intermedios después de la alimentación cercanos a las 9, 11 y 13 horas. De esta manera podemos conocer la influencia de la alimentación de cisteína sobre el metabolismo del resto de aminoácidos y relacionar este fenómeno con lo que ocurre en el metabolismo de síntesis de GSH. Dividimos los aminoácidos en dos grupos: en el primero (figura 7.14) representamos los que aumentan su concentración (que son: serina, histidina y cisteína) y en el segundo grupo (figura 7.15) representamos los aminoácidos que se consumen.

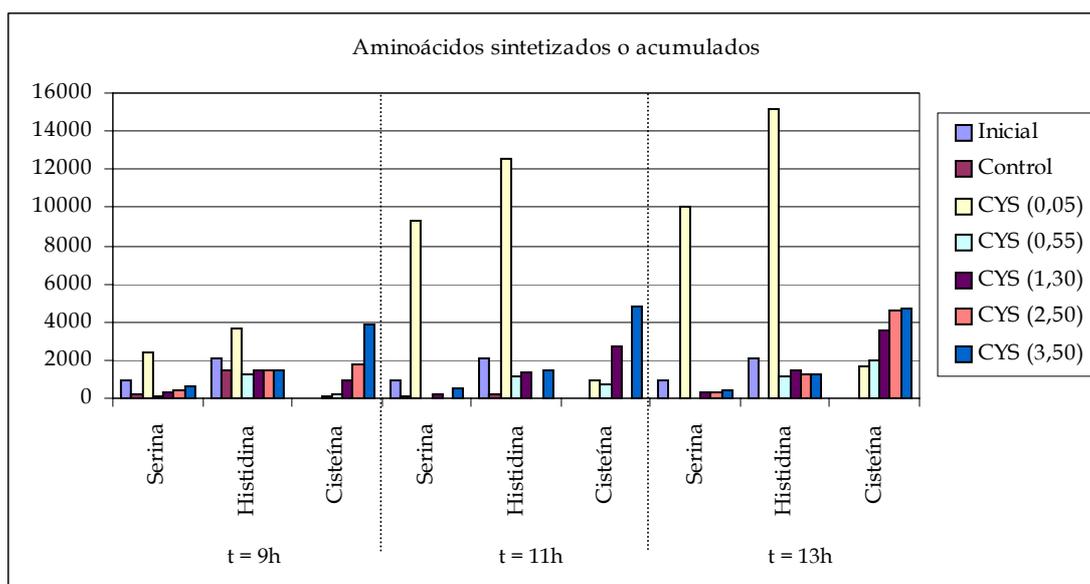


Figura 7.14: Concentración μM de aminoácidos libres extracelulares (serina, histidina y cisteína) a tres tiempos de cultivo para distintas velocidades de alimentación de cisteína

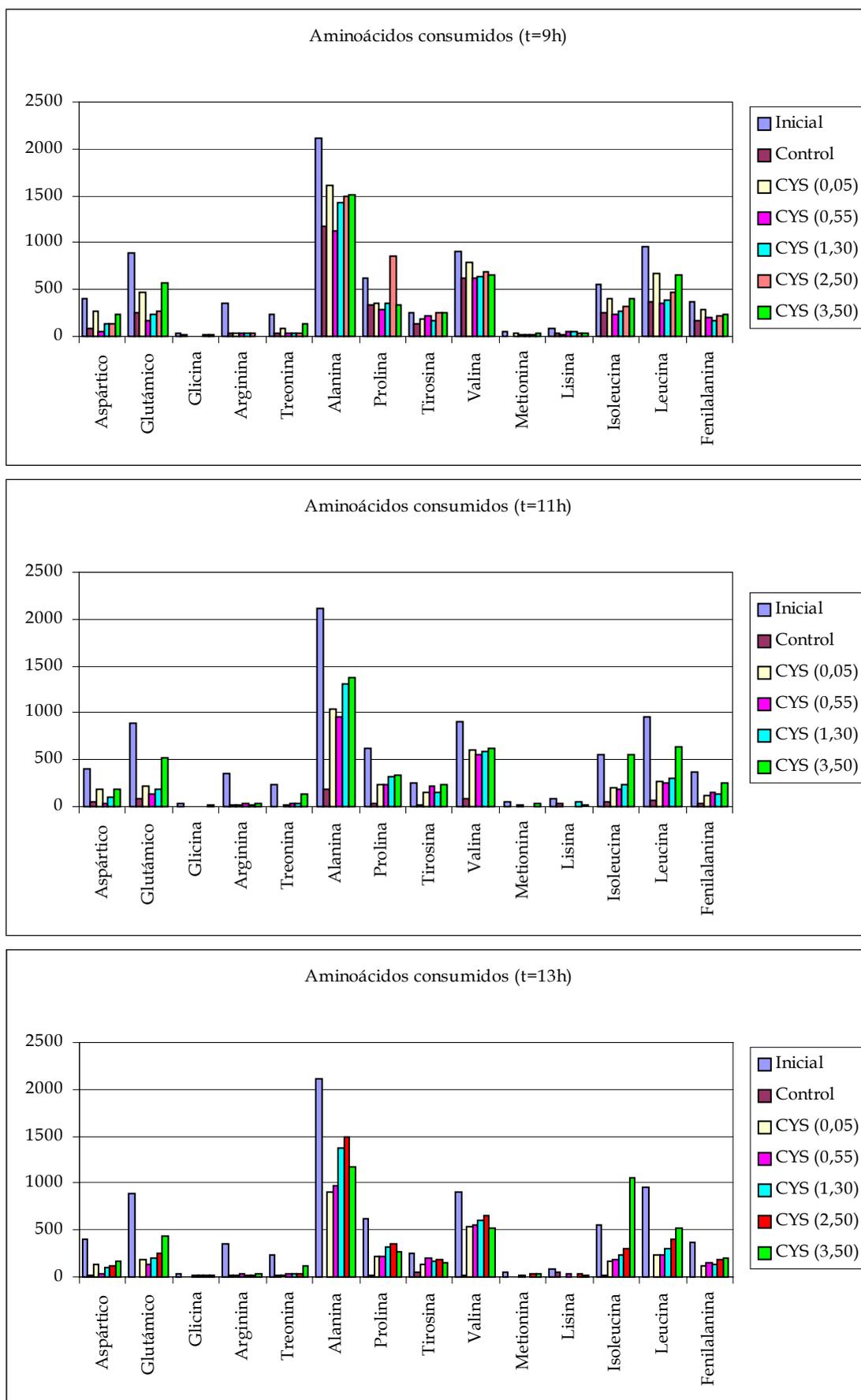


Figura 7.15: Concentración μM de aminoácidos libres extracelulares para distintas velocidades de alimentación de cisteína

De las figuras 7.14 y 7.15 se puede concluir:

- En la gran mayoría de los casos (exceptuando la histidina y serina cuando $CYS=0.05\text{mmol/h}$ y la concentración de isoleucina cuando $CYS=3.50\text{mmol/h}$) se produce un consumo de aminoácidos que es menor que en el control
- La velocidad más baja de alimentación de cisteína provoca síntesis tanto de serina como de histidina
- La concentración extracelular de cisteína aumenta puesto que no se consume todo lo que se añade y se acumula más cisteína en el medio de cultivo cuanto mayor es la velocidad de alimentación de dicho aminoácido

4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLUTAMATO EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

El estudio de la influencia del glutamato en la síntesis de glutatión se realiza añadiendo glutamato a tres velocidades: 2.73, 5.00 y 7.00mmol/h a la mitad de la fase exponencial. A partir de los valores de glutamato añadido y de glutamato residual, podemos calcular el glutamato consumido y por tanto, la velocidad específica de consumo de glutamato (q_{glu}). En la figura 7.16 se muestra la evolución de la velocidad específica de consumo de glutamato para las distintas velocidades de alimentación del aminoácido. Se observa que a mayor velocidad de alimentación de glutamato mayor es también la velocidad de consumo. Sin embargo, la velocidad de consumo disminuye con el tiempo.

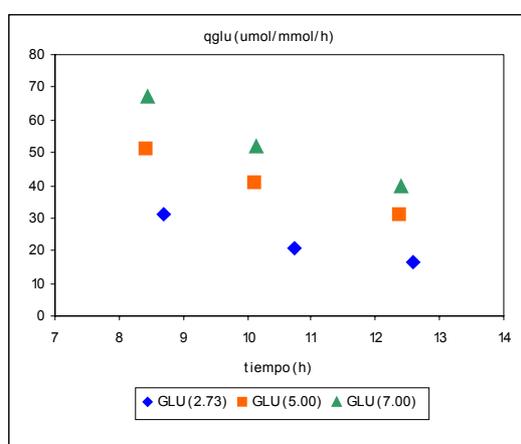


Figura 7.16: Velocidad de consumo de glutamato para diferentes velocidades de alimentación del aminoácido

Para las distintas velocidades de alimentación de glutamato estudiadas, ocurre que todo el glutamato añadido se consume (tabla 7.3).

Velocidad alimentación de glutamato (mmol/h)	Glutamato añadido (mmol)	Glutamato consumido (mmol)
2.73	14.50	14.50
5.00	29.65	29.65
7.00	41.37	41.37

Tabla 7.3: Concentraciones de glutamato añadidas y consumidas en el estado estacionario para diferentes velocidades de alimentación del aminoácido

La concentración de sacarosa y etanol siguen el mismo comportamiento que el experimento control, independientemente de la velocidad de alimentación (figura 7.17). Sin embargo, la biomasa aumenta ligeramente con la velocidad de adición de glutamato y esto se puede deber a que el glutamato puede actuar en el cultivo como fuente de nitrógeno. La acción del enzima NAD-glutamato deshidrogenasa transforma el glutamato en α -oxoglutarato con liberación de amonio (Magasanik y Kaiser, 2002). Podría ser que la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo genere mayor síntesis de biomasa.

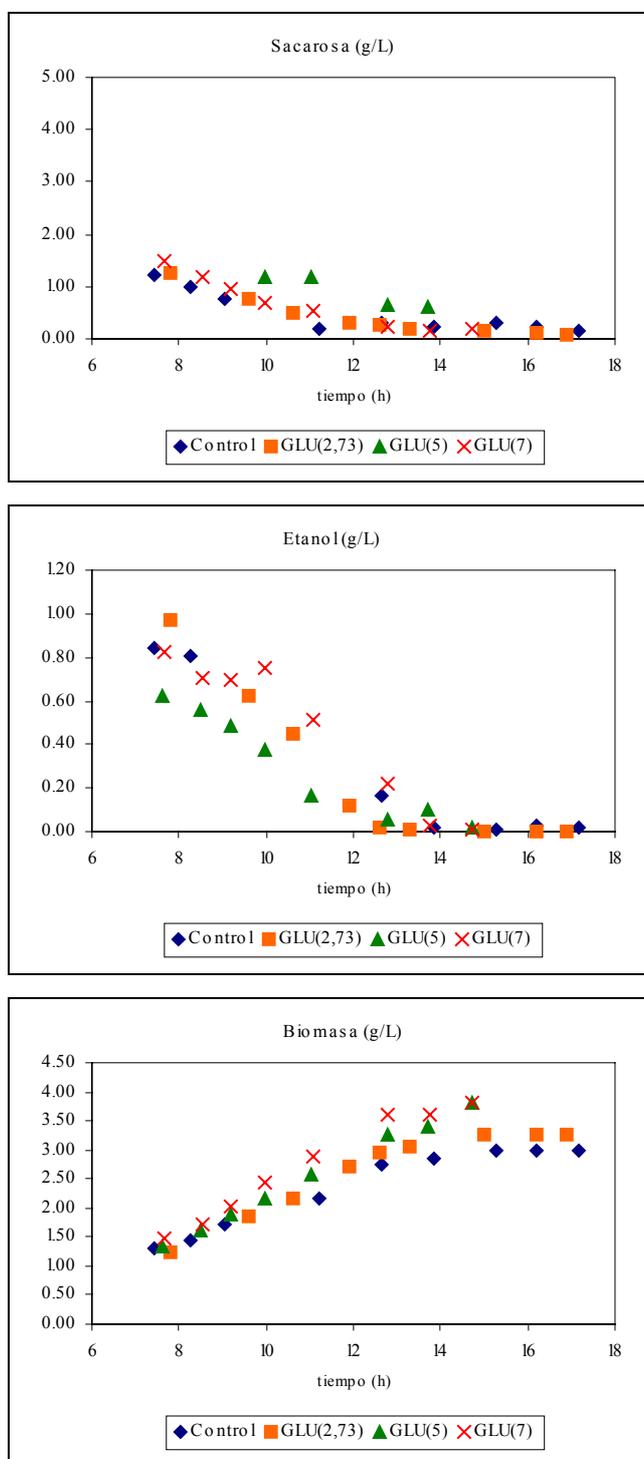


Figura 7.17: Consumo de sacarosa y de etanol y generación de biomasa para experimentos con velocidades de alimentación de glutamato de 2.73, 5.00 y 7.00mmol/h, y para el experimento control

Según el comportamiento metabólico de la levadura en presencia de glutamato y descrito hasta el momento (sacarosa, etanol y biomasa), sería de esperar que no hubiesen grandes diferencias ni el consumo de oxígeno ni en la producción de dióxido de carbono; esto se aprecia que es así en la figura 7.18.

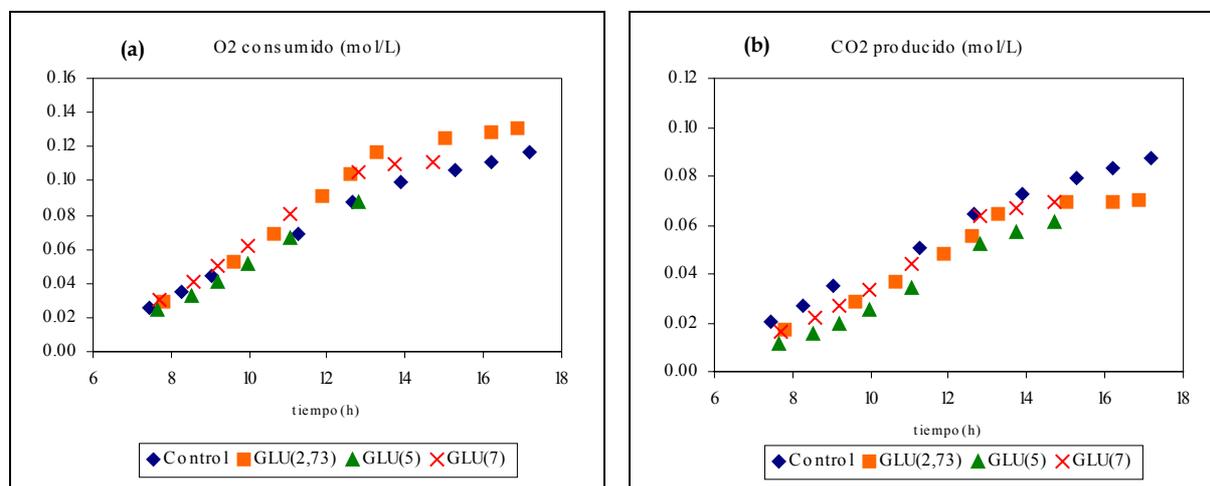
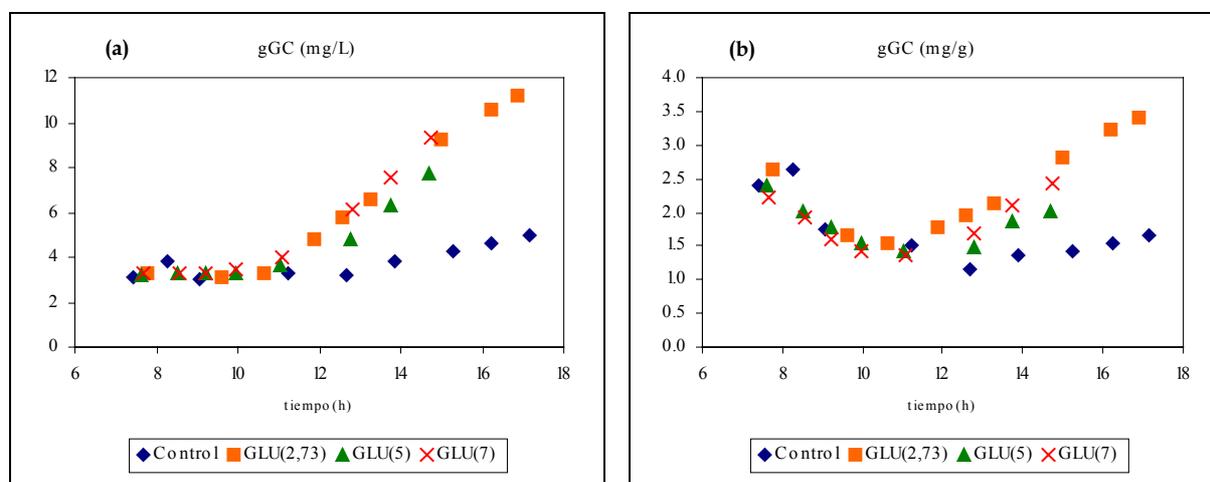


Figura 7.18: (a) Consumo de oxígeno y (b) síntesis de CO₂ para experimentos con velocidades de alimentación de glutamato de 2.73, 5.00 y 7.00 mmol/h, y para el experimento control

De la figura 7.19 se constata que el comportamiento del dipéptido en los diversos experimentos con alimentación de glutamato es el mismo para todos ellos; la concentración no varía a tiempos de cultivo inferiores a once horas, pero empieza a acumularse a partir de este tiempo. La concentración es mayor en los experimentos con adición de glutamato con respecto al control, y entre ellos es la misma independientemente de la velocidad de alimentación. Sin embargo, la concentración de GSH no sufre variaciones con respecto al control.



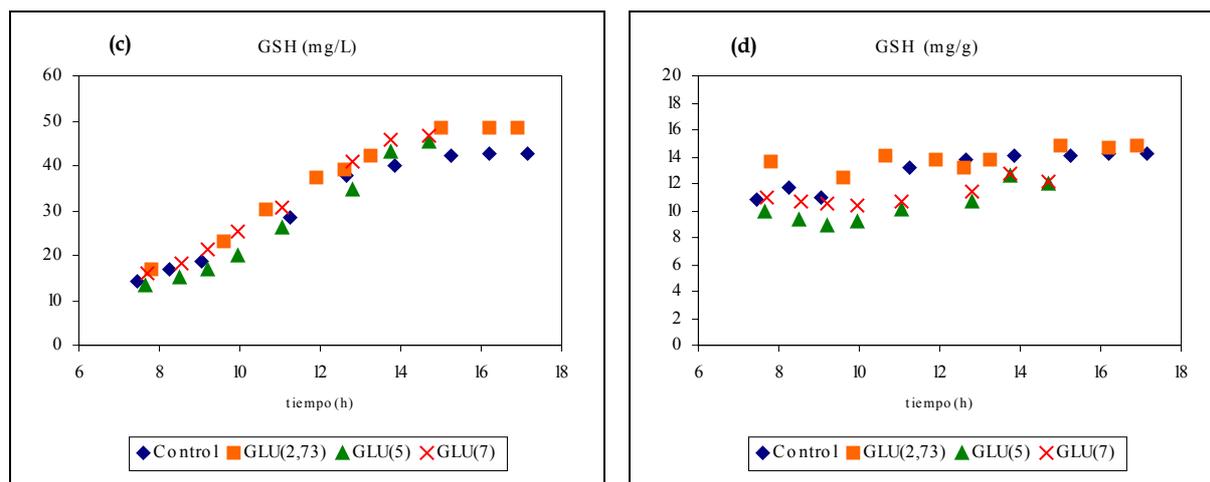


Figura 7.19: Concentración de dipéptido expresada como (a) mg/L y (b) mg/g biomasa y concentración de glutatión expresada como (c) mg/L y (d) mg/g biomasa, para experimentos con velocidades de alimentación de glutamato de 2.73, 5.00 y 7.00 mmol/h, y para el experimento control

4.1. EVOLUCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE GLUTAMATO

Vamos a analizar si la alimentación de glutamato afecta en algo al metabolismo general de los aminoácidos. En las figuras 7.20 y 7.21 se representan la concentración de aminoácidos extracelulares para las distintas velocidades de alimentación de glutamato en función del tiempo de la muestra. Dividimos los aminoácidos en dos grupos: en el primero representamos los que se pueden sintetizar o acumular (concentración mayor a la concentración inicial), que en este caso sólo es la serina, y en el segundo grupo representamos el resto de aminoácidos, que son los que se consumen (concentración menor a la concentración inicial).

