

**Estudi del metabolisme central del carboni de
*Pichia pastoris***

Aina Solà i Rodrigo

TESI DOCTORAL

Realitzada sota la direcció de Pau Ferrer i Alegre i Francesc Sánchez i Ferrando
Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona Febrer 2004



Universitat Autònoma de Barcelona

PAU FERRER I ALEGRE, Investigador del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona i

FRANCESC SÁNCHEZ I FERRANDO, Catedràtic de Química Orgànica del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEN:

Que la llicenciada Aina Solà i Rodrigo ha dut a terme, sota la nostra direcció, el treball que amb el títol "Estudi del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris*" es presenta en aquesta memòria i que constitueix la seva Tesi per tal d'optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona dins el programa de doctorat de Biotecnologia.

I perquè consti presentem a l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona aquest treball.

Bellaterra, 9 de febrer de 2004.

Pau Ferrer i Alegre
Ferrando

Francesc Sánchez i

DECLARACIÓ D'OBJECCIÓ CIENTÍFICA

Com a membre de la comunitat científica, considero que el coneixement bàsic i la millora del benestar de les poblacions humanes i el seu entorn han de ser els objectius de la recerca científica. La investigació amb finalitats militars està en oberta contradicció amb aquests objectius, donat que està encaminada a desenvolupar noves armes que en el millor dels casos no s'utilitzaran i, en el pitjor, seran eines de destrucció. La R+D amb finalitats militars no té utilitat social, fomenta les guerres i la cursa d'armaments i consumeix recursos en detriment de la investigació civil. Per tot això, em comprometo a no participar en cap investigació que tingui una finalitat explícitament militar o estigui subvencionada amb fons dedicats a la recerca amb objectius militars.

aquesta tesi està dedicada al Pau Ferrer i al Paco Sánchez, sense els quals aquest treball no existiria i, probablement, la meva salut tampoc

Vull donar les gràcies al Pau i al Paco per tot (no em veig capaç de concretar), però sobretot per la seva passió científica, que finalment també se m'ha encomanat (una mica!). També vull agrair al Hannu Maaheimo la seva dedicació, la seva paciència i la seva acollida tan amistosa a Helsinki. A en Thomas Szyperski vull agrair-li l'oportunitat d'anar a Buffalo a treballar al seu laboratori i descobrir la ressonància magnètica nuclear.

A totes les amigues i amics del departament amb qui he treballat tan a gust. A totes les amigues i amics d'arreu del món i a la meua família. M'ha costat, però tots plegats m'heu ajudat a arribar a aquest final!

ÍNDIX

Índex

Abreviatures.....	3
Preàmbul	7
A) Què és la biotecnologia?.....	7
B) Camps d'aplicació de la biotecnologia.....	8
C) Percepció social de la biotecnologia.....	10
1. Introducció	15
1.1. Cultius de microorganismes.....	15
1.1.1. Disseny de bioreactors i estratègies de cultiu.....	15
1.2. Metabolisme cel·lular.....	21
1.2.1 Regulació de les vies metabòliques.....	22
1.3.Llevats.....	24
1.3.1. Llevats metilotròfics.....	24
1.4. Producció de proteïnes heteròlogues en <i>Pichia pastoris</i>	26
1.4.1. Producció de proteïnes heteròlogues en llevats.....	26
1.4.2. Sistema d'expressió de <i>Pichia pastoris</i>	27
1.4.3. Promotor de la AOX1 en <i>Pichia pastoris</i>	29
1.4.4. Vectors d'expressió en <i>Pichia pastoris</i> ,.....	31
1.5. Estratègies de cultiu a elevada densitat cel·lular.....	35
1.6.Lipases.....	39
1.6.1. Característiques generals de les lipases.....	39
1.6.2. Aplicacions de les lipases.....	40
1.6.3. Característiques funcionals de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> i aplicacions descrites.....	41