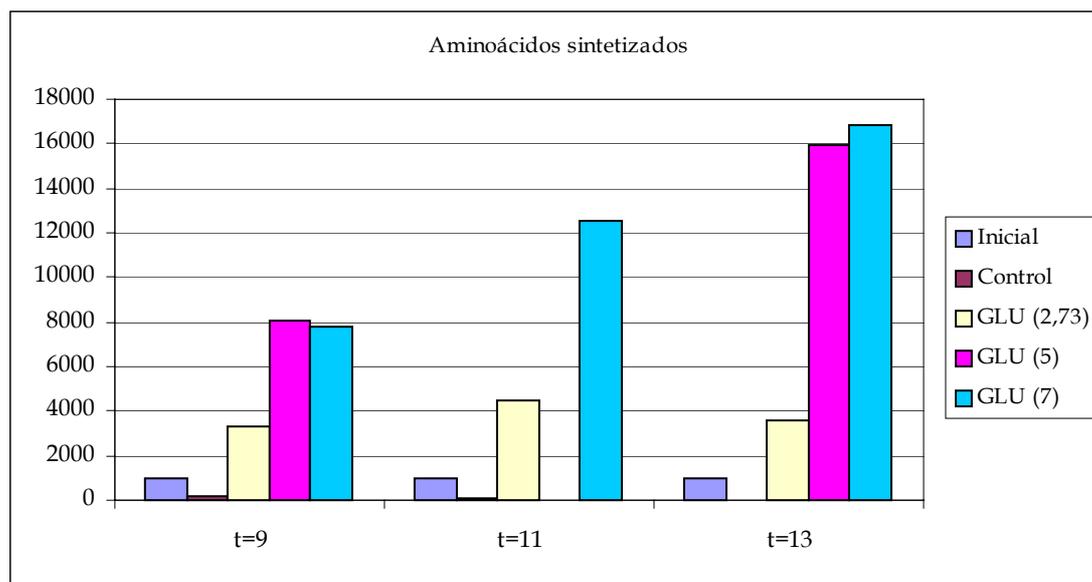


Figura 7.20: Concentración μM de serina libre extracelular a tres tiempos de cultivo para distintas velocidades de alimentación de glutamato

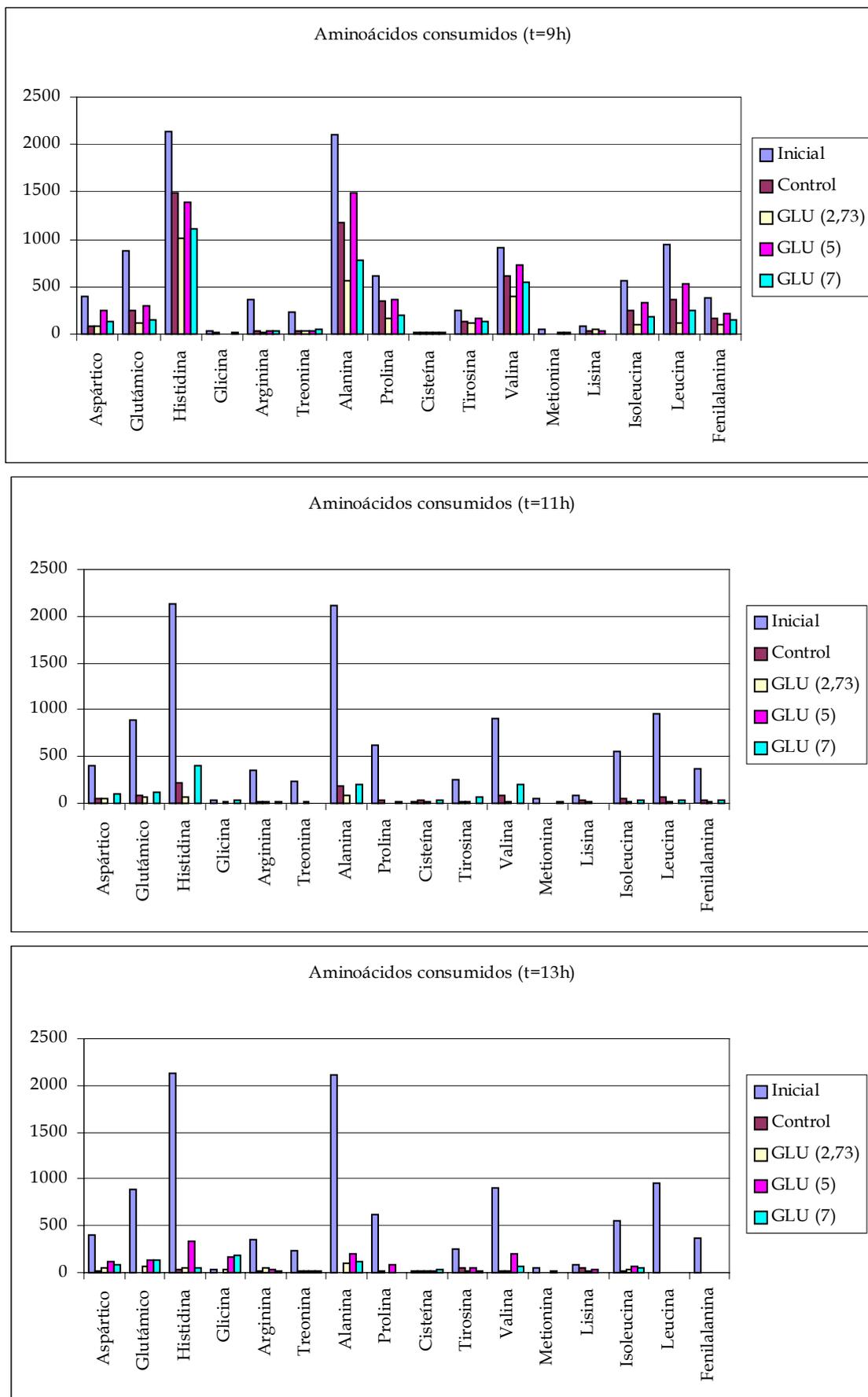


Figura 7.21: Concentración μM de aminoácidos libres extracelulares para distintas velocidades de alimentación de glutamato

Con la adición de glutamato al medio de cultivo la evolución del metabolismo de casi todos los aminoácidos sigue el mismo comportamiento que en el control; se van consumiendo y cuando ya se ha agotado el etanol del medio también tiende a agotarse la presencia de aminoácidos. La serina es el único aminoácido que sigue un comportamiento distinto al control. Conforme avanza el tiempo de cultivo se va sintetizando más serina y la síntesis es dependiente de la velocidad de alimentación de glutamato (a mayor velocidad mayor síntesis).

5. EFECTO DE LA PRESENCIA DE GLICINA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

La adición de glicina se realiza de manera continua al medio de cultivo en la mitad de la fase exponencial, a tres velocidades de alimentación: 0.55, 3.00 y 10.00 mmol/h. Los resultados obtenidos se compararán con el control (sin adición) para poder determinar si la glicina ejerce algún cambio sobre la síntesis de GSH y sobre el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* MT-32.

En los estudios con cisteína y glutamato se ha visto que existía una relación proporcional entre la velocidad de alimentación del aminoácido y la velocidad de consumo del mismo. Estudiaremos si esto se cumple cuando alimentamos glicina; para ello calculamos las velocidades específicas de consumo de glicina a partir de los valores de glicina residual (concentración en el medio extracelular). Los resultados se muestran en la figura 7.22.

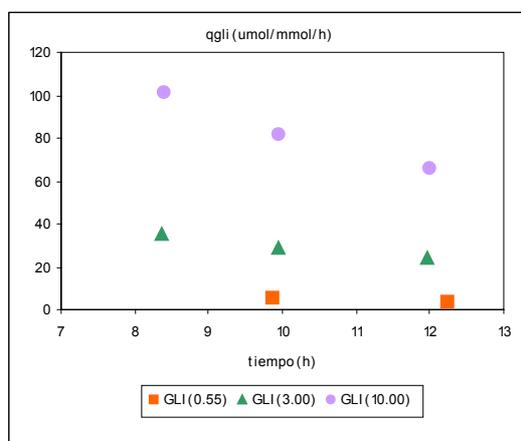


Figura 7.22: Velocidad de consumo de glicina para diferentes velocidades de alimentación del aminoácido

Se cumple también una relación proporcional entre la velocidad de alimentación de glicina y la velocidad de consumo por parte de la célula. Además toda la glicina alimentada se consume (tabla 7.4).

Velocidad alimentación de glicina (mmol/h)	Glicina añadida (mmol)	Glicina consumida (mmol)
0.55	3.65	3.65
3.00	16.23	16.23
10.00	54.30	54.30

Tabla 7.4: Concentraciones de glicina añadidas y consumidas en el estado estacionario para diferentes velocidades de alimentación del aminoácido

La adición de glicina, figura 7.23, no ejerce ningún cambio en las concentraciones de sacarosa, etanol y biomasa con respecto al control. Además el consumo de sacarosa y etanol y la formación de biomasa son independientes de la velocidad de alimentación de glicina. El consumo de oxígeno y producción de CO₂ tampoco presentan diferencias en comparación al control (datos no mostrados).

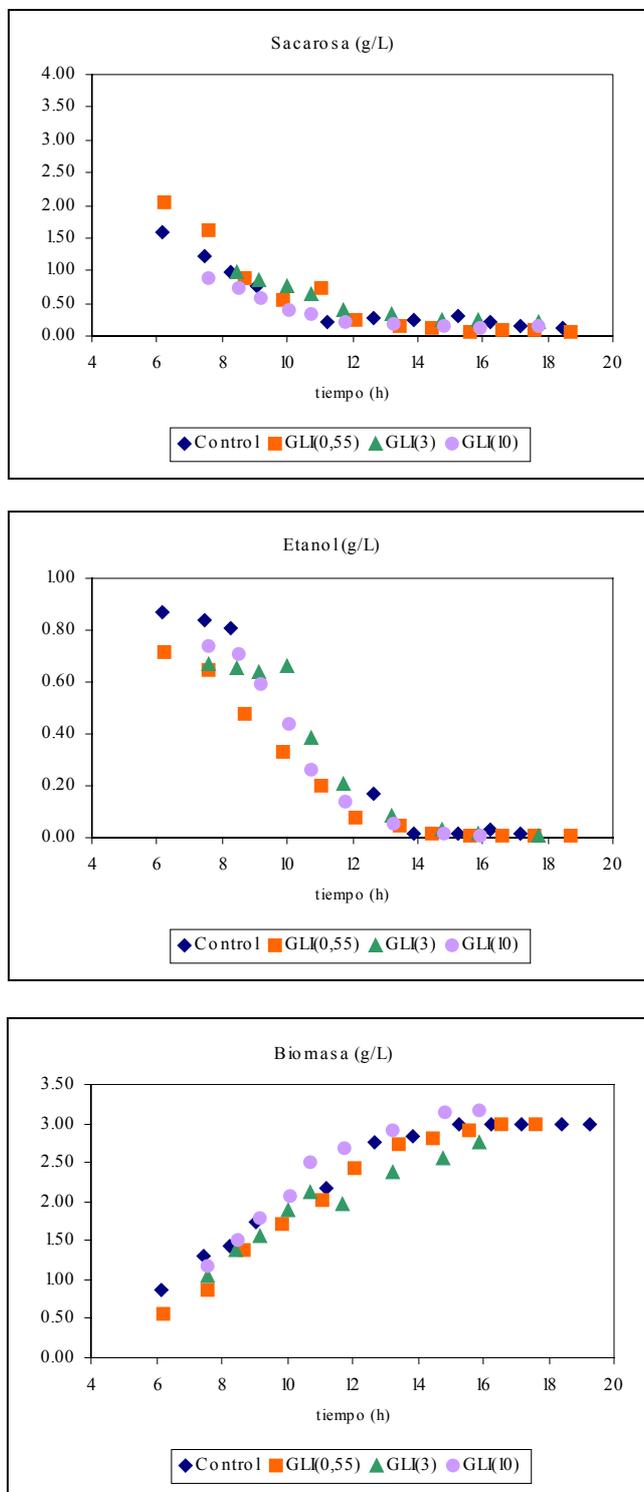


Figura 7.23: Consumo de sacarosa, consumo de etanol y generación de biomasa para experimentos con velocidades de alimentación de glicina de 0.55, 3.00 y 10.00mmol/h, y para el experimento control

Tal y como se aprecia en la figura 7.24 el dipéptido sigue el mismo comportamiento que el control; se consume hasta las 12-13 horas de cultivo y después empieza a acumularse. Sin embargo se observa que la glicina, a las velocidades de adición estudiadas, ejerce un efecto significativo sobre el metabolismo del GSH. Desde el momento en que se adiciona glicina al biorreactor y hasta que termina el consumo de etanol (sobre las trece horas) se observa una bajada en las concentraciones de GSH (figura 7.24). Cuanto mayor es la velocidad de alimentación de glicina, la velocidad de degradación de GSH es más elevada; el glutatión empieza a sintetizarse una vez que se han consumido todos los nutrientes.

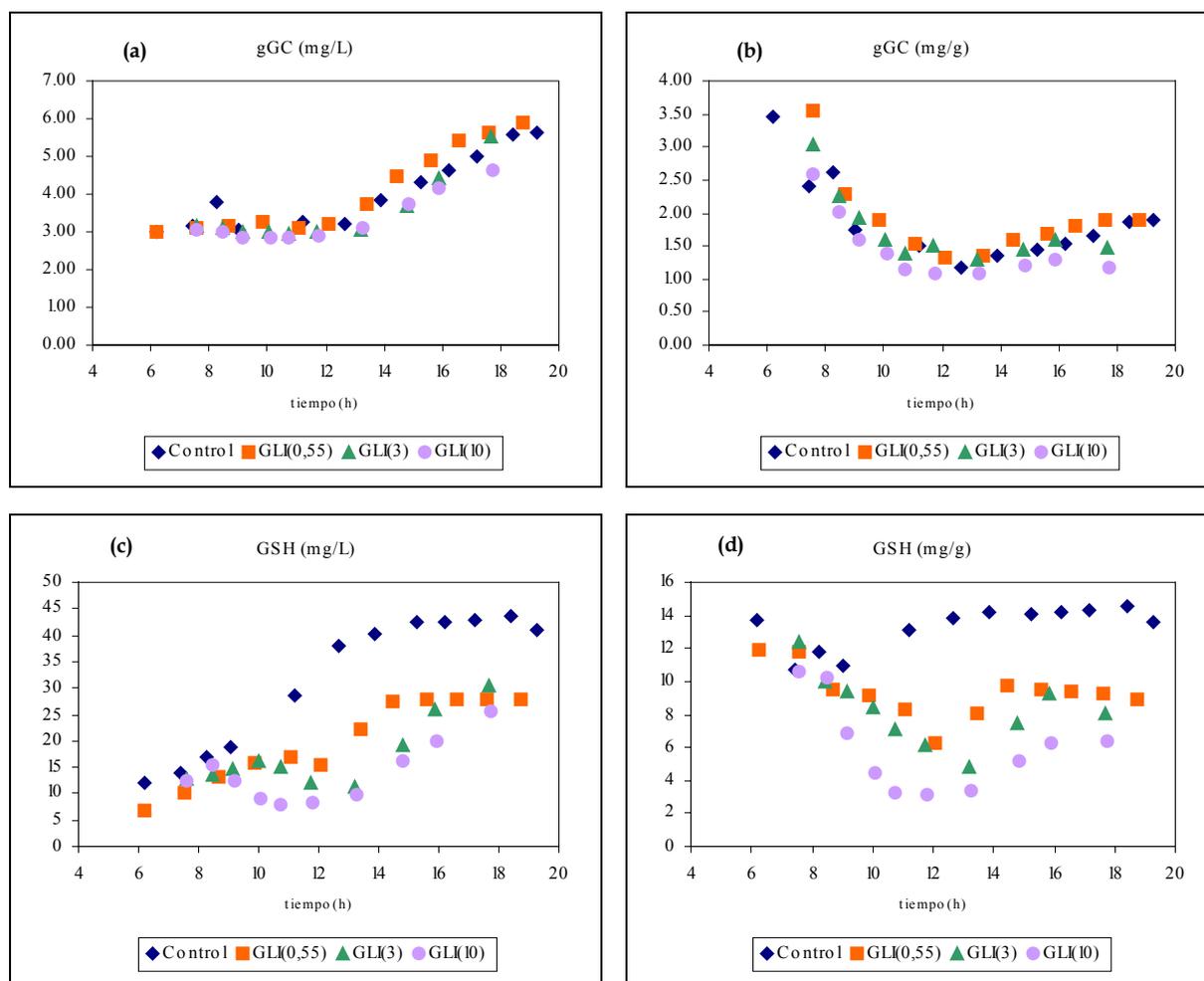


Figura 7.24: Concentración de dipéptido expresada como (a) mg/L y (b) mg/g biomasa y concentración de glutatión expresada como (c) mg/L y (d) mg/g biomasa, para experimentos con velocidades de alimentación de glicina de 0.55, 3.00 y 10.00mmol/h, y para el experimento control

5.1. EVOLUCIÓN DE AMINOÁCIDOS CON LA ADICIÓN DE GLICINA

Vamos a analizar la concentración de aminoácidos en el medio extracelular y los resultados, para tiempos diferentes, los separaremos según se consuma o se sintetice el aminoácido.

En la figura 7.25 se muestra la evolución con el tiempo de la histidina, que es el único aminoácido que se sintetiza con el tiempo en los cultivos alimentados con glicina, y en la figura 7.26 se muestra la evolución con el tiempo del resto de aminoácidos, cuya concentración va disminuyendo.