1.7. Metabolisme central del carboni dels llevats.....	44
1.7.1. Metabolisme del metanol en els llevats metilotròfics.....	44
1.7.2. Metabolisme energètic en llevats metilotròfics.....	44
1.7.3. Metabolisme central del carboni en llevats.....	48
1.7.4. Gluconeogènesi i cicle del glioxilat.....	55
1.7.5. Repressió i inactivació per catabolit.....	58
1.7.6. Utilització de la glicerina pels llevats.....	60
1.7.7. Transportadors de metabòlits a través de les membranes mitocondrials i del peroxisoma.....	60
1.7.8. Síntesi dels aminoàcids.....	62
1.8. RMN de ¹³ C i estudis de metabolisme.....	63
1.8.1. Introducció general i històrica.....	63
1.8.2. Situació actual: metodologia RMN.....	64
1.8.3. Metodologia ¹³ C-RMN i ponderació dels fluxos metabòlics en recerca biotecnològica.....	64
1.8.4. Metodologia METAFoR (Metabolic Flux Ratio Analysis).....	66
1.8.5. Biosíntesi d'aminoàcids: mètode SZYPERSKI.....	67
1.8.6. Biosíntesi d'aminoàcids: millores recents.....	69
1.8.7. Altres tècniques per a la determinació de fluxos metabòlics en recerca biotecnològica.....	70
2. Objectius de la tesi.....	75
2.1. Antecedents del grup de recerca sobre lipases del Departament d'Enginyeria Química de la UAB.....	75
2.2. Context en què s'emmarca el present treball.....	76
2.3. Objectius del present treball.....	76
2.4. Plantejament del present treball.....	77

3. Materials i mètodes	81
3.1. soques i vectors.....	81
3.1.1. soques i vectors.....	81
3.1.2. manteniment de soques.....	82
3.1.3. transformació.....	82
3.2. cultius.....	84
3.2.1. cultius en medi sòlid (placa de petri).....	84
3.2.2. cultius en bioreactors i condicions d'operació (<i>batch</i> i continus).....	84
3.3. mètodes analítics.....	87
3.3.1. anàlisi de substrats.....	87
▪ mesura de glicerina per HPLC	
▪ mesura de NH ₄ ⁺	
▪ mesura de metanol per GC	
▪ glucosa amb YSI i HPLC	
3.3.2. anàlisi de productes.....	88
▪ mesura d'activitat lipasa	
▪ anàlisi de proteïnes	
▪ recollida de gasos amb masses	
3.3.3. anàlisi de la biomassa.....	88
▪ mesura de biomassa (OD i pes sec)	
▪ anàlisi elemental de les cèl·lules	
▪ cendres	
3.3.4. anàlisi de l'activitat de l'ICL.....	89
3.4. Derivatització i separació dels aminoàcids.....	90
3.5. Metodologia RMN i anàlisi METAFoR.....	91
3.5.1. Marcatge ¹³ C fraccional biosintèticament dirigit (preparació de les mostres cultiu per a anàlisi per RMN).....	91
3.5.2. Espectroscòpia RMN i anàlisi de dades.....	93
3.5.3. Equacions de probabilitat per al càlcul dels fragmentòmers.	94