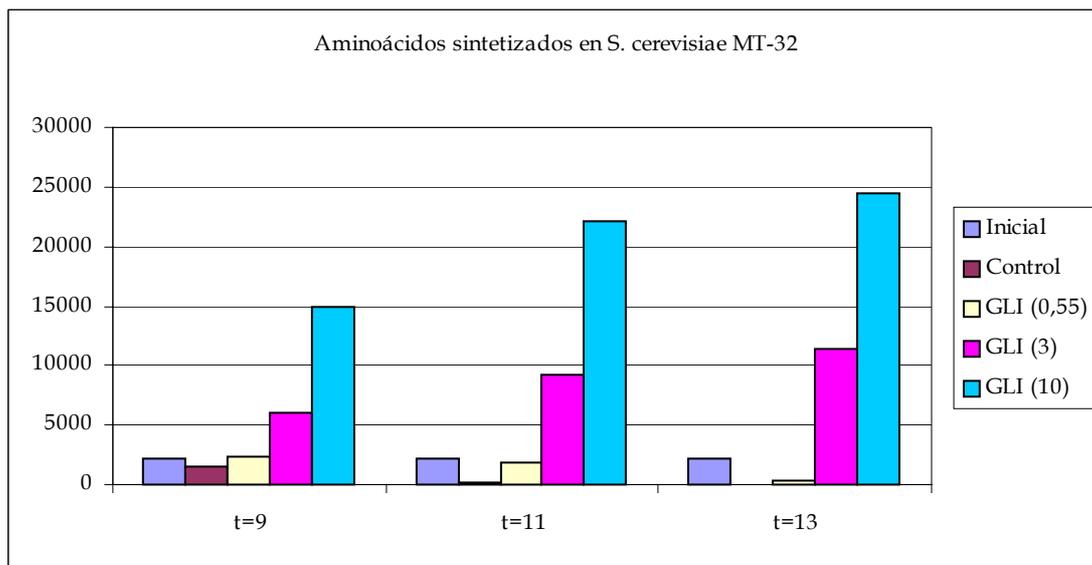
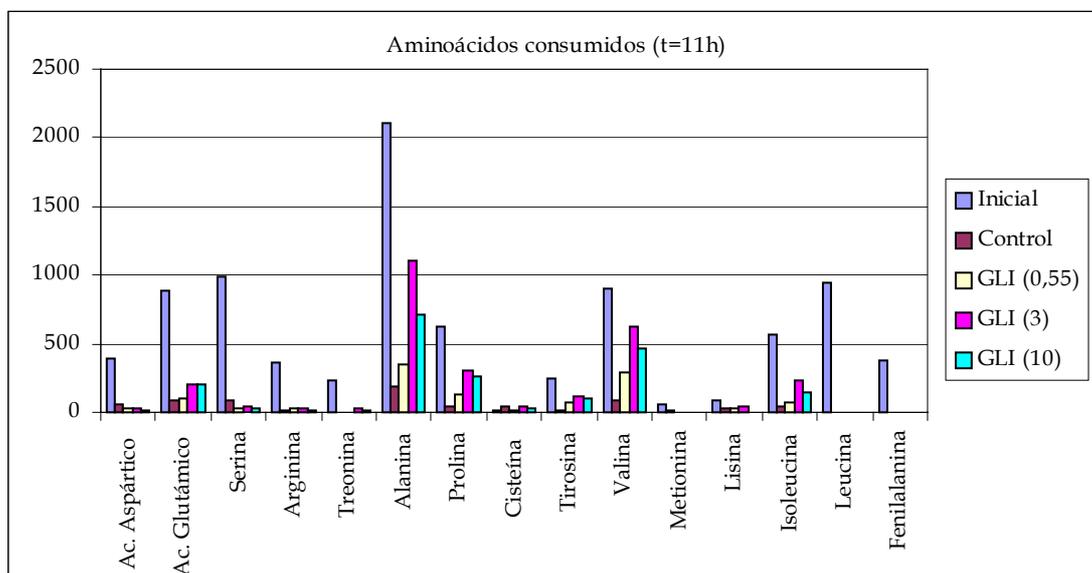
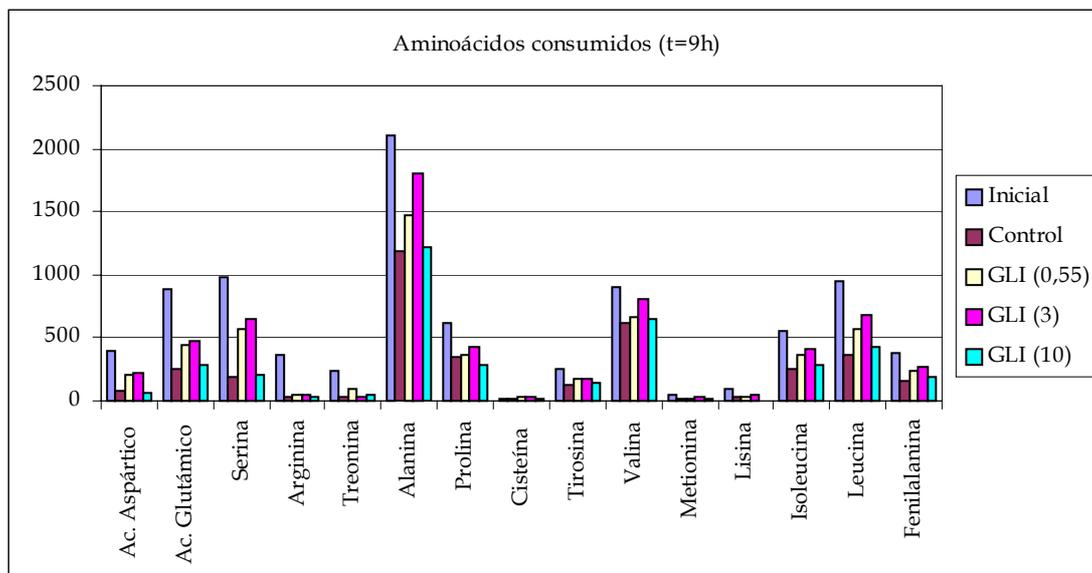


Figura 7.25: Concentración μM de histidina libre extracelular a tres tiempos de cultivo para distintas velocidades de alimentación de glicina



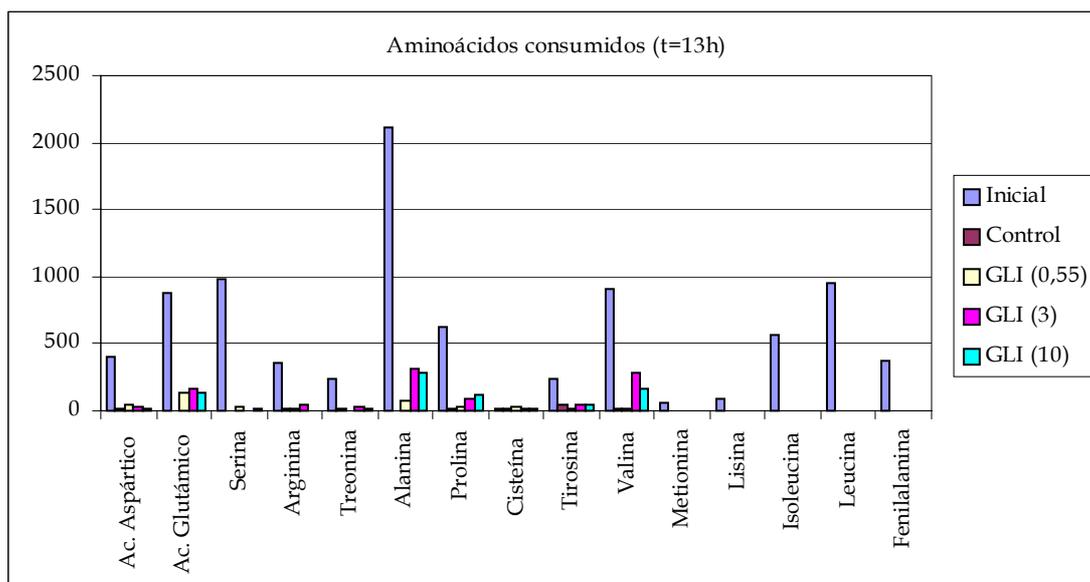


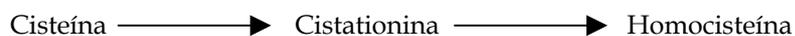
Figura 7.26: Concentración μM de aminoácidos libres extracelulares para distintas velocidades de alimentación de glicina

De las figuras 7.25 y 7.26 podemos concluir que la alimentación de glicina al medio de cultivo modifica sobre todo el metabolismo de la histidina. La cantidad de histidina sintetizada depende del consumo de glicina, a mayor consumo de glicina mayor síntesis de histidina. Cuando la velocidad de consumo de glicina es baja la histidina no se produce sino que se está consumiendo aunque a menor velocidad que en el control.

Con los resultados obtenidos, expresados en las figuras 7.24 y 7.26, podemos decir que la adición de glicina da lugar a un flujo mayor hacia síntesis de histidina con respecto a la síntesis de glutatión cuando no existe limitación de nutrientes; se observa incremento en la concentración de histidina y degradación de GSH. Sin embargo, cuando los nutrientes comienzan a ser limitantes se produce un cambio en el metabolismo; deja de producirse histidina y se incrementa la producción de GSH. Esto nos demuestra la relación existente entre la síntesis de GSH con el nivel de nutrientes presentes en el medio. Una relación parecida la dan Wessner et al. (2003); concluyen que la adición de glicina incrementa los niveles de GSH cuando hay limitación de glutamina, y que causa una disminución del contenido de GSH en condiciones óptimas de alimentación de glutamina.

Existen diversos estudios que le atribuyen una capacidad antioxidante a la histidina. En levaduras la histidina puede actuar como un antioxidante fisiológico (Murakami et al., 1997). De nuestros experimentos concluimos que un consumo mayor de glicina con respecto a las condiciones fisiológicas puede que favorezca una mayor síntesis de histidina como antioxidante en lugar de sintetizar glutatión. Con estos resultados nos planteamos una pregunta, de qué manera o través de qué rutas están relacionadas la alimentación de glicina y la síntesis de histidina y glutatión.

Según Gelling et al. (2004) después de adicionar glicina a un medio de cultivo se produce una rápida inducción de genes involucrados en el metabolismo de un carbono y en la biosíntesis de purinas (ver apéndice B). Según esto, se puede concluir que la adición de glicina favorece tanto la formación de metionina como la formación de AMP. Para que tenga lugar síntesis de metionina se debe consumir homocisteína. La homocisteína procede de la siguiente ruta:



La adición de glicina puede estimular la activación de una serie de rutas que favorecen la síntesis de metionina y, por tanto, el consumo de cisteína. Este consumo de cisteína disminuye la cantidad de cisteína disponible para sintetizar GSH. Puede ser por eso que la célula llega incluso a degradar GSH como fuente de cisteína.

Chan y Appling (2003) observaron hiperacumulación de S-adenosilmetionina (SAM o AdoMet) cuando las células crecían en presencia de glicina; luego podemos decir que la metionina se consumirá en generación de AdoMet según las rutas mostradas en el apéndice C. Es decir, la glicina favorece la formación tanto de AdoMet como de AMP.

Para que se pueda formar AMP tiene que haber consumo de su primer precursor, ribulosa-5-fosfato o PRPP (ver figura del apéndice B) y por tanto una mayor síntesis de PRPP. Si ocurriera que parte del PRPP producido se consumiera en la ruta de síntesis de histidina, según la figura del apéndice D, se podrían explicar los elevados niveles de histidina obtenidos tras la adición de glicina al medio de cultivo.

6. INTERPRETACIÓN DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DE CISTEÍNA, GLUTAMATO Y GLICINA EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

El análisis realizado en los apartados 3, 4 y 5 de este capítulo indica que existen diferencias en la producción de glutatión y de dipéptido en función del aminoácido constituyente alimentado. Sin embargo, no queda claro cómo la célula distribuye los aminoácidos consumidos y regula los flujos internos hacia la síntesis de glutatión. Es interesante estudiar estos flujos con el fin de determinar cuál sería la estrategia óptima de control que nos daría una concentración de glutatión y dipéptido elevada si se llevara a cabo con células que tengan una concentración específica de glutatión elevada, lo cual facilitaría su separación.

El análisis de flujos metabólicos ha sido utilizado ampliamente para obtener información acerca de las rutas metabólicas. Las vías del metabolismo de síntesis de glutatión y posibles reacciones secundarias utilizadas en nuestro análisis, se esquematizan en la figura 7.27, donde

CYS_{int}:	Cisteína intracelular
CYS_{ot}:	Cisteína que se dirige a otras rutas (metionina, homocisteína, ...)
GLU_{int}:	Glutamato intracelular
GLU_{ot}:	Glutamato que se dirige a otras rutas (α -oxoglutarato, glutamina, aminoácidos, ...)
GLY_{int}:	Glicina intracelular
GLY_{ot}:	Glicina que se dirige a otras rutas (serina, ...)
gGC:	Gamma-glutamilcisteína
GSH:	Glutatión

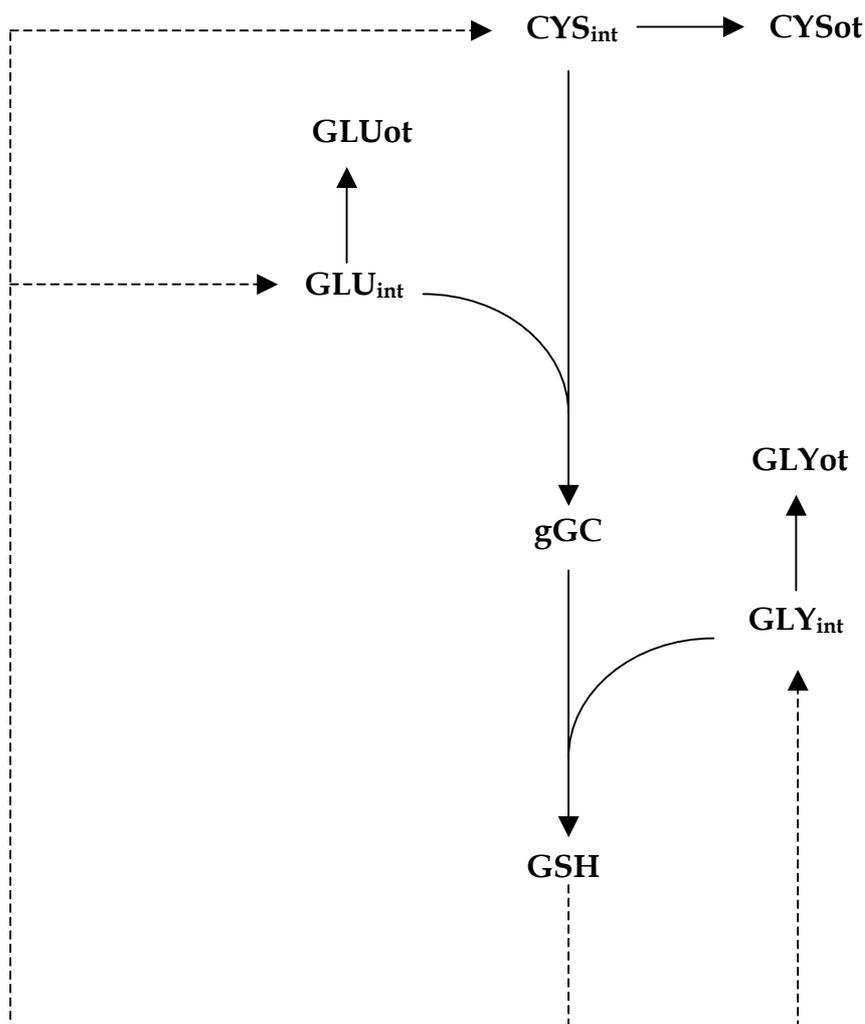


Figura 7.27: Reacciones implicadas en el metabolismo del glutatión (\longrightarrow síntesis; $-\longrightarrow$ degradación)

Asumimos que los aminoácidos intracelulares están en equilibrio con los extracelulares, por lo que las concentraciones en el interior y exterior de la célula serán las mismas.

Las reacciones que resumen el proceso global del metabolismo del glutatión son las siguientes:

- $r_1:$ $CYS_{int} \rightarrow CYS_{ot}$
- $r_2:$ $CYS_{int} + GLU_{int} \rightarrow gGC$
- $r_3:$ $GLU_{int} \rightarrow GLU_{ot}$
- $r_4:$ $gGC + GLY_{int} \rightarrow GSH$
- $r_5:$ $GLY_{int} \rightarrow GLY_{ot}$
- $r_6:$ $GSH \rightarrow CYS_{int} + GLU_{int} + GLY_{int}$

Las velocidades específicas de cada uno de los metabolitos están relacionadas a través de la estequiometría de las reacciones. Estas relaciones se pueden escribir en forma matricial siguiendo el principio de conservación de especies según la ecuación:

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{r}$$

donde \mathbf{S} es la matriz estequiométrica ($m \times n$), \mathbf{v} es el vector de flujos de las reacciones ($m \times 1$) y \mathbf{r} es el vector de velocidades de conversión de cada componente ($n \times 1$). La resolución de este sistema da lugar a un conjunto de relaciones entre velocidades de conversión que nos permitirán estimar los flujos intracelulares:

$$\mathbf{v} = \mathbf{S}^{-1} \cdot \mathbf{r}$$

donde \mathbf{S}^{-1} es la inversa de \mathbf{S} . La matriz tiene rango 5 por lo que hay una ecuación que es linealmente dependiente. Tomamos como reacción dependiente r_6 , que corresponde a la velocidad de degradación del glutatión y cuyo valor lo estimamos con una serie de suposiciones. Se toman como velocidades independientes las velocidades de conversión r_{CYSint} , r_{GLUint} , r_{GLYint} , r_{gGC} y r_{GSH} . Así las velocidades de reacción se podrán determinar a partir de las velocidades de conversión de la siguiente manera:

$$r_1 = r_6 - r_2 - r_{CYSint}$$

$$r_2 = r_4 + r_{gGC}$$

$$r_3 = r_6 - r_2 - r_{GLUint}$$

$$r_4 = r_6 + r_{GSH}$$

$$r_5 = r_6 - r_4 - r_{GLYint}$$

Además

$$r_1 = r_{CYSot}$$

$$r_3 = r_{GLUot}$$

$$r_5 = r_{GLYot}$$

La célula debe tener unos valores mínimos para los flujos de producción dipéptido y GSH (r_2 y r_4 respectivamente) puesto que el glutatión es un metabolito esencial para el crecimiento de la levadura; suponemos que los flujos de estas reacciones no pueden disminuir por debajo de los obtenidos para el control, es decir los flujos de las reacciones r_2 y r_4 obtenidos para el control los consideramos como los valores mínimos. Cuando alimentamos glicina se observa que la concentración específica de dipéptido alcanzada es la misma que en el control, figura 7.24 (b); no obstante la concentración específica de glutatión es bastante inferior, figura 7.24 (d). Es decir, no disminuye la velocidad de síntesis de glutatión sino que el glutatión generado se degrada. En este caso vamos a considerar que el flujo de formación de GSH se encuentra en el valor mínimo y por tanto r_4 será igual al flujo que se calcule para el control y r_6 será distinto de cero.

Para la adición de cisteína o glutamato se observaba que los valores de concentración específica de dipéptido, figuras 7.12 (b) y 7.19 (b), y glutatión, figuras 7.13 (b) y 7.19 (d), eran iguales o superiores al control. Por lo tanto en estos casos se puede asumir que no tiene lugar degradación de GSH; es decir, consideramos $r_6 = 0$.

Las velocidades de conversión experimentales cuando se adiciona cisteína, glutamato y glicina se plasman en la tabla 7.5.

Velocidad alimentación cisteína (mmol/h)	r_{CYSint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLUint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLYint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{gGC} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GSH} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)
Control	6.40	-176.72	-4.68	0.19	11.77
0.05	242.92	-190.28	-7.51	1.51	47.22
0.55	-160.57	-223.27	-7.82	7.29	30.75
1.30	-158.20	-191.16	-4.65	7.65	29.18
2.50	-414.60	-397.71	-6.03	21.84	21.02
3.50	-1136.02	-104.30	-1.28	2.81	5.44

Velocidad alimentación glutamato (mmol/h)	r_{CYSint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLUint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLYint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{gGC} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GSH} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)
Control	6.40	-176.72	-4.68	0.19	11.77
2.73	0.20	-1996.22	-2.68	0.09	19.96
5.00	3.60	-3705.84	0.62	0.09	18.59
7.00	5.11	-5078.01	3.98	0.09	16.54

Velocidad alimentación glicina (mmol/h)	r_{CYSint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLUint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLYint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{gGC} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GSH} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)
Control	6.40	-176.72	-4.68	0.19	11.77
0.55	2.39	-221.48	-379.34	-0.36	7.99
3.00	2.39	-215.20	-2157.21	-0.27	4.33
10.00	2.39	-214.68	-71.00	-0.30	-10.92

Tabla 7.5: Velocidades específicas experimentales para los diferentes experimentos con adición de cisteína, glutamato y glicina

6.1. DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS

Las velocidades de reacción se obtienen en las unidades de $\mu\text{mol}/(\text{L h})$. En la tabla 7.6 aparecen los flujos calculados para cada uno de los casos en $\mu\text{mol}/(\text{g h})$.

Experimento	r_1 ($\mu\text{mol/g h}$)	r_2 ($\mu\text{mol/g h}$)	r_3 ($\mu\text{mol/g h}$)	r_4 ($\mu\text{mol/g h}$)	r_5 ($\mu\text{mol/g h}$)	r_6 ($\mu\text{mol/g h}$)
Control	-7.09	4.61	63.62	4.54	-2.74	0.00
CYS = 0.05	-112.60	18.81	54.65	18.23	-15.33	0.00
CYS = 0.55	62.84	19.51	94.99	15.77	-11.76	0.00
CYS = 1.30	76.33	23.16	97.06	18.35	-15.43	0.00
CYS = 2.50	309.78	35.72	295.71	17.52	-12.49	0.00
CYS = 3.50	939.81	6.88	80.04	4.53	-3.47	0.00
GLU = 2.73	-7.50	7.43	731.91	7.39	-6.40	0.00
GLU = 5.00	-8.64	7.24	1429.13	7.21	-7.45	0.00
GLU = 7.00	-7.55	5.77	1757.42	5.74	-7.13	0.00
GLY = 0.55	-4.18	4.75	89.10	4.90	154.73	1.58
GLY = 3.00	-2.58	4.60	84.46	4.71	861.15	2.98
GLY = 10.00	3.46	4.50	88.58	4.62	2810.52	8.90

Tabla 7.6: Velocidades de reacción en $\mu\text{mol}/(\text{g h})$ correspondientes a las distintas velocidades de alimentación de cisteína, glutamato y glicina

Los flujos cuando existe adición de cisteína se representan en la figura 7.28. La presencia de cisteína activa el flujo intracelular de la reacción r_2 en comparación con el experimento control. Al aumentar la cisteína consumida el flujo específico de formación de dipéptido aumenta pasando por un máximo que coincide con la velocidad de 2.50mmol/h y bajando al nivel basal en el caso de 3.50mmol/h. Cuando el nivel de cisteína añadida es bajo la mayor parte de la cisteína consumida se dirige hacia la formación del dipéptido. Sin embargo esto no ocurre cuando la cisteína aumenta ya que se dirige hacia la formación de CYS_{ot} ; este flujo es especialmente importante cuando la concentración alimentada es 3.50mmol/h. La distribución de flujos en torno al nodo de CYS_{int} parece ser que está muy influenciado por la concentración de cisteína intracelular, de manera que a partir de una concentración determinada, se redirige el flujo hacia el metabolismo del azufre en lugar de hacia gGC.

El flujo de glutamato que se dirige hacia GLU_{ot} (r_3) aumenta con la velocidad de alimentación de cisteína, pasando por un máximo para 2.50mmol/h. Un aumento de este flujo equivale a una mayor velocidad de consumo de glutamato del medio extracelular. Es razonable que al aumentar el flujo que se dirige hacia dipéptido aumente el requerimiento de glutamato y, por tanto, su velocidad de consumo. Sin embargo, los niveles de r_3 son elevados con respecto a lo que la célula necesita para la formación de gGC. Por lo tanto parece que el nivel de CYS_{int} (que depende de la cisteína añadida) ejerce una regulación sobre el flujo de glutamato que se dirige hacia otras rutas, como al ciclo de Krebs o a la síntesis de aminoácidos.

El nivel de glicina presente en el medio de cultivo es baja, por lo que la célula debe consumir glicina de otras fuentes intracelulares para la síntesis de GSH. El flujo de glicina procedente de estas fuentes (r_5) es siempre mayor al control y aproximadamente igual al que se dirige a GSH, por lo que podemos pensar que r_4 estuviera limitado por r_5 . Para las velocidades de cisteína comprendidas entre 0.05 y 2.50mmol/h el flujo de r_4 es el mismo (tabla 7.6); así se observa en la tabla que el flujo de consumo de glicina también es igual. Para la velocidad de 3.50mmol/h al disminuir el valor de r_4 a su nivel basal también lo hará el de r_5 . La diferencia entre los flujos r_2 y r_4 se incrementa al aumentar la cisteína consumida, por lo que aumenta el nivel de dipéptido en el microorganismo (figura 7.12).

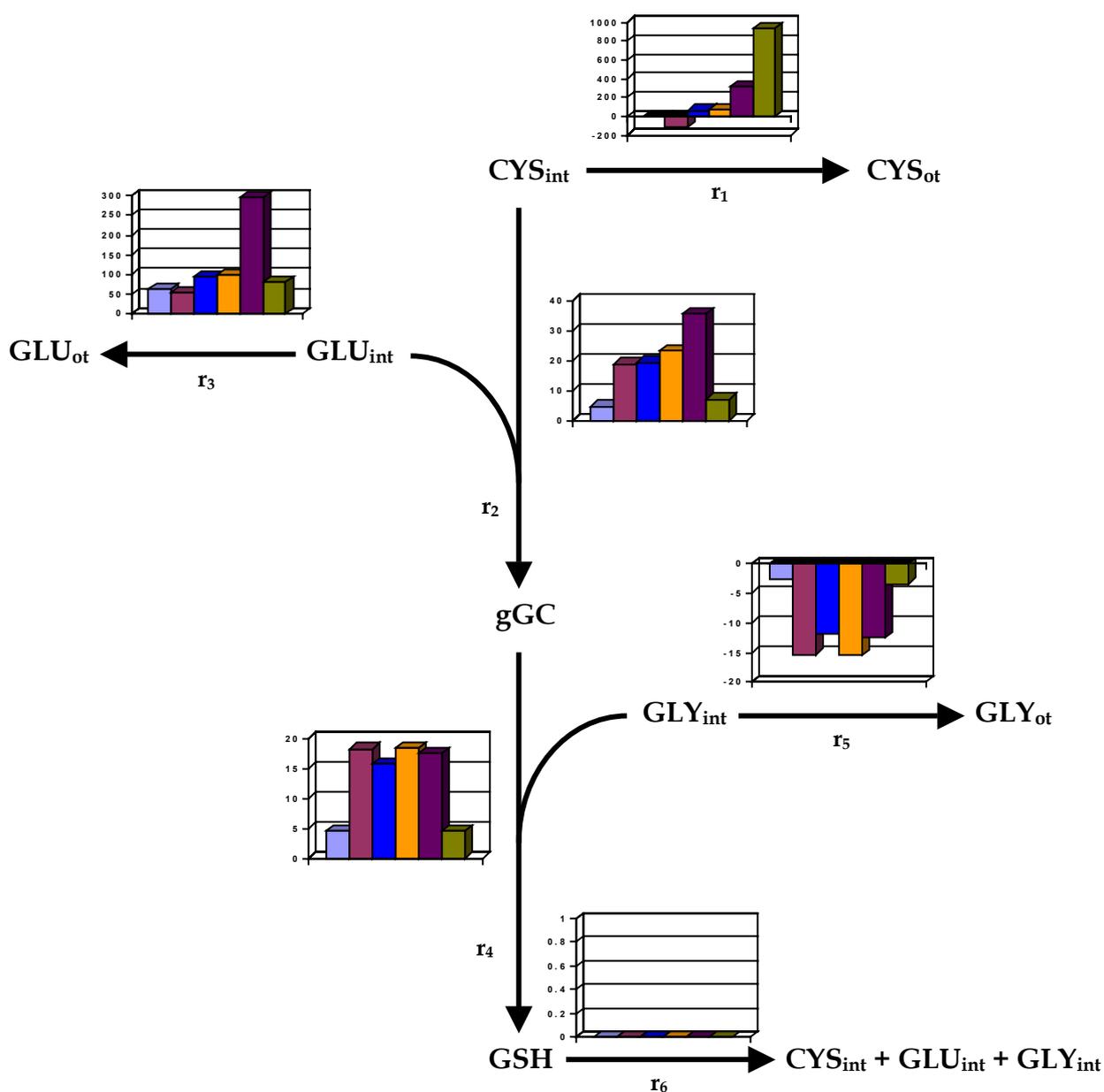


Figura 7.28: Flujos ($\mu\text{mol} / \text{g h}$) correspondientes al metabolismo del glutatión bajo las siguientes condiciones: ■ control, ■ cisteína 0.05mmol/h, ■ cisteína 0.55mmol/h, ■ cisteína 1.30mmol/h, ■ cisteína 2.50mmol/h, y ■ cisteína 3.50mmol/h

Al adicionar glutamato (figura 7.29) el flujo hacia dipéptido (r_2) y hacia GSH (r_4) parecen mantenerse estables si se comparan con el control, aumentando ligeramente cuando la concentración de glutamato es baja. Al ser la presencia de cisteína insuficiente, ésta la obtiene de otras fuentes de azufre; el flujo r_2 presenta los mismos niveles que r_1 , luego es de suponer que toda la cisteína que obtiene por esta vía se dirige hacia gGC. Al aumentar la velocidad de alimentación aumenta el flujo de glutamato que se dirige hacia otras rutas, r_3 . Para el flujo de síntesis de glutatión (r_4) se aprecia el mismo comportamiento que para r_2 , lo cual resulta en velocidades iguales de acumulación de dipéptido. El flujo de consumo de glicina (r_5) es prácticamente igual al de síntesis de glutatión.

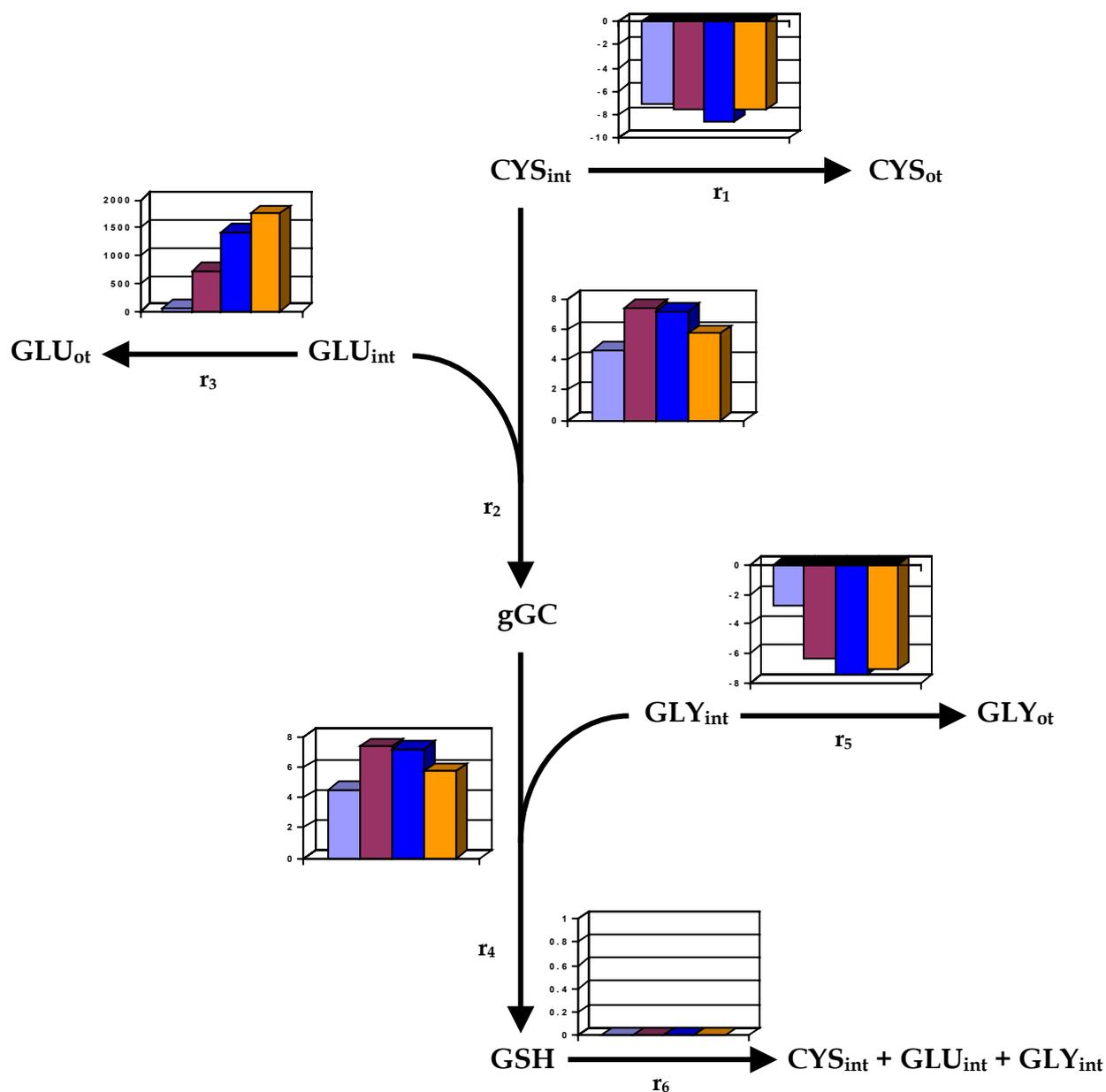


Figura 7.29: Flujos ($\mu\text{mol/g h}$) correspondientes al metabolismo del glutatión bajo las siguientes condiciones: ■ control, ■ glutamato 2.73mmol/h, ■ glutamato 5.00mmol/h, y ■ glutamato 7.00mmol/h

En el caso de alimentar glicina (figura 7.30) se observa una degradación de glutatión que depende del valor de GLY_{int} . A medida que aumenta el caudal de alimentación disminuye la concentración de GSH en la célula, ya que disminuye la diferencia entre r_4 y r_6 . Además, el consumo de cisteína (r_1) disminuye, el flujo de glicina hacia GLY_{ot} aumenta y apenas se observan variaciones en el valor de r_3 , debido principalmente a los aminoácidos liberados en la degradación de glutatión.

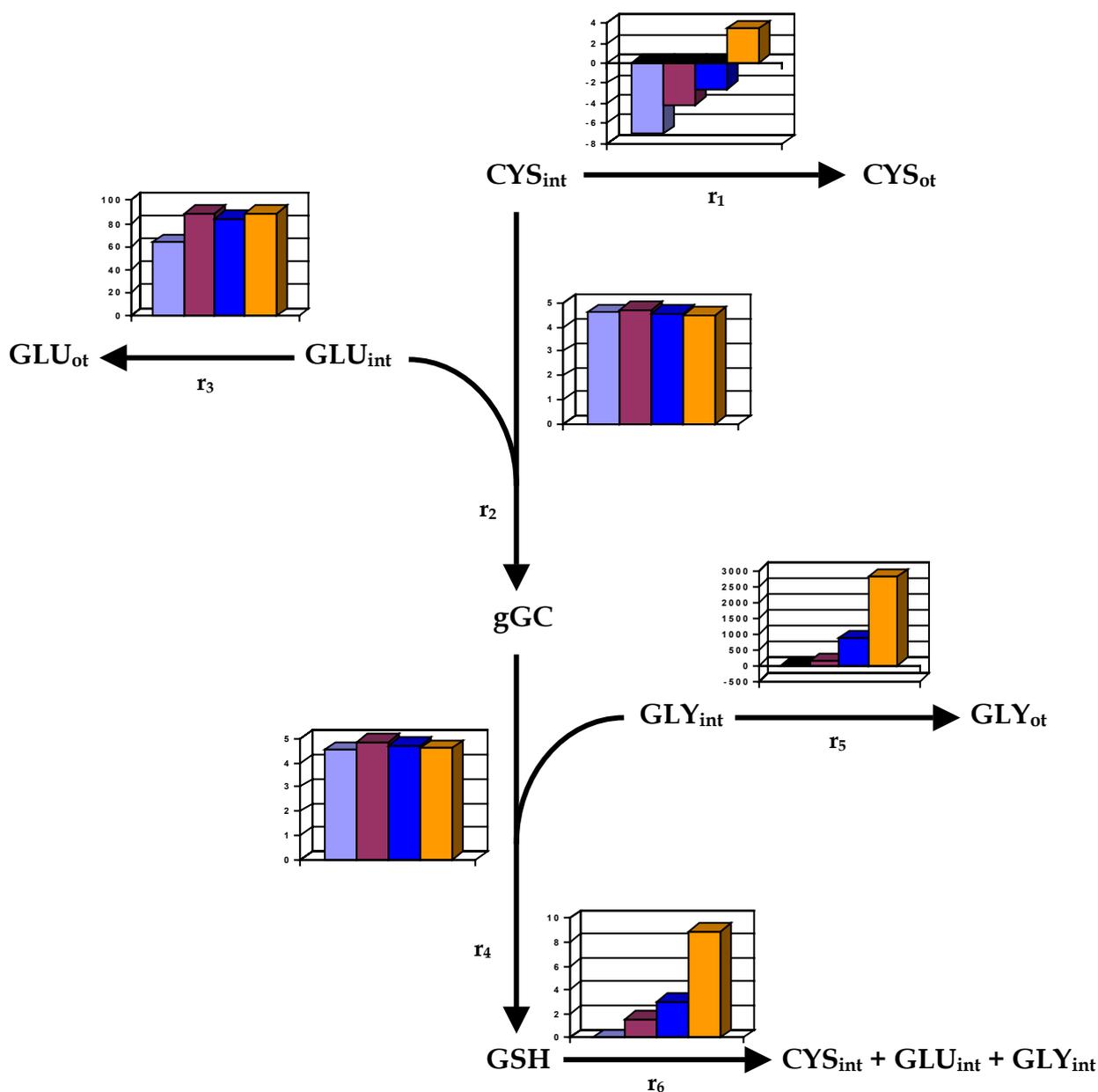


Figura 7.30: Flujos ($\mu\text{mol/g h}$) correspondientes al metabolismo del glutatión bajo las siguientes condiciones: ■ control, ■ glicina 0.55mmol/h, ■ glicina 3.00mmol/h, y ■ glicina 10.00mmol/h

6.2. DEFINICIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE CONTROL PARA LA DISTRIBUCIÓN DE FLUJOS HACIA LA SÍNTESIS DE GLUTATIÓN

El objetivo sería aumentar la concentración celular sin reducir la concentración específica de GSH. En el apartado anterior se analizó la influencia de los aminoácidos en la concentración de glutatión. De los resultados se concluye que la máxima concentración específica tanto de GSH como de gGC , así como la mayor concentración total de gGC , se obtienen cuando la presencia de cisteína es

importante. Sin embargo la máxima concentración total de GSH se alcanza con un pequeño aporte de cisteína. Esta mayor producción de GSH coincide con una mayor concentración celular, debida principalmente a la menor generación de etanol (figura 7.10).

Analizando los flujos de manera independiente y en función de nuestros resultados, se tiene que es necesario un pequeño aporte de cisteína para activar la ruta r_2 hacia el dipéptido, pero este flujo debe ser tal que no permita una acumulación de cisteína que pueda inhibir el crecimiento de la célula por la síntesis de etanol. De las concentraciones estudiadas únicamente la de 0.05mmol/h da lugar a una concentración de biomasa y de etanol igual a la del control, y con la máxima concentración específica de GSH admitida por la célula. Además con el objeto de optimizar el consumo de cisteína hacia gGC y GSH, el flujo hacia el metabolismo de azufre, r_1 , debe ser lo más bajo posible; de todas las concentraciones estudiadas la de 0.05mmol/h es la más cercana a este objetivo.