3.5.4. Adaptació del Mètode METAFoR als cultius amb alimentació simultània de glicerina i metanol amb marcatge únic de glicerina.....	110
3.6. Determinació dels paràmetres cinètics dels cultius.....	117
4. Resultats.....	123
4.1 Estudi de les diferents soques i vectors d'expressió.....	123
4.1.1. Interès de cada una de les soques.....	124
4.1.2. Selecció de fonts de carboni.....	125
4.2. Estudi del creixement i producció de lipasa, diferents fonts de carboni, <i>batchos</i> , inhibició de la producció i toxicitat del metanol.....	127
4.2.1. Estudi del creixement de <i>Pichia pastoris</i> X-33 sobre els substrats seleccionats.....	127
4.2.2. Càlcul dels rendiments de <i>Pichia pastoris</i> X-33 sobre els diferents substrats.....	132
4.3. Estudi del metabolisme central del carboni de <i>Pichia pastoris</i> amb glicerina com a única font de carboni.....	133
4.3.1. Cultius continus amb glicerina com a única font de carboni..	133
4.3.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats.....	133
4.3.3. Anàlisi METAFoR dels resultats.....	135
4.3.4. Conclusions.....	156
4.4. Continu amb glucosa com a única font de carboni	158
4.4.1. Característiques del cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni.....	158
4.4.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats.....	159
4.4.3. Anàlisi METAFoR dels resultats.....	160
4.4.4. Comparació de les dades obtingudes per als cultius continus amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni i altres treballs realitzats prèviament.....	171

4.5. Cultius continus de <i>Pichia pastoris</i> amb barreja de glicerina i metanol	175
4.5.1. Marcatge únic de la glicerina.....	179
4.5.1.1. Característiques dels cultius continus realitzats.....	179
4.5.1.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats.....	180
4.5.1.3. Anàlisi METAFoR dels resultats.....	196
4.5.2. Marcatge simultani de la glicerina i el metanol.....	199
4.5.2.1. Característiques dels cultius continus realitzats.....	199
4.5.2.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats.....	201
4.5.2.3. Anàlisi METAFoR dels resultats.....	208
4.6. Anàlisi de les dades fisiològiques.....	220
4.6.1 Altres cultius continus.....	220
4.6.1.1 Cultius amb metanol com a única font de carboni....	220
4.6.1.2 Cultiu amb glicerina com a única font de carboni (sense marcatge).....	221
4.6.2 Anàlisi comparatiu de les dades fisiològiques obtingudes en els cultius continus.....	222
4.7. Anàlisi de la senyal RMN del carboni δ^2 de la Histidina.....	227
5. Conclusions.....	231
6. Apèndix.....	235
6.1. Definicions del mètode METAFoR.....	235
6.1.1. Definició de les probabilitats.....	235
6.1.2. Definició de la variable F_m	237
6.1.3. Deducció de les equacions de probabilitat.....	239
6.2. Composició de la YNB (Difco).....	254
6.3. Calibrat OD/pes sec.....	255

6.4. Taules d'intensitats dels multiplets i fragmentòmers.....	256
6.4.1. Cultiu continu amb glicerina com a única font de carboni a D 0.05h ⁻¹	256
6.4.2. Cultiu continu amb glicerina com a única font de carboni a D 0.16h ⁻¹	257
6.4.3. Cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni a D 0.16h ⁻¹	259
6.4.4. Cultius continus amb glicerina i metanol com a fonts de carboni i marcatge simultani amb dos substrats.....	260
6.5. Comprovació de les igualtats i valors coneguts dels fragmentòmers (apartat 4.5.2.3 dels Resultats).....	271
6.5.1. Comprovació de les igualtats conegudes dels fragmentòmers	271
6.5.2. Comprovació dels valors coneguts dels fragmentòmers.....	272
6.6. Seccions transversals al llarg de l'eix $\omega_1(^{13}\text{C})$ dels espectres 2D.....	278
6.7. Document Matlab per al càlcul dels fragmentòmers (apartat 4.5.1.).....	279
6.8. Figures del metabolisme.....	282
6.8.1. Glicòlisi.....	282
6.8.2. Ruta de la Pentosa fosfat.....	285
6.8.3. Cicle TCA.....	289
6.8.4. Síntesi d'aminoàcids.....	289
7. Bibliografia.....	297
Reflexió final.....	312