La concentración de dipéptido, con un caudal de cisteína de 0.05mmol/h, es baja. Por el análisis de flujos de adición de glutamato (figura 7.29) se veía que el flujo hacia dipéptido aumentaba con respecto al control. Por lo tanto se intenta forzar la formación de dipéptido añadiendo glutamato junto con cisteína. Se comprobó esto alimentando diferentes concentraciones de glutamato junto con una concentración fija de cisteína, para un valor de cisteína de 0.55mmol/h, con el fin de apreciar mejor las diferencias). De la figura 7.31 se puede observar que para una velocidad de adición de glutamato de 3mmol/h la concentración de dipéptido es superior al control.

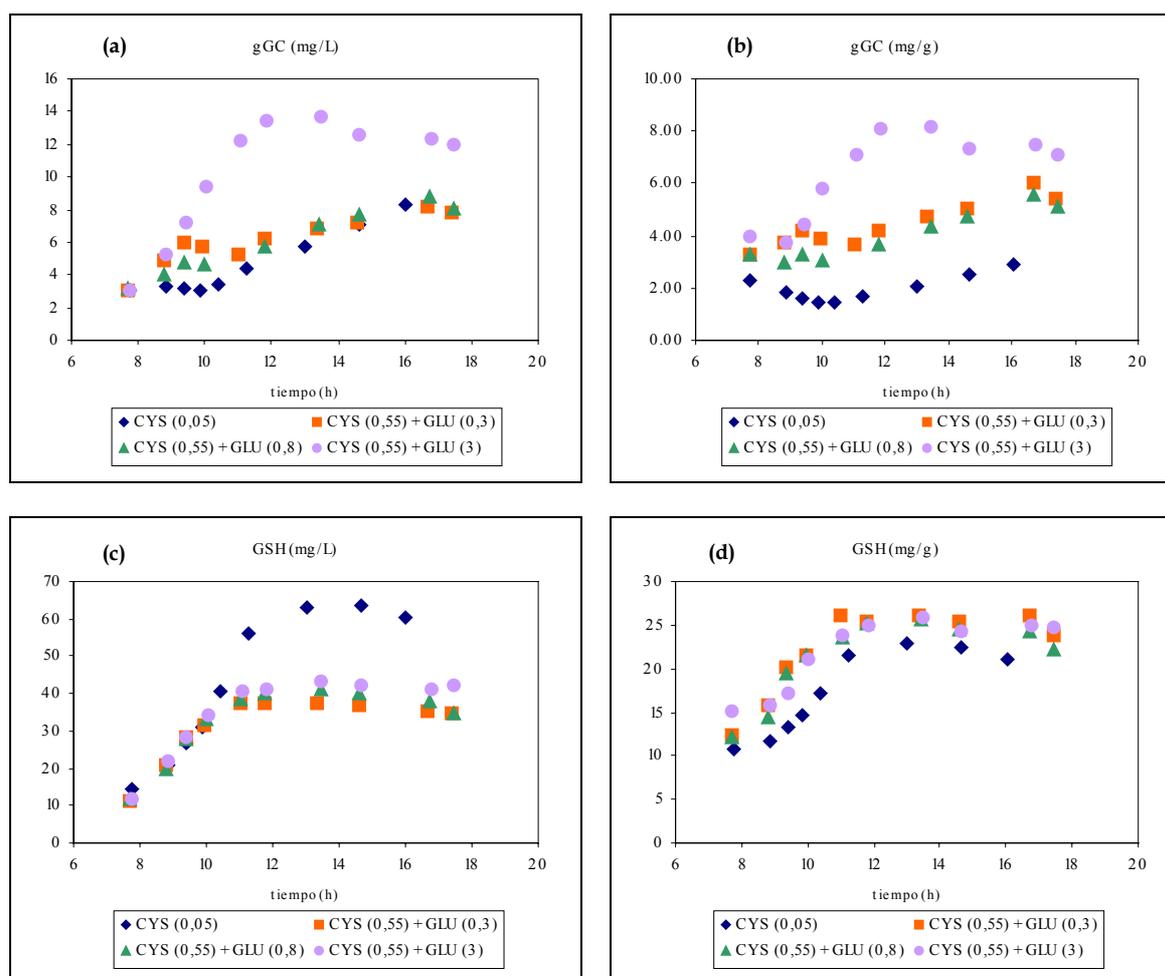


Figura 7.31: Concentración total de dipéptido (a), específica de dipéptido (b), total de glutatión (c) y específica de glutatión (d) para distintos experimentos con alimentación combinada de cisteína (0.55mmol/h) y glutamato a distintas velocidades

Por último es necesario añadir glicina para evitar posibles limitaciones, pero se debe hacer de forma que no se produzca degradación de glutatión. Al igual que en el caso anterior junto a un caudal fijo de cisteína de 0.55mmol/h se alimentan diversas concentraciones de glicina (figura 7.32), viendo que a concentraciones elevadas se produce degradación de GSH y de gGC.

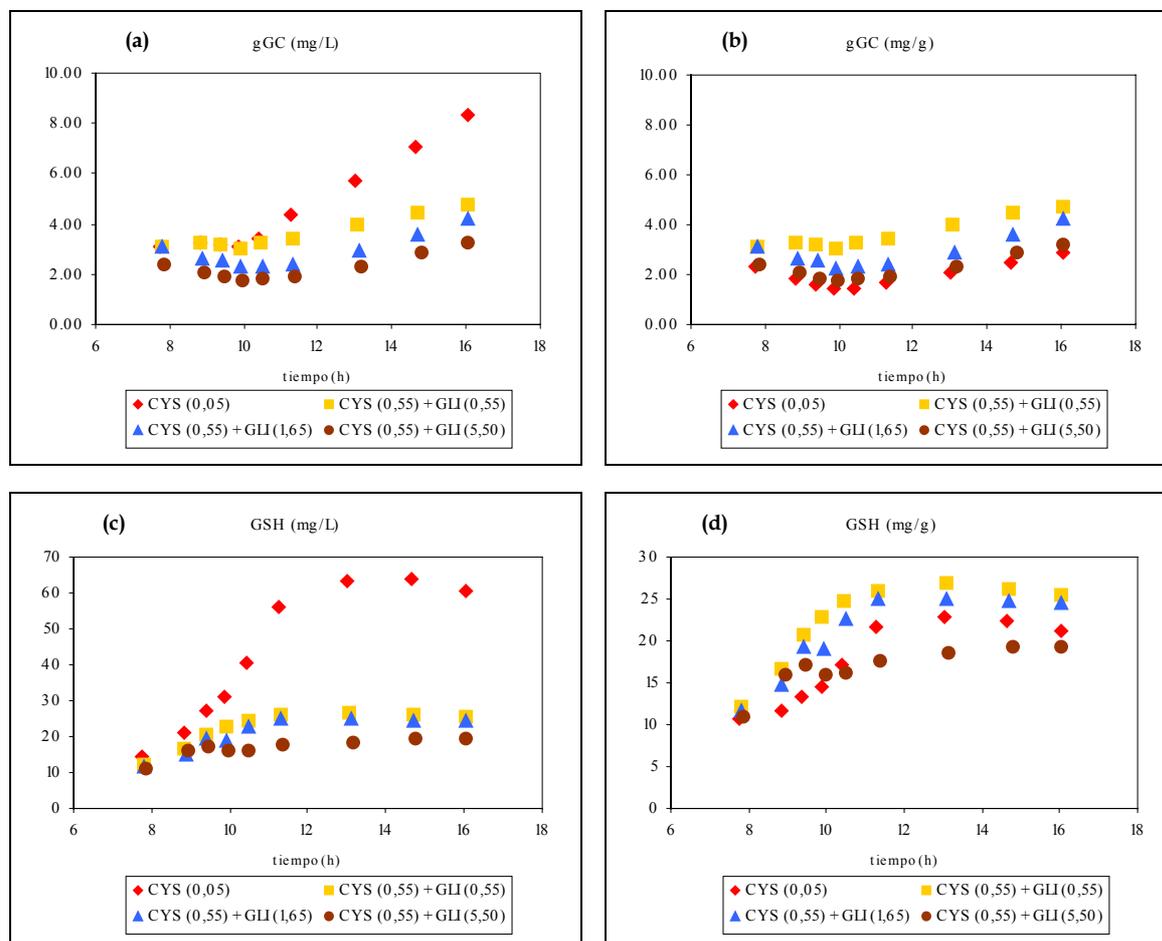


Figura 7.32: Concentración total de dipéptido (a), específica de dipéptido (b), total de glutatión (c) y específica de glutatión (d) para distintos experimentos con alimentación combinada de cisteína (0.55mmol/h) y glicina a distintas velocidades

Con todos estos datos y con el objetivo de alcanzar una elevada concentración de GSH y gGC, se optó por utilizar una alimentación de cisteína + glutamato + glicina a las velocidades de 0.05, 3.00 y 0.03mmol/h respectivamente, obteniéndose los valores experimentales de la tabla 7.7. Se ha conseguido optimizar el proceso con respecto a la alimentación de cisteína a 0.05mmol/h, puesto que se obtiene un incremento en la producción de biomasa de un 49.0%, en la concentración total de dipéptido de un 337.7%, de la concentración específica de dipéptido de un 193.8%, y de la concentración total de glutatión de un 66.5% sin modificar la concentración específica de GSH. El tiempo de cultivo necesario para alcanzar estos valores es de unas 32 horas en lugar de 16 horas.

Experimento	Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	gGC (mg/L)	gGC (mg/g)	GSH (mg/L)	GSH (mg/g)
Control	16.59	3.18	0.00	4.66	1.47	38.11	11.98
CYS (0.05)	16.03	2.86	0.00	8.35	2.92	60.48	21.15
CYS (0.05) + GLU (3.00) + GLY (0.03)	33.52	4.26	0.00	36.55	8.58	100.69	23.64

Tabla 7.7: Metabolismo de la cepa mutada en el experimento control, cuando se adiciona cisteína a 0.55mmol/h y cuando se alimenta cisteína (0.05mmol/h) + glutamato (3.00mmol/h) + glicina (0.03mmol/h)

El análisis de flujos utilizando las velocidades experimentales de la tabla 7.8, nos da la distribución de flujos que aparece en la figura 7.33. Suponemos, al igual que hacíamos con la cisteína y el glutamato, que no se produce degradación de glutatión, $r_6 = 0$.

Experimento	r_{CYSint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLUint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GLYint} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{gGC} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)	r_{GSH} ($\mu\text{mol}/\text{L h}$)
Control	6.40	-176.72	-4.68	0.19	11.77
CYS(0.05)+GLU(3.00)+GLY(0.03)	-26.40	-2240.30	-21.19	1.17	46.79

Tabla 7.8: Velocidades específicas experimentales para el experimento con alimentación de cisteína (0.05mmol/h) + glutamato (3.00mmol/h) + glicina (0.03mmol/h)

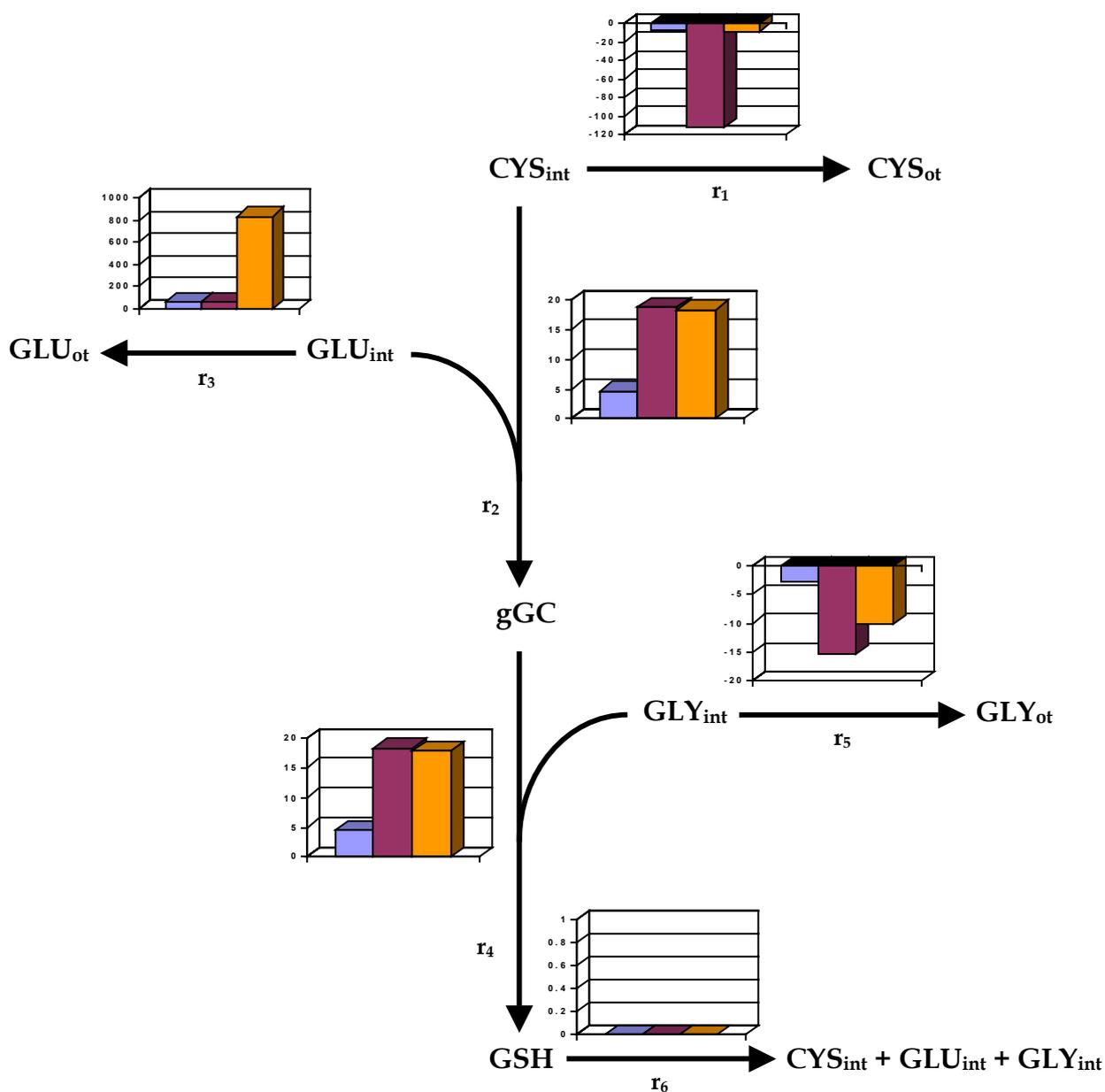


Figura 7.33: Flujos ($\mu\text{mol}/\text{g h}$) correspondientes al metabolismo del glutatión bajo las siguientes condiciones: ■ control, ■ cisteína (0.05mmol/h), y ■ cisteína (0.05mmol/h) + glutamato (3.00mmol/h) + glicina (0.03mmol/h)

Si nos fijamos en la distribución de flujos se observa que el flujo r_1 es similar al control. Por otro lado r_2 y r_4 son parecidos a la adición de 0.05mmol/h de cisteína y el flujo r_3 tiene el mismo comportamiento que cuando se alimentaba glutamato a la velocidad de 2.73mmol/h. Además sigue siendo necesario el aporte de glicina (consume glicina de otras fuentes intracelulares) y por lo tanto no se produce degradación de GSH.

7. REFERENCIAS

Alfafara C.G., Miura K., Shimizu H., Shioya S. and Suga K. 1992a. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 141-146.

Alfafara C.G., Kanda A., Shioi T., Shimizu H., Shioya S. and Suga K. 1992b. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 538-540.

Chan S.Y. and Appling D.R. 2003. Regulation of S-adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 278 (44) : 43051-43059.

Elskens M.T., Jaspers C.J. and Penninckx M.J. 1991. Glutathione as an endogenous sulfur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 141: 207-212.

Grant C.M., McIver F.H. and Dawes I.W. 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 29 : 511-515.

Hamilton D., Wu J.H., Alaoui-Jamali M. and Batist G. 2003. A novel missense mutation in the γ -glutamylcysteine synthetase catalytic subunit gene both decreased enzymatic activity and glutathione production. Blood 102 (2) : 725-730.

Huang C., Chang L., Anderson M.E. and Meister A. 1993. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. J. Biol. Chem. 268 (26) : 19675-19680.

Kumar C., Sharma R. and Bachhawat A.K. 2003. Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of γ -glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : evidence of an alternative glutathione degradation pathway. FEMS Microbiology Letters 219 : 187-194.

Li Y., Wei G. and Chen J. 2004. Glutathione : a review on biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66 (3) : 233-242.

Lu S.C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. FASEB J. 13: 1169-1183.

Magasanik B. and Kaiser C.A. 2002. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 290 (1-2): 1-18.

Maw G.A. 1961. Effects of cysteine and other thiols on the growth of a brewer's yeast. J. Inst. Brew 67: 57-63.

Mehdi K., Thiere J. and Penninckx M.J. 2001. γ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. Biochem. J. 359 : 631-637.

Miyake T., Hazu T., Yoshida S., Kanayama M., Tomochika K., Shinoda S., and Ono B. 1998. Glutathione transport systems of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (10): 1858-1864.

Murakami K., Onoda Y., Kimura J. and Yoshino M. 1997. Protection by histidine against oxidative inactivation of AMP deaminase in yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42 (5) : 1063-1069.

Murata K. 1994. Glutathione and its derivatives: produced by recombinant *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Technol.* 19: 159-183.

Murata K. and Kimura A. 1990. Overproduction of glutathione and its derivatives by genetically engineered microbial cells. *Biotchnol. Adv.* 8: 59-96.

Nissen T.L., Kielland-Brandt M.C., Nielsen J. and Villadsen J. 2000. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metabolic Engineering 2* : 69-77.

Ohtake Y. and Yabuuchi S. 1991. Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7 (9): 953-961.

Ono B., Hazu T., Yoshida S., Kawato T., Shinoda S., Brzvwczy J. and Paszewski A. 1999. Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. *Yeast* 15: 11365-1375.

Ono B., Kijima K., Ishii N., Kawato T., Matsuda A., Paszewski A. and Shinoda S. 1996. Regulation of sulfate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12: 1153-1162.

Ono B., Naito K., Shirahige Y. and Yamamoto M. 1991. Regulation of cystathionine γ -lyase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 843-848.

Penninckx M.J. 2002. MiniReview : An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research* 2 : 295-305.

Richman P.G. and Meister A. 1975. Regulation of g-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.* 250 (4): 1422-1426.

Taherzadeh M.J. 1999. Ethanol from lignocellulose : Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies. PhD Thesis. Chalmers University of Technology. Göteborg, Sweden.

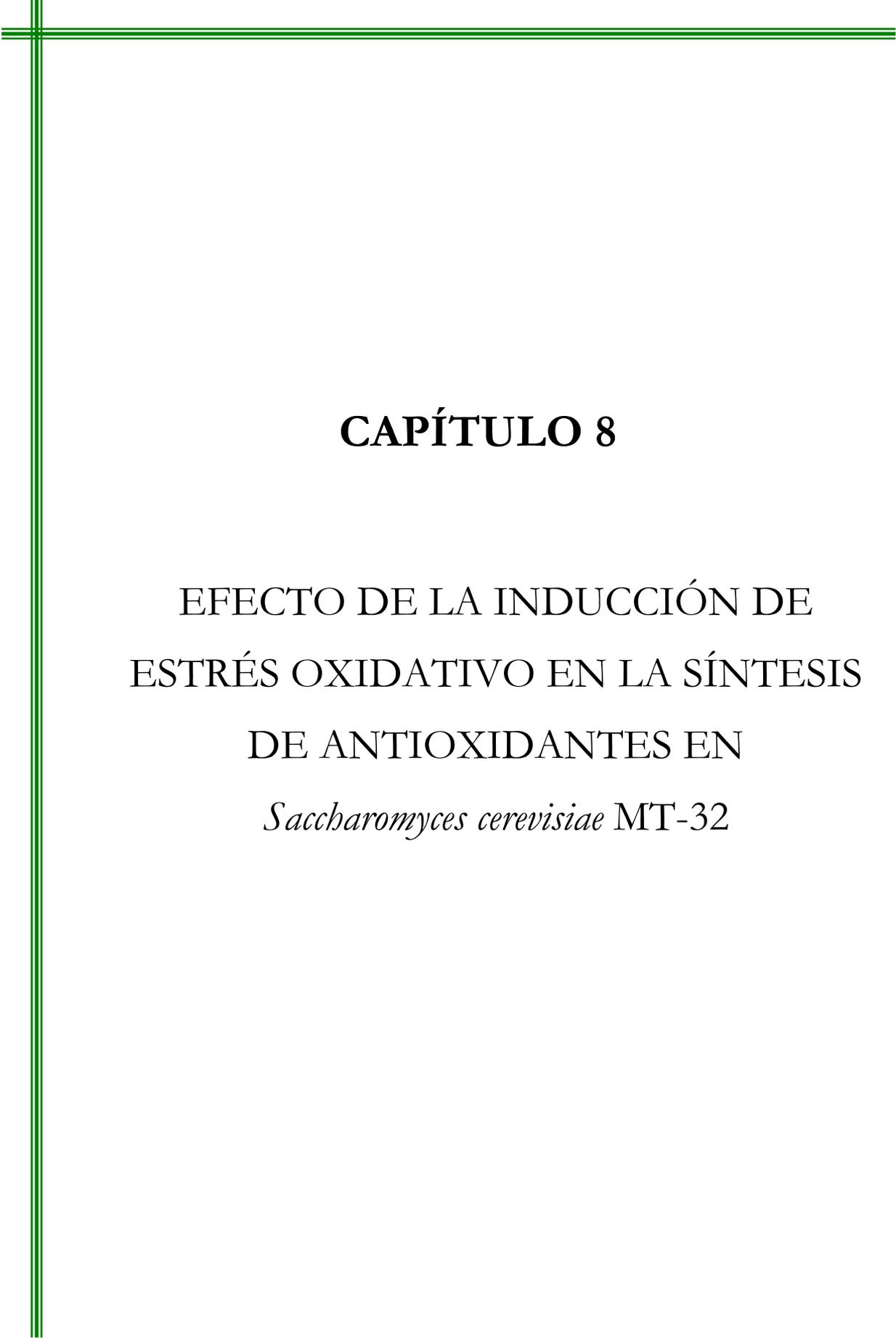
Udeh K.O. and Achremowicz B. 1994. Production of yeast biomass with elevated content of glutathione. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 3/44 (1): 93-100.

Wessner B., Strasser E.M., Spittler A. and Roth E. 2003. Effect of single and combined supply of glutamine, glycine, N-acetylcysteine, and R,S-alpha-lipoic acid on glutathione content of myelomonocytic cells. *Clin. Nutr.* 22 (6) : 515-522.

Wheeler G.L., Quinn K.A., Perrone G., Dawes I.W. and Grant C.M. 2002. Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Mol. Microbiol.* 46 (2): 545-556.

Wu G., Fang Y., Yang S., Lupton J.R. and Turner N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134 (3) : 489-492.

Yeast genome: <http://pathway.yeastgenome.org>



CAPÍTULO 8

EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE
ESTRÉS OXIDATIVO EN LA SÍNTESIS
DE ANTIOXIDANTES EN

Saccharomyces cerevisiae MT-32

**CAPÍTULO 8 EFECTO DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN LA SÍNTESIS DE ANTIOXIDANTES
EN *Saccharomyces cerevisiae* MT-32**

1. INTRODUCCIÓN	189
2. ADICIÓN DE H ₂ O ₂ EN FED-BATCH AL COMIENZO DE LA FERMENTACIÓN	190
3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE H ₂ O ₂ Y CISTEÍNA	191
4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE H ₂ O ₂ Y GLICINA	192
5. DISCUSIÓN	195
6. REFERENCIAS	196

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo ha sido relacionado con una gran variedad de procesos biológicos y enfermedades como el cáncer, artritis, envejecimiento, enfermedades coronarias y muerte celular programada. Los radicales libres de oxígeno (ROS) se generan en el interior de muchas células como consecuencia de procesos metabólicos como la respiración y también por el sistema inmune en respuesta a patógenos. Como resultado, todos los organismos aerobios han desarrollado mecanismos para proteger sus componentes celulares de las especies reactivas del oxígeno. Los organismos eucariotas poseen diferentes enzimas capaces de actuar frente a los ROS, como, por ejemplo, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión transferasas (Jamieson, 1992).

La capacidad de adaptación a cambios en las condiciones intra y extracelulares es un requisito universal para la supervivencia de un organismo y su evolución. La existencia de mecanismos moleculares de respuesta, reparación y adaptación, provee a la célula de la flexibilidad que necesita para ajustarse a su entorno siempre cambiante, hecho que se conoce como *respuesta al estrés*. A través de la señalización de estrés al núcleo se produce un cambio genético que conduce, por un lado, a una menor expresión de genes de mantenimiento y de síntesis de proteínas, y, por otro lado, a una mayor expresión de genes que codifican proteínas de respuesta al estrés. La supervivencia y el crecimiento necesitan de una correcta adaptación de las células a las nuevas condiciones así como de una reparación del daño producido (Rodríguez-Pousada et al., 2005).

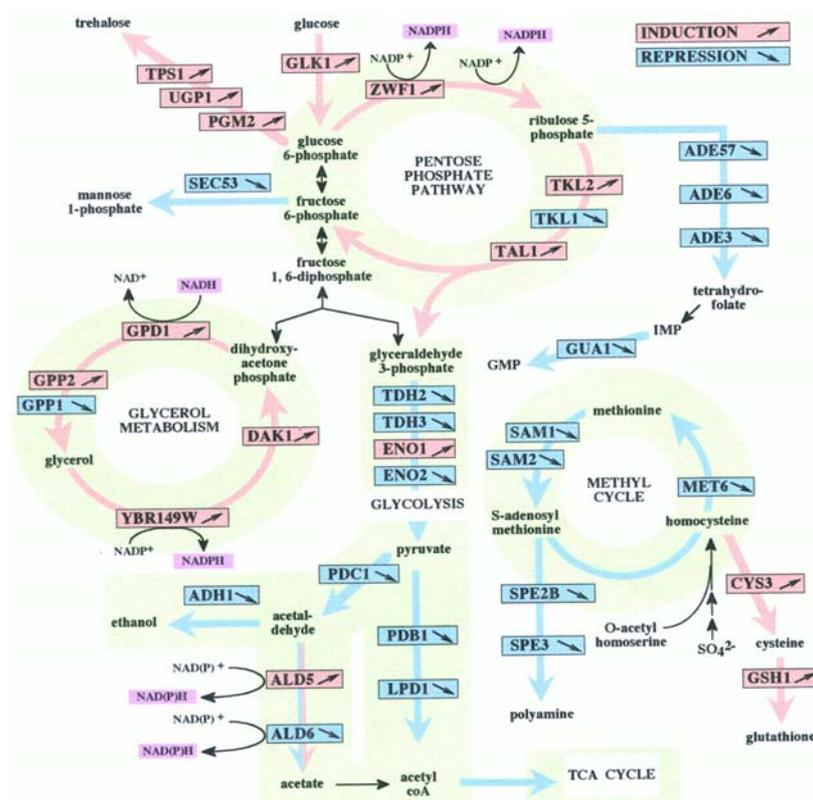


Figura 8.1 (Godon et al., 1998): Rutas metabólicas modificadas durante la respuesta a H_2O_2

La respuesta adaptativa a las condiciones de estrés se produce mediante la inducción de diversas baterías de genes. Godon et al. (1998) han reconocido 150 proteínas cuya síntesis se ve alterada transitoriamente tras la exposición a H_2O_2 . Identificaron 71 proteínas que se estimulan y 44 que se reprimen. En la figura 8.1 se muestran las rutas que se modifican en la respuesta frente al estrés inducido por H_2O_2 .

Nos planteamos como objetivo estudiar la respuesta de *S. cerevisiae* MT-32 ante la presencia de peróxido de hidrógeno. Queremos conocer cómo se produce la respuesta adaptativa de nuestro microorganismo a esta fuente de estrés; esto se puede hacer alimentando H_2O_2 desde el comienzo de la fermentación y analizando los diversos metabolitos representativos del crecimiento y del metabolismo del glutatión.

Sabemos que un aporte de cisteína al medio de cultivo aumenta la producción de glutatión por parte de la célula (apartado 3 del Capítulo 7); se quiere, por tanto, estudiar cómo se modifica la producción de GSH si junto con la cisteína alimentamos H_2O_2 , y también qué respuesta presenta el microorganismo ante el estrés si anteriormente se han incrementado los niveles intracelulares de glutatión mediante la adición de cisteína.

En los experimentos con adición de glicina del apartado 5 del Capítulo 7, se vio que la glicina favorecía la síntesis de histidina y que se producía un descenso en la concentración específica de glutatión. Puesto que el glutatión es el principal antioxidante que se produce frente al estrés oxidativo, queremos estudiar la respuesta de un cultivo alimentado con glicina frente al estrés oxidativo causado por H_2O_2 , para ver si no tiene lugar ese descenso en la concentración de GSH que se observaba como consecuencia de una alimentación de glicina.

De las condiciones de selección de la cepa se sabe que ésta soporta concentraciones de H_2O_2 de hasta 12mM. En toda la serie de experimentos que llevamos a cabo se alimenta peróxido de hidrógeno a la velocidad necesaria para que al final de la fermentación (tiempo de 14 horas) exista una concentración de H_2O_2 en el medio de cultivo de 10mM; esta concentración nos permite ser conservativos. Para calcular el valor de velocidad de alimentación se supone que el volumen en el reactor a tiempo de 14 horas es de 1.5L, aunque en realidad será siempre inferior puesto que se habrán tomado muestras con anterioridad.

2. ADICIÓN DE H_2O_2 EN FED-BATCH AL COMIENZO DE LA FERMENTACIÓN

Alimentamos H_2O_2 desde el comienzo de la fermentación para conocer cómo se comporta la célula al estar sometida a estrés durante toda la duración del cultivo. La velocidad de alimentación de H_2O_2 es de 1.10mmol/h.

En la tabla 8.1 se muestran los valores de biomasa y GSH en el momento en el que la concentración de GSH permanece estable aunque se le añada más H_2O_2 . También se muestran los resultados del experimento control al mismo tiempo de fermentación.

Experimento	H_2O_2 (mmol/h)	Biomasa (g/L)	GSH (mg/g)
Control	0.00	3.00	14.56
Alimentación H_2O_2	1.10	2.89	18.17

Tabla 8.1: Concentración de biomasa y concentración específica de GSH para el experimento control (sin adición de H_2O_2) y para un experimento donde se alimenta H_2O_2 desde el principio del batch a 1.10 mmol/h

Se observa que la cepa *S. cerevisiae* MT-32 ha ido desarrollando una respuesta adaptativa a la presencia de peróxido de hidrógeno puesto que apenas se produce inhibición de la síntesis de biomasa, sólo se produce un descenso de la concentración de biomasa de un 3.7%. Además los radicales libres producidos por la adición de agua oxigenada estimulan el metabolismo de formación de glutatión.

3. EFECTO DE LA ADICIÓN DE H₂O₂ Y CISTEÍNA

En este apartado vamos a estudiar el comportamiento del microorganismo cuando se encuentra en presencia de cisteína, aminoácido que incrementa la producción específica de GSH, y de peróxido de hidrógeno, que genera estrés oxidativo. Este estudio se realizará de dos formas: alimentando cisteína y H₂O₂ de manera conjunta a partir de la mitad de la fase exponencial y alimentando primero cisteína a la mitad de la fase exponencial y a las 11 horas (tiempo para el cual las concentraciones de dipéptido y GSH son máximas tras la adición de cisteína) se añadirá H₂O₂. La velocidad de alimentación de cisteína es de 0.55mmol/h; la velocidad de alimentación de H₂O₂ es de 2.50mmol/h cuando se alimenta junto con la cisteína y de 5.00mmol/h cuando se alimenta en un momento posterior, para poder comparar los resultados para una misma concentración de H₂O₂ añadida.

Los resultados obtenidos cuando se alimenta sólo cisteína, cisteína + H₂O₂ o cisteína y luego H₂O₂ se muestran en la tabla 8.2.

Cisteína (mmol/h)	H ₂ O ₂ (mmol/h)	Tiempo alimentación H ₂ O ₂ (h)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	GSH (mg/g)	GSH (mg/L)	H ₂ O ₂ añadida (mmol)
0.55	-	-	1.91	0.655	23.30	43.95	0.00
0.55	2.50	8	1.37	0.872	30.37	41.60	16.13
0.55	5.00	11	1.85	0.681	28.90	53.11	11.40

Tabla 8.2: Concentración de biomasa, concentración de etanol, concentración específica de GSH, concentración total de GSH y cantidad de peróxido de hidrógeno añadido para cuando se alimenta cisteína, cisteína junto con H₂O₂ o cisteína y luego H₂O₂

Se puede observar de la tabla 8.2 que si el peróxido de hidrógeno se alimenta junto con la cisteína produce un menor consumo de etanol y, por tanto, una mayor inhibición en el crecimiento. Cuando alimentamos H₂O₂ a las 11h la concentración de biomasa ya había alcanzado el estado estacionario tras la adición de cisteína, y, por eso, no hay modificaciones en la biomasa con respecto al experimento de sólo adición de cisteína.

Para una misma cantidad de cisteína añadida, se observa de la tabla 8.2 que la adición de H₂O₂ influye en la síntesis de GSH; el agua oxigenada aumenta la concentración específica de GSH, independientemente del momento de adición o de la velocidad de alimentación utilizada, aunque es algo mayor para la velocidad de 2.50mmol/h. El momento en que se adiciona H₂O₂ influye en la concentración de etanol, de manera que si se alimenta H₂O₂ antes, se consigue una mayor concentración de etanol (menor consumo), y esto a su vez, repercute en la concentración de biomasa, que será menor. Por tanto, el momento de alimentación hace que la concentración total de GSH obtenida disminuya con el momento de adición de H₂O₂, porque se alcanza prácticamente la misma concentración específica de GSH pero una menor concentración de biomasa que si se alimenta después.

Si añadimos peróxido de hidrógeno una vez que se alcanza el estado estacionario en la concentración de biomasa tras alimentar cisteína, se consigue incrementar la concentración específica de GSH con respecto al control y la concentración total de GSH es la más elevada. Además la cantidad de H₂O₂ añadida es menor que en el caso en que se alimentan cisteína y H₂O₂ simultáneamente.

Para estudiar las diferencias en el metabolismo, se analizan los aminoácidos libres extracelulares de los diferentes experimentos.

Aminoácido (μM)	Cisteína (0.55mmol/h)	Cisteína (0.55mmol/h) + H ₂ O ₂ (2.50mmol/h)	Cisteína (0.55mmol/h) → H ₂ O ₂ (5.00mmol/h)
Ac. Aspártico	34,426	182,529	26,548
Ac. Glutámico	129,635	259,409	120,810
Serina	29,639	523,432	35,884
Histidina	1142,917	1369,291	1065,810
Glicina	15,992	21,622	18,017
Arginina	38,820	38,818	37,746
Treonina	33,721	36,774	17,115
Alanina	975,254	1165,062	634,808
Prolina	225,770	348,077	236,208
Tirosina	193,205	205,417	221,375
Valina	549,675	478,254	374,222
Metionina	10,647	5,176	7,020
Lisina	30,002	2,497	18,922
Isoleucina	179,542	186,798	105,587
Leucina	241,744	248,740	140,362
Fenilalanina	147,310	127,313	109,601
TOTAL	3978	5199	3170

Tabla 8.3: Medida de aminoácidos libres extracelulares en un cultivo con alimentación de cisteína (0.55mmol/h); alimentación conjunta de cisteína (0.55mmol/h) y H₂O₂ (2.50 mmol/h); y alimentación de cisteína (0.55mmol/h) y posterior adición de H₂O₂ (5.00mmol/h)

De la tabla 8.3 se puede observar que la principal diferencia lo presenta el experimento con alimentación conjunta de cisteína y agua oxigenada puesto que las concentraciones de aspártico, glutámico y serina son bastante superiores a los otros dos casos, generando una mayor concentración total de aminoácidos en el medio extracelular. También son mayores las concentraciones de histidina, alanina y prolina. De la evolución con el tiempo de la concentración de aminoácidos (no se muestran los datos) se concluye que lo que ocurre es que dejan de consumirse estos aminoácidos. Se podría relacionar el menor consumo de estos aminoácidos con la inhibición en el crecimiento producida cuando se alimenta cisteína y peróxido de hidrógeno de forma conjunta.

4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE H₂O₂ Y GLICINA

De los resultados de análisis de aminoácidos cuando se alimentaba glicina de manera continua al medio de cultivo (ver figura 7.25) se vio que la glicina favorecía la síntesis de histidina. Además el comportamiento del GSH era bastante peculiar, había un periodo para el cual se producía un descenso en la concentración específica de GSH y luego aumentaba, ver figura 7.24 (d). La eliminación de GSH se puede atribuir a múltiples factores, incluyendo un aumento de la degradación, conjugación, oxidación, transporte extracelular y/o una menor síntesis (Perrone et al., 2005).

La histidina está asociada con efectos antioxidantes, por lo que puede ser que la alimentación de glicina favorezca la formación de este antioxidante fisiológico en lugar de sintetizar GSH.

Queremos estudiar si la síntesis de GSH se vería incrementada con respecto a la síntesis de histidina (en cultivos alimentados con glicina) cuando se somete a la célula a estrés oxidativo, por ser el glutatión el antioxidante más importante frente a la defensa de radicales libres.

Al igual que en el caso de la cisteína vamos a alimentar glicina y H₂O₂ de manera conjunta a partir de la mitad de la fase exponencial y también vamos a alimentar primero glicina desde la mitad de la fase exponencial y a las 10 horas añadiremos H₂O₂ (este tiempo se ha elegido porque es anterior a la subida que se produce en la síntesis de GSH, ver figura 7.24). La velocidad de alimentación de glicina es de 3.00mmol/h; la velocidad de alimentación de H₂O₂ es de 2.50mmol/h cuando se alimenta al mismo tiempo que la glicina y de 3.75mmol/h cuando se alimenta después.

Los resultados obtenidos en el punto de mínima concentración específica de GSH cuando se alimenta sólo glicina, glicina + H₂O₂ o glicina y luego H₂O₂ se muestran en la tabla 8.4.

Glicina (mmol/h)	H ₂ O ₂ (mmol/h)	Tiempo alimentación H ₂ O ₂ (h)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	GSH (mg/g)	GSH (mg/L)	H ₂ O ₂ añadida (mmol)
3.00	-	-	2.37	0.086	4.80	11.38	0.00
3.00	2.50	8	2.18	0.051	5.32	11.59	16.55
3.00	3.75	10	1.68	0.029	8.26	13.88	13.20

Tabla 8.4: Concentración de biomasa, concentración de etanol, concentración específica de GSH, concentración total de GSH y cantidad de H₂O₂ añadida para cuando se alimenta glicina, glicina junto con H₂O₂ o glicina y luego H₂O₂

De la tabla 8.4 se observa que con el peróxido de hidrógeno la concentración específica de GSH disminuye menos, aunque el efecto más beneficioso se observa cuando primero se alimenta glicina y luego H₂O₂. Si el estrés es posterior a la alimentación de glicina se observa mayor inhibición en el crecimiento. En todos los casos se consume el etanol por completo.