ABREVIATURES

Abreviatures emprades en aquest treball

3PG	3-fosfoglicerat
AcCoA	Acetil Coenzim A
ACS	acetil coenzim A sintasa
AOX	alcohol oxidasa
BDF	marcatge fraccional biosintèticament dirigit
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAT	carnitina acetiltransferasa
CER	<i>carbon dioxide evolution rate</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
D	velocitat de dilució
DAS	dihidroxiacetona sintasa
DHA	dihidroxiacetona
DHAP	dihidroxiacetona fosfat
DTT	dithiothreitol
E4P	eritrosa-4-fosfat
ED	ruta d'Entner-Doudoroff
F6P	fructosa-6-fosfat
FBP	fructosa 1,6-difosfat
FbPase	fructosa-1,6-difosfatasa
FCAL	<i>flux ratios from correlated amino acid ¹³C-labelling patterns</i>
FLD	formaldehid deshidrogenasa
FMD	formiat deshidrogenasa
Fum	fumarat
GAP	gliceraldehid-3-fosfat
GC	cromatografia de gasos
GCV	<i>Glycine cleavage</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
Mal	malat
MCA	anàlisi del control metabòlic
METAFor	<i>Metabolic Flux Ratio</i>
MFA	Anàlisi del Flux Metabòlic
MFS	formiat de metil sintasa
MID	distribució massica d'isotòmers
MS	espectroscòpia de masses
Mut ⁺	<i>methanol utilisation plus</i>
Mut ^S	<i>methanol utilisation slow</i>
Mut ⁻	<i>methanol utilisation minus</i>
n.d.	dada no determinada o no disponible
OAA	oxalacetat
OD	densitat òptica
OUR	<i>oxygen uptake rate</i>
OxGlu	2-oxoglutarat
PDH	complex de la piruvat deshidrogenasa
PEP	fosfoenolpiruvat
PEPCK	fosfoenolpiruvat carboxiquinasa
PPP	ruta de la pentosa fosfat

R5P	ribosa-5-fosfat
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
RQ	<i>respiratory quotient</i>
ROL	lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>
S7P	sedoheptulosa-7-fosfat
SHMT	serina hidroximetiltransferasa
Succ	succinat
TCA	cicle dels àcids tricarboxílics
TK	transcetolasa
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
XuMP	xilulosa 5-fosfat
μ	velocitat específica de creixement de biomassa

Prefixos davant d'aminoàcids i altres metabòlits

mt-	mitocondrial
cyt-	citosòlic

PREÀMBUL

PREÀMBUL¹

Introducció a la Biotecnologia

A) Què és la Biotecnologia?

(Camps, V., Giralt, E., Egozcue, J., editors, 2001)

La Biotecnologia es defineix com l'aplicació dels principis de la ciència i de l'enginyeria al processament de materials mitjançant agents biològics per tal d'obtenir béns i serveis. Es tracta d'una ciència interdisciplinària perquè requereix coneixements tant de biologia (biologia cel·lular, bioquímica, microbiologia...), enginyeria (disseny de reactors, control i instrumentació...) i química (tècniques analítiques...).

La biotecnologia, entesa com un conjunt de tècniques que permeten l'aplicació de les propietats dels éssers vius per produir béns i serveis, és molt antiga. La capacitat dels microorganismes per fermentar aliments afavorint la seva transformació i conservació ha estat usada des dels principis de la humanitat. La possibilitat de controlar aquests processos per mètodes científics avança i progressa al llarg del segle XIX amb la figura de Louis Pasteur (Muñoz, E., 2001).

La història de la biotecnologia pot dividir-se en tres grans etapes: la primera, d'una vintena o més de segles, des dels orígens de la cultura de l'home fins al segle XVIII; la segona, des dels principis de la revolució científica fins a la maduració de la Bioquímica i l'aparició de la Biologia Molecular; i la tercera, que ocupa les tres o quatre últimes dècades del segle XX (García Barreno, P., *et al.*, 2000).