Se analizan los aminoácidos libres extracelulares de los diferentes experimentos también para el punto de mínima concentración específica de GSH (que coincide con un tiempo de cultivo entre las 13 y 14 horas). Los resultados se muestran en la tabla 8.5.

Aminoácido (μM)	Glicina (3mmol/h)	Glicina (3mmol/h) + H ₂ O ₂ (2.50mmol/h)	Glicina (3mmol/h) → H ₂ O ₂ (3.75mmol/h)
Ac. Aspártico	27,119	25,466	19,390
Ac. Glutámico	162,873	226,515	231,509
Serina	0,000	46,368	31,379
Histidina	11359,048	18481,703	18720,446
Arginina	41,016	22,371	10,020
Treonina	36,436	30,645	29,238
Alanina	310,548	884,401	909,157
Prolina	84,900	307,738	292,864
Cisteína	19,219	20,362	17,004
Tirosina	39,071	62,870	61,321
Valina	283,040	303,145	357,278
Metionina	7,192	4,985	3,891
Lisina	37,675	27,427	27,876
Isoleucina	68,470	86,394	121,685
Leucina	34,448	93,597	107,250
Fenilalanina	25,536	20,125	33,979
TOTAL	12537	20644	20974

Tabla 8.5: Medida de aminoácidos libres extracelulares en un cultivo con alimentación de glicina (3mmol/h); alimentación conjunta de glicina (3mmol/h) y H₂O₂ (2.50mmol/h); y alimentación de glicina (3mmol/h) y posterior adición de H₂O₂ (3.75mmol/h)

Teniendo en cuenta los datos de la tabla 8.5, se aprecia que la adición de peróxido de hidrógeno en medios alimentados con glicina provoca un menor consumo de alanina, prolina, isoleucina y leucina y mayor síntesis de histidina con respecto a medios alimentados sólo con glicina.

Podemos concluir que la adición de agua oxigenada en experimentos con alimentación de glicina no consigue dirigir los flujos de histidina hacia síntesis de glutatión; sin embargo, el aumento de estrés oxidativo genera una mayor síntesis de histidina y una menor disminución en la concentración de GSH, que es menor cuando el estrés es posterior al momento de alimentación de glicina (mayor velocidad de alimentación de la fuente de estrés).

Vamos a analizar la evolución en la velocidad específica de producción de GSH para los distintos experimentos; los resultados se muestran en la figura 8.2, donde también se representa la concentración de biomasa.

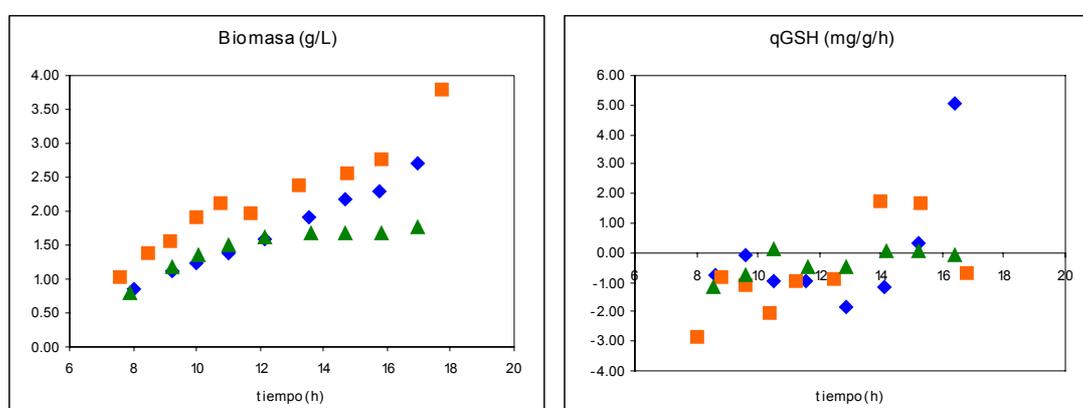


Figura 8.2: Evolución de biomasa y velocidad específica de producción de GSH cuando se alimenta
 ■ glicina (3.00mmol/h); ◆ glicina (3.00mmol/h) y H₂O₂ (2.50mmol/h) simultáneamente; y ▲ glicina (3.00mmol/h) y posterior adición de H₂O₂ (3.75mmol/h)

De la figura 8.2 se observa que hasta tiempos de cultivo de 14 horas, se está consumiendo glutatión, ya que se obtienen valores negativos de la velocidad específica que se ha definido como velocidad de síntesis de GSH. Sólo para los experimentos con adición de glicina, o el de adición de glicina y peróxido de hidrógeno de manera simultánea, se observan valores positivos de la velocidad específica de producción de glutatión. El incremento en la velocidad específica de síntesis de GSH coincide también con un aumento en la concentración de biomasa en estos dos casos.

Se analizaron los aminoácidos libres extracelulares para la última muestra tomada del experimento con adición conjunta de glicina y peróxido de hidrógeno. En la tabla 8.6 se muestran los análisis a dos tiempos distintos: 13.50 horas y 17.00 horas; estos puntos son representativos de dos comportamientos diferentes; a tiempo de 13.50h se observa disminución de la concentración de GSH y a tiempo de 17.00h se observa un incremento en la concentración específica de GSH.

En la tabla 8.6 se observa que para tiempos de cultivo en los que empieza a limitar la fuente de carbono se produce un mayor consumo de aminoácidos. Si nos fijamos en el valor de histidina se ve que en el punto donde se produce el aumento en la síntesis de GSH disminuye mucho la concentración de histidina.

Aminoácido (μM)	Glicina (3mmol/h) + H ₂ O ₂ (2.5mmol/h)	
Tiempo de la muestra (h)	13.50	17.00
Ac. Aspártico	25,466	18,433
Ac. Glutámico	226,515	19,317
Serina	46,368	8,622
Histidina	18481,703	3002,921
Arginina	22,371	11,325
Treonina	30,645	11,336
Alanina	884,401	44,919
Prolina	307,738	30,954
Cisteína	20,362	30,851
Tirosina	62,870	3,562
Valina	303,145	9,002
Metionina	4,985	4,471
Lisina	27,427	36,441
Isoleucina	86,394	17,285
Leucina	93,597	4,696
Fenilalanina	20,125	4,290
TOTAL	20644	3258

Tabla 8.6: Medida de aminoácidos libres extracelulares en un cultivo con alimentación conjunta de glicina (3.00mmol/h) y H₂O₂ (2.50mmol/h) a dos tiempos de cultivo diferentes

5. DISCUSIÓN

La adición de H₂O₂ en los casos estudiados produce inhibición en la síntesis de biomasa en mayor o menor medida con una mayor síntesis de GSH en todos ellos. Izawa et al. (1995) consideran que el incremento de la concentración intracelular de glutatión y el aumento en la actividad de los enzimas involucrados en el ciclo del glutatión, forma parte de la adaptación de *S. cerevisiae* frente al estrés provocado por peróxido de hidrógeno.

Si se añade peróxido de hidrógeno cuando se alimenta cisteína, la mayor inhibición en el crecimiento se produce si se alimentan ambos compuestos a la vez (porque cuando se añade H₂O₂ después, el crecimiento ya se ha inhibido debido a la cisteína y se encuentra en estado estacionario); para el caso de la glicina la mayor inhibición se produce si se alimenta H₂O₂ después de la glicina (a mayor velocidad de alimentación de H₂O₂ mayor inhibición); además si se alimenta H₂O₂ desde el comienzo del batch apenas se produce inhibición. Se puede decir que existe una relación proporcional entre la velocidad de alimentación de la fuente de estrés oxidativo y la inhibición en el crecimiento provocada en el microorganismo.

Con los resultados obtenidos del efecto del estrés oxidativo junto con alimentación de glicina, podemos decir que la adición de glicina da lugar a un flujo mayor hacia síntesis de histidina con respecto a la síntesis de glutatión cuando no existe limitación de nutrientes; se observa incremento en la concentración de histidina y disminución de la concentración específica de GSH; conforme la célula se acerca al estado de estrés nutricional se deja de acumular histidina, y cuando los nutrientes comienzan a ser limitantes se consume la histidina producida previamente y se incrementa la producción de GSH.

En la figura 8.1, que representa las rutas metabólicas en respuesta al H₂O₂, se observa que por un lado se induce la síntesis de glutatión y por otro lado se induce (entre otros) la síntesis de ribulosa 5-fosfato (PRPP); la síntesis de histidina se produce a partir de PRPP (ver apéndice D). Esto puede explicar que la adición de peróxido de hidrógeno en cultivos alimentados de glicina no provoque un menor flujo hacia síntesis de histidina aumentando el flujo hacia síntesis de GSH, sino que se seguirá sintetizando histidina (cuyo metabolismo está favorecido tanto por la adición de glicina como por la de H₂O₂) y, puesto que el H₂O₂ también modifica las rutas en las que se ve involucrada la glicina,

existirá un equilibrio entre ambos efectos que cambiará la degradación del GSH. De nuestros resultados vemos que disminuye dicha degradación.

6. REFERENCIAS

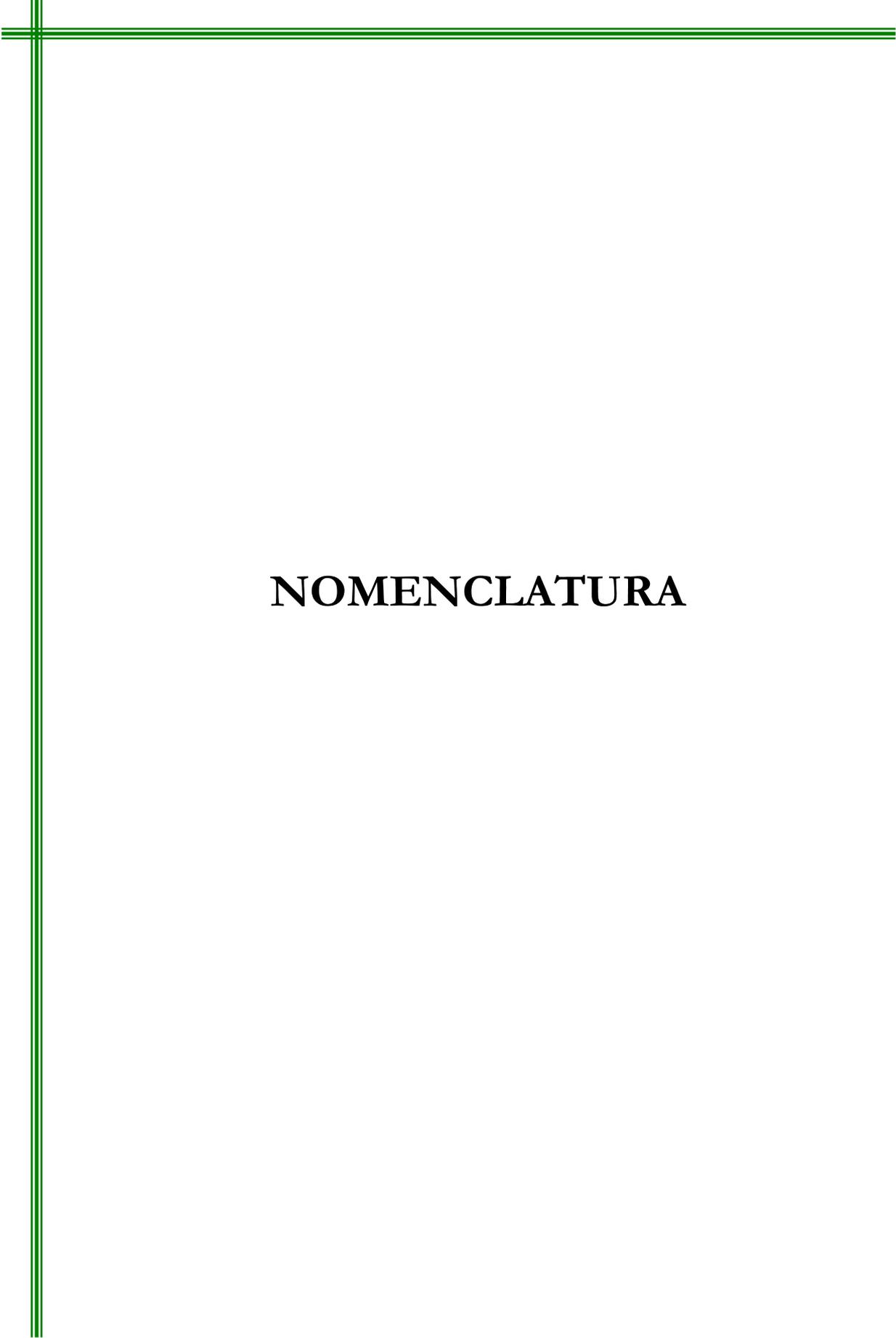
Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B. y Labarre J. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 273 (35): 22480-22489.

Izawa S., Inoue Y. y Kimura A. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters 368: 73-76.

Jamieson D.J. 1992. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. J. Bacteriol. 174 (20): 6678-6681.

Perrone G.G., Grant C.M. y Dawes I. 2005. Genetic and environmental factors influencing glutathione homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*.

Rodrigues-Pousada C., Nevitt T. y Menezes R. 2005. Review Article: The yeast stress response. Role of the Yap1 family of b-ZIP transcription factors. FEBS J. 272 (11): 2639-2647.



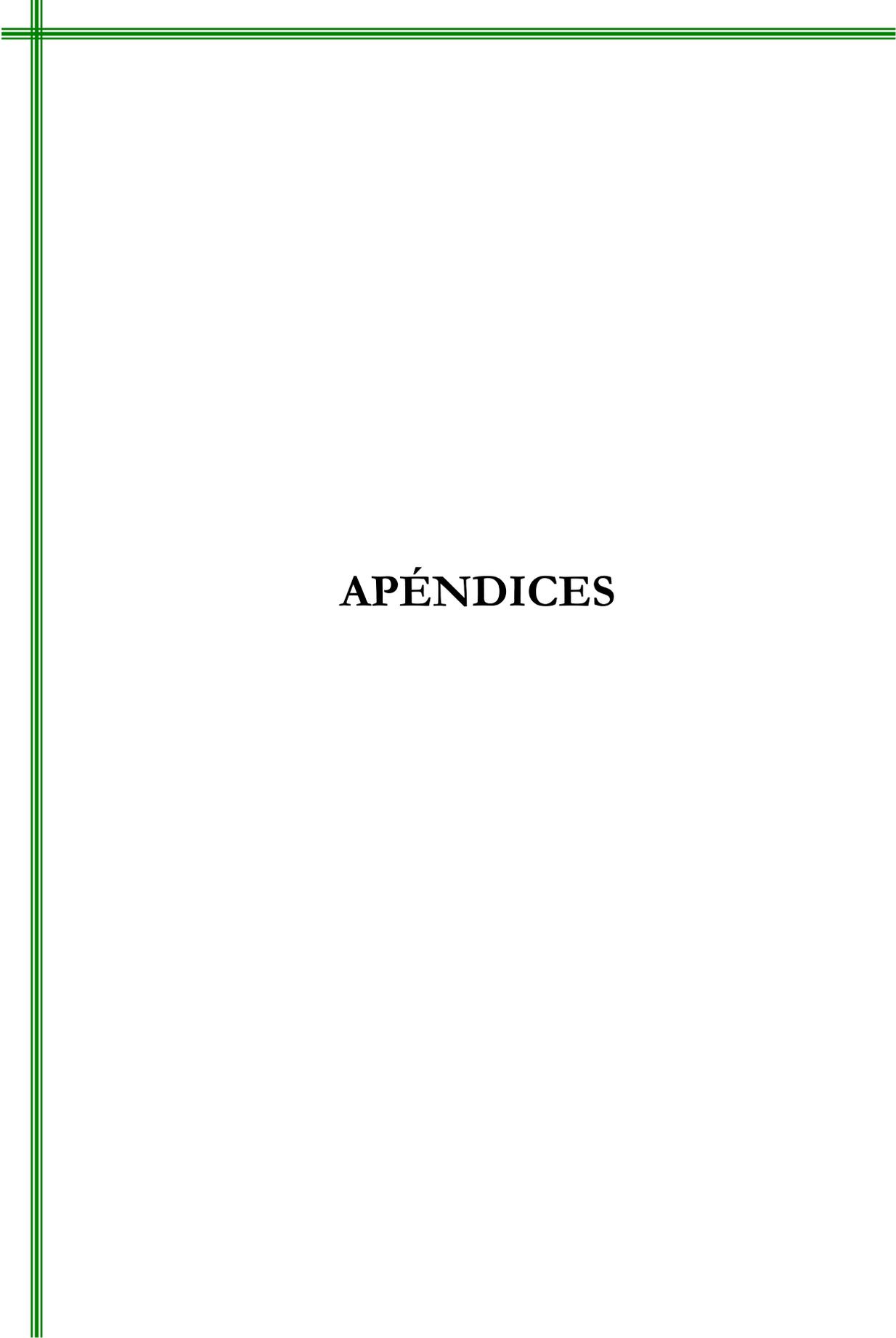
NOMENCLATURA

NOMENCLATURA

CYS:	Velocidad de alimentación de cisteína (mmol/h)
E:	Concentración de etanol (g/L) o moles de etanol
γ_N :	Coefficiente estequiométrico del nitrógeno
γ_S :	Coefficiente estequiométrico del azufre
gGC:	Concentración total de gamma-glutamylcisteína (mg/L) o concentración específica (mg/g)
GLI:	Velocidad de alimentación de glicina (mmol/h)
GLU:	Velocidad de alimentación de glutamato (mmol/h)
GSH:	Concentración total de glutatión reducido (mg/L) o concentración específica (mg/g). Las medidas de GSH llevadas a cabo en este trabajo se refieren a glutatión total (reducido + oxidado).
i:	número de muestra
μ :	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
m_{CO_2D} :	Caudal de dióxido de carbon desprendido (mol/h)
m_E :	Caudal molar de gas de entrada (mol/h)
m_{O_2A} :	Caudal de oxígeno absorbido (mol/h)
m_S :	Caudal molar de gas de salida (mol/h)
M_{CO_2} :	CO ₂ total desprendido a un determinado tiempo (mol)
M_{O_2} :	Oxígeno total absorbido a un determinado tiempo (mol)
N:	Agitación (r.p.m.)
O ₂ :	Fracción volumétrica de oxígeno en el gas de entrada o salida (%)
p_{O_2} :	Concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (%)
P:	Moles del metabolito P
P:	Presión (atm, mmHg, Pa,...)
PV_{H_2O} :	Presión de vapor de agua (Pa)
q_A :	Velocidad específica de consumo o de acumulación de azufre ($\mu\text{mol}/(\text{mmol h})$)
q_{CO_2} :	Velocidad específica de producción de CO ₂ (mol/(mol h))

q_{cys} :	Velocidad específica de consumo de cisteína ($\mu\text{mol}/(\text{mmol h})$)
q_{E} :	Caudal de gas de entrada (L/min)
q_{E} :	Velocidad específica de producción de etanol ($\text{mol}/(\text{mol h})$)
q_{GGC} :	Velocidad específica de producción de gamma-glutamilcisteína ($\text{mol}/(\text{mol h})$)
q_{gli} :	Velocidad específica de consumo de glicina ($\mu\text{mol}/(\text{mmol h})$)
q_{glu} :	Velocidad específica de consumo de glutamato ($\mu\text{mol}/(\text{mmol h})$)
q_{GSH} :	Velocidad específica de producción de glutatión ($\text{mol}/(\text{mol h})$)
q_{O_2} :	Velocidad específica de consumo de oxígeno ($\text{mol}/(\text{mol h})$)
q_{P} :	Velocidad específica de producción/consumo de un metabolito P ($\text{mol}/(\text{mol h})$)
q_{S} :	Velocidad específica de consumo de sacarosa ($\text{mol}/(\text{mol h})$)
Q_{cys} :	Velocidad de alimentación de cisteína (mmol/h)
Q_{gli} :	Velocidad de alimentación de glicina (mmol/h)
Q_{glu} :	Velocidad de alimentación de glutamato (mmol/h)
Q_{N} :	Velocidad de alimentación de sulfato amónico o de glutamato (mmol/h)
Q_{S} :	Velocidad de alimentación de sulfato amónico o de cisteína (mmol/h)
R:	Constante de los gases perfectos ($(\text{atm L})/(\text{°K mol})$)
RQ:	Coefficiente respiratorio ($\text{mol CO}_2 \text{ producido} / \text{mol O}_2 \text{ consumido}$)
S:	Moles de sustrato
t:	tiempo (h)
$t_{\text{adición}}$:	tiempo durante el cual se está alimentando algún sustrato al medio de cultivo (h)
T:	Temperatura (°K , °C)
V:	Volumen del medio de cultivo (L)
X:	Concentración de biomasa (g/L) o moles de biomasa
\bar{X} :	Valor promedio de biomasa (mol)
$y_{\text{CO}_2\text{E}}$:	Fracción molar de dióxido de carbono en el gas de entrada
$y_{\text{CO}_2\text{S}}$:	Fracción molar de dióxido de carbono en el gas de salida
$y_{\text{H}_2\text{O}\text{E}}$:	Fracción molar de agua en el gas de entrada
$y_{\text{H}_2\text{O}\text{S}}$:	Fracción molar de agua en el gas de salida

y_{N2E} :	Fracción molar de nitrógeno en el gas de entrada
y_{N2S} :	Fracción molar de nitrógeno en el gas de salida
y_{O2E} :	Fracción molar de oxígeno en el gas de entrada
y_{O2S} :	Fracción molar de oxígeno en el gas de salida
$Y_{A/B}$:	Rendimiento de metabolito A producido por metabolito B consumido (mol/mol)
$Y_{E/S}$:	Rendimiento de etanol producido por biomasa producida (mol/mol)
$Y_{gGC/A}$:	Rendimiento de dipéptido producido por azufre consumido (mmol/mmol)
Y_{GSHAS} :	Rendimiento de glutatión producido por azufre consumido (mmol/mmol)
$Y_{X/N}$:	Rendimiento de biomasa producida por nitrógeno consumido (mol/mol)
$Y_{X/A}$:	Rendimiento de biomasa producida por azufre consumido (mol/mmol)
$Y_{X/S}$:	Rendimiento de biomasa producida por sustrato consumido (mol/mol)



APÉNDICES

APÉNDICE A: METABOLISMO DE *S. cerevisiae* MT-32 CON DISTINTAS VELOCIDADES DE ALIMENTACIÓN DE SULFATO AMÓNICO

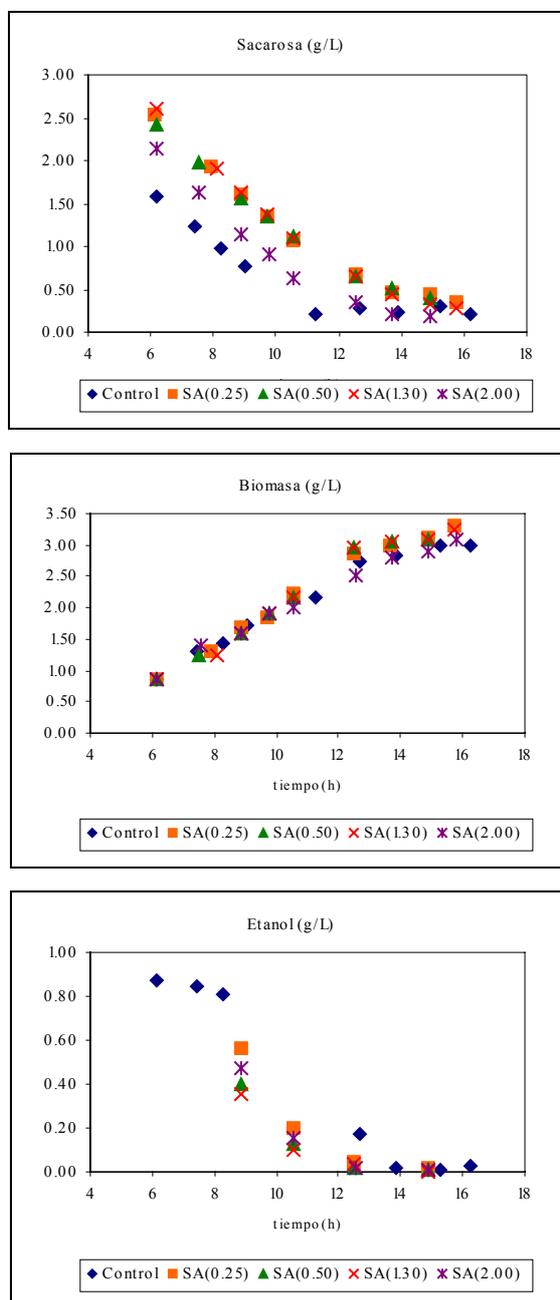


Figura A-1: Consumo de sacarosa, concentración de biomasa y consumo de etanol para distintos experimentos con alimentación de sulfato amónico en comparación al control

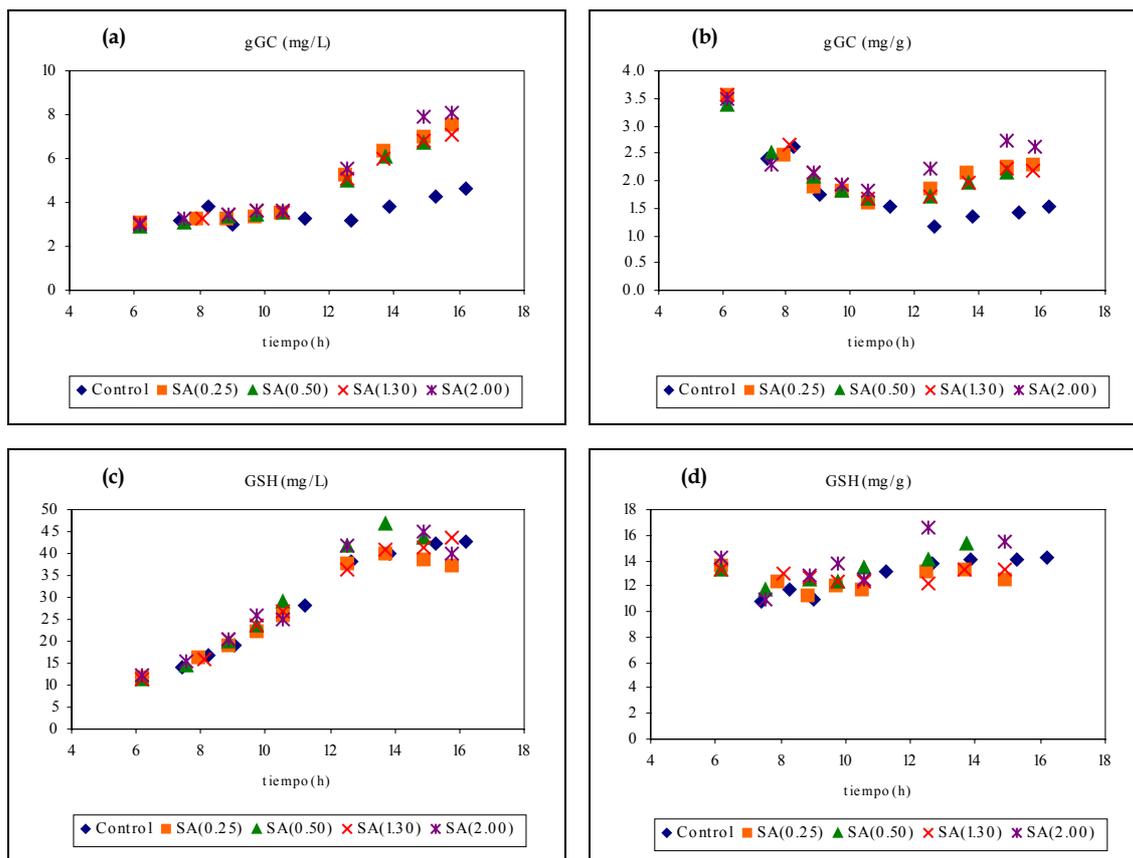
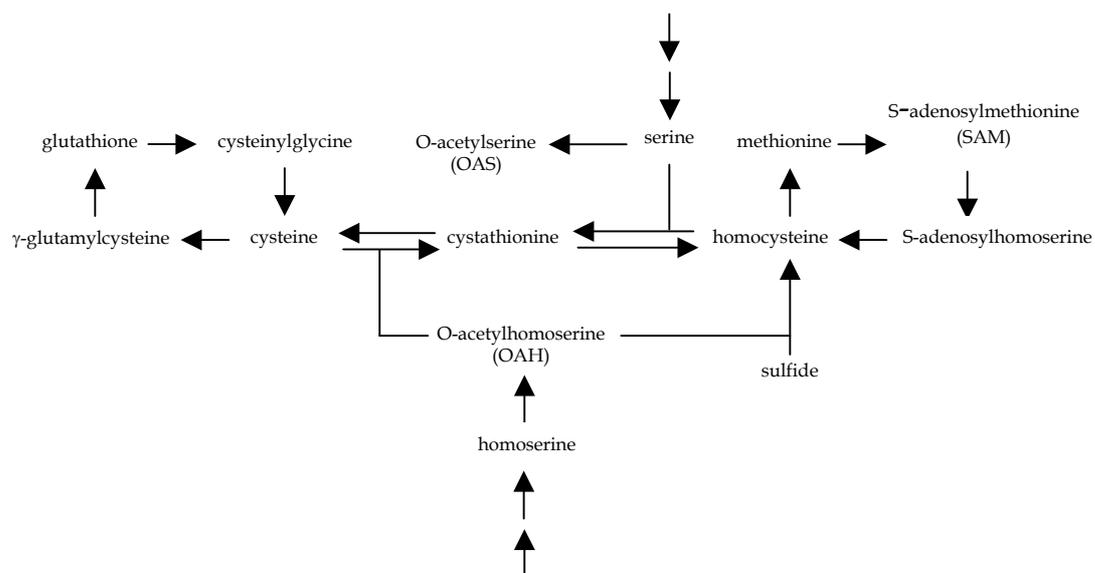
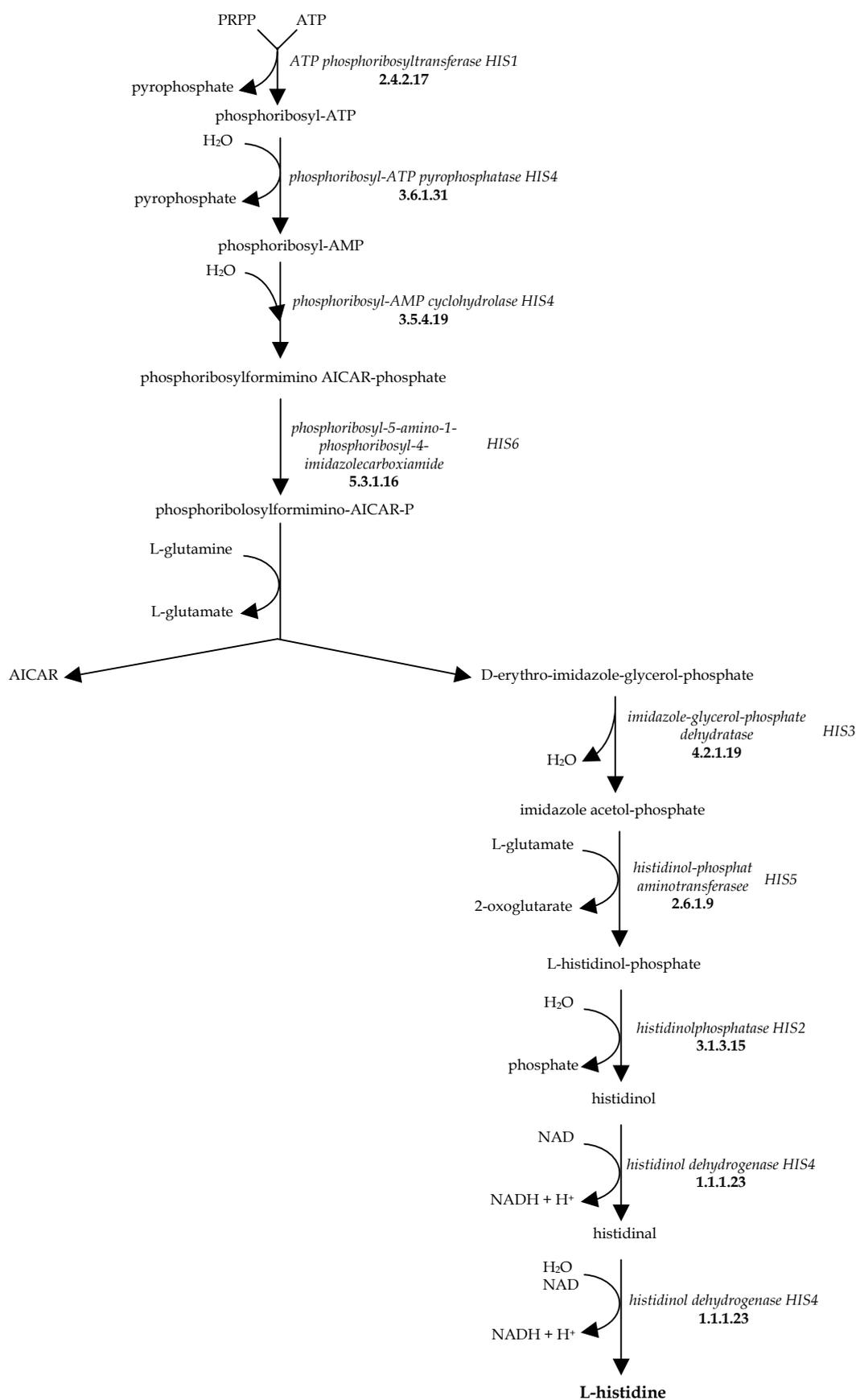


Figura A-2: Concentración total de dipéptido (a), específica de dipéptido (b), concentración total de glutatión (c) y específica de glutatión (d) para distintos experimentos con alimentación de sulfato amónico en comparación al control

APÉNDICE C: METABOLISMO DE AZUFRE EN *S. cerevisiae*
(Ono et al., 1999)



APÉNDICE D: RUTA DE SÍNTESIS DE HISTIDINA EN *S. cerevisiae*
(Yeast genome)





CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se podrían destacar del trabajo realizado serían las siguientes:

1. Del estudio de comparación de diferentes medios de cultivo, elegimos las melazas y el corn steep liquor o líquido de maceración del maíz como los componentes más apropiados para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* 1328. Estos sustratos presentan una serie de ventajas para el proceso de fermentación del microorganismo, como son: elevada velocidad de crecimiento, alto rendimiento de biomasa y sobre todo, es mucho más económico utilizar subproductos de otros procesos industriales en lugar de medios definidos puros como glucosa, fructosa o sacarosa.
2. Los cultivos desarrollados tanto en matraz como en biorreactor muestran que, ante condiciones de estrés nutricional, la cepa *Saccharomyces cerevisiae* MT-32 presenta una mayor respuesta en sus sistemas antioxidantes en comparación a *Saccharomyces cerevisiae* 1328; es decir, la concentración específica de glutatión es mayor. La operación en biorreactor optimiza el proceso de obtención de glutatión con respecto al cultivo en matraz, ya que el crecimiento en el caso de la cepa mutada es un 194% superior y la concentración total de glutatión presenta un incremento de un 130%.
3. El estudio de distintas fuentes de nitrógeno, muestra que el glutamato permite incrementar la concentración específica de dipéptido en mayor medida que el sulfato amónico, y además el glutamato puede ser utilizado para sintetizar biomasa.
4. De la comparación de distintas fuentes de azufre se concluye que los niveles iniciales de glutatión de la célula son lo suficientemente altos, por lo que no se activarán las rutas de consumo de sulfato, puesto que este proceso demanda mucha energía; es decir, el sulfato añadido no se consume y se acumula en el medio extracelular. Por el contrario, la alimentación de cisteína permite incrementar la concentración específica de dipéptido y glutatión.
5. Para estudiar diferentes procesos de producción de glutatión, se requiere conocer el modo de operación y el momento de adición a emplear. Se elige alimentar los aminoácidos cuando la velocidad de consumo de oxígeno, y, por tanto, la generación de radicales libres, es máxima; este punto coincide con la etapa de crecimiento correspondiente a la mitad de la fase exponencial. Los aminoácidos se alimentarán de manera continua y a una velocidad constante, porque se consiguen mayores concentraciones totales tanto de glutatión como de dipéptido en comparación a un modo de operación en pulsos, y además nos aseguramos que nunca haya limitación del aminoácido que corresponda.

6. Del análisis de flujos metabólicos se concluye que la máxima concentración total de glutatión se alcanza con un pequeño aporte de cisteína. De las concentraciones estudiadas únicamente la de 0.05mmol/h da lugar a una concentración de biomasa y de etanol igual a la del control, y con la máxima concentración específica de glutatión admitida por la célula. Con el objeto de optimizar el consumo de cisteína hacia la síntesis de dipéptido y glutatión el flujo hacia el metabolismo de azufre debe ser lo más bajo posible.

7. La estrategia de control que se ha decidido llevar a cabo es: alimentar cisteína a 0.05mmol/h según los resultados obtenidos del análisis de flujos, alimentar glutamato 3.00mmol/h para incrementar la formación de dipéptido y adicionar glicina a 0.03mmol/h para evitar posibles inhibiciones. Se ha conseguido optimizar el proceso con respecto a la alimentación de cisteína a la velocidad de 0.05mmol/h. En comparación al control se obtiene un incremento en la producción de biomasa de un 102%, en la concentración total de dipéptido de un 684%, de la concentración específica de dipéptido de un 484%, de la concentración total de glutatión de un 164% y de la concentración específica de glutatión de un 97%. El tiempo de cultivo necesario para alcanzar estos valores es de aproximadamente el doble con respecto al control, aunque para el mismo tiempo de cultivo todas las concentraciones siguen siendo mayores.

8. La alimentación de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo permite incrementar la concentración específica de glutatión. No obstante, se produce inhibición en el crecimiento que depende de la velocidad de alimentación empleada para la fuente de estrés oxidativo.

9. La máxima concentración específica de glutatión, un 120% superior al control, se alcanza mediante alimentación de cisteína y posterior adición de agua oxigenada a las velocidades de 0.55 y 5.00mmol/h respectivamente; la concentración específica de dipéptido también aumenta en un 83%, sin embargo se inhibe el crecimiento en un 33%. Si en posteriores trabajos se consiguiera incrementar la concentración de biomasa, ésta sería también una forma de operación interesante. Además, se podría seguir investigando en este camino de manera que consiguiéramos disminuir las concentraciones de cisteína y de peróxido de hidrógeno utilizadas.

El glutatión es uno de los antioxidantes intracelulares más importantes de los organismos, que además de actuar en la protección contra el daño oxidativo causado por los radicales libres, tiene numerosas funciones en la célula. El objetivo de la producción biotecnológica de glutatión es conseguir una elevada concentración del mismo. En este trabajo se define un proceso de producción de glutatión por fermentación, utilizando una cepa mutada de *Saccharomyces cerevisiae*, y mediante alimentación de sus aminoácidos constituyentes. El proceso se basa en el conocimiento que se desprende de la distribución de flujos metabólicos.