Els primers homes, doncs, ja es van trobar amb la necessitat d'afrontar les exigències de l'alimentació, la protecció front a la intempèrie i la defensa d'altres espècies animals. Amb la primera revolució, la revolució cultural del Neolític, arriba una gran transformació, amb la domesticació dels animals, el pas de la simple recol·lecció a la producció agrícola i l'apostament estable i sedentari de petites poblacions en el territori. Aquests canvis, fa deu o dotze mil anys, van forçar les arts culinàries, multiplicaren els instruments dedicats a la transformació i conservació dels aliments, i es vincularen a diverses pràctiques biotecnològiques. Més properes, les grans civilitzacions de l'antiguitat, encara uns quants milenis abans de Crist, van deixar documents, pintures, tradicions i mites sobre les fermentacions usades en l'obtenció del pa, el vi i la cervesa. Els més famosos colorants de l'Antic Testament foren d'origen animal i, utilitzats en la tinció de la llana, van assolir durant segles una gran importància en l'economia i el comerç.

Després de la revolució neolítica, no va haver cap altre canvi tan important en l'actitud cultural de la humanitat com el que aconseguí la revolució científica que va dur a terme Lavoisier. La interpretació de la combustió, la respiració i la producció de calor, basada en la nova teoria de l'oxigen, va trastocar el pensament científic i que provocà

¹ **Nota preliminar sobre la Introducció.** A causa del caràcter interdisciplinari d'aquest treball s'ha cregut convenient recollir a la Introducció una sèrie de conceptes i tecnicismes bàsics de les diferents disciplines implicades. Les fonts utilitzades a aquest fi s'indiquen convenientment i en elles es troben les referències emprades pels autors i que s'han obviat d'incloure a la bibliografia final d'aquest treball. Tanmateix, sí que es citen directament treballs específics que complementen les referències bàsiques.

l'immediat desenvolupament de la Química i de la Biologia. A la vegada, les fermentacions, l'entrellat de les quals tant havien desesperat a la humanitat, van poder explicar-se segons la seva naturalesa biològica i les transformacions químiques. El gran debat sobre la naturalesa química de les transformacions va estar sempre en el rerefons que va encadenar la Il·lustració amb la Revolució Industrial del segle XIX i, sobretot, va tenir en Pasteur el suport biològic en què sustentava la passarel·la que Lavoisier havia llençat un segle abans.

La biotecnologia de la primera meitat del segle XIX es fonamenta, sobretot, en les propietats dels enzims i persegueix, principalment, millores en els aliments. Adquireixen importància els factors econòmics i l'anàlisi dels riscos i beneficis dona peu a decisions polítiques no sempre vinculades a les qüestions científiques.

Així doncs, la biotecnologia pot definir-se acadèmicament com l'ús i la manipulació d'organismes vius, o de substàncies obtingudes a partir d'aquests, per tal d'obtenir productes útils per a l'ésser humà. Tot i que l'home ha utilitzat aquestes tècniques des de fa alguns milers d'anys, els avenços científics i els canvis en l'organització social i econòmica que s'han produït en els darrers cent anys les han transformades radicalment. Com s'ha dit, en concret el coneixement de les bases genètiques de la vida, així com la capacitat adquirida per modificar-les de forma intencionada i dirigida mitjançant el recurs a diverses tècniques d'enginyeria genètica, han augmentat d'una manera extraordinària el potencial d'aquestes tècniques. Paral·lelament, la biotecnologia ha esdevingut un negoci amb grans possibilitats.

B) Sectors d'aplicació de la Biotecnologia

Els camps de la biotecnologia abasten diversos sectors com ara la salut (diagnòstic, tractament, producció de fàrmacs, etc.), la millora animal i vegetal amb aplicacions en el sector alimentari o industrial (producció, resistència a plagues, etc.), el medi ambient (biorremediació), la recerca militar i altres.

Processos industrials

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

La indústria química és una de les més grans indústries manufactureres dels Estats Units i Europa. La biotecnologia hi exerceix un paper limitat. Es podria preveure que la major utilització de la biotecnologia per part de la indústria química estarà relacionada amb l'expansió del sector cap a la indústria farmacèutica i en l'agricultura. Aquesta situació reflexa la inflexió d'aquesta indústria des de la producció de matèries a granel fins a actuacions intenses en investigació i dirigides a productes d'alt valor afegit (Muñoz, E., 2001). Així doncs, en aquest sector de la biotecnologia s'inclourien els processos de producció de productes d'alt valor afegit –proteïnes bàsicament- i l'ús d'enzims en processos de química fina/*green chemistry*, com per exemple l'ús de lipases.

Normalment, les soques naturals de microorganismes tenen una capacitat limitada per a la producció d'altres concentracions de metabòlits, cosa que les fa poc interessants des del punt de vista industrial. És per aquest motiu que, des de l'inici de la microbiologia industrial, s'ha buscat, a més de la millora de la productivitat, també l'adquisició de noves característiques que permeten, per exemple, la utilització de substrats diferents, el

creixement a una temperatura diferent, o la producció d'una substància completament nova, aliena per a la cèl·lula.

L'aplicació dels coneixements microbiològics i de l'enginyeria bioquímica permet l'optimització de les condicions que envolten el procés de fermentació, però té com a límit la dotació genètica de cada microorganisme i la seva expressió en les condicions de fermentació.

Biotecnologia Militar

(García Barreno, P., *et al.*, 2000)

Malgrat els diferents acords i tractats que al llarg de la història s'han signat per tal d'evitar la proliferació i ús de l'armament biològic, la biotecnologia militar mai ha deixat d'existir. Aquest és, segurament, el camp de la Biotecnologia més desconegut i per aquest motiu en aquest apartat de la Introducció s'hi dedica una atenció especial, malgrat sortir completament fora de l'àmbit temàtic del present treball.

Ja en 1899 i 1907 es va prohibir l'ús militar d'agents patògens per les Convencions Internacionals de La Haia, i en 1925, després de la Primera Guerra Mundial, el Protocol de Ginebra va prohibir l'ús militar de gasos asfixiants així com dels mètodes bacteriològics. L'any 1972, data en què es va signar la Convenció sobre Armament Biològic, coincidí amb l'inici dels experiments sobre manipulació genètica i la recuperació per part dels Estats Units de l'interès militar per l'armament biològic.

Així, el potencial ofensiu dels diferents projectes biotecnològics patrocinats pel Departament de Defensa dels Estats Units es van agrupar en: agents biològics insensibles a vacunes, agents biològics que emmascaren el diagnòstic, supertoxines, dispersió mitjançant aerosols dels agents biològics, vectors biològics d'aquests agents, agents biològics resistents a medicaments, agents ètnicament selectius, armes bioquímiques, i increment de la capacitat de producció de toxines per les armes biològiques. Des del costat defensiu, els projectes van contemplar el desenvolupament de vacunes, aïllament i caracterització d'antígens tòxics, diagnòstic ultrasensible, i desenvolupament i ús d'antibiòtics. D'aquesta manera durant els anys vuitanta el Programa d'Investigació de Defensa Biològica dels Estats Units va posar en marxa varies dotzenes de projectes basats en la tecnologia del DNA-recombinant, per a l'exèrcit, la marina i les forces aèries.

La revisió de la Convenció sobre Armament Biològic de 1980 va introduir escasses modificacions. Era l'època dels incidents soviètico-americans amb motiu de l'escapament d'espores d'àntrax i de l'ús de micotoxines a l'Afganistan i altres països. La revisió de 1986 es va fer ressò dels avenços de la biotecnologia, declarant "la seva inequívoca aplicació a tots els microbis tant naturals com creats artificialment, a qualsevol tipus d'agents biològics i toxines, qualsevol que sigui el seu origen o mètode de producció". La revisió de 1991 va estar marcada pels successos de la Guerra del Golf i establia noves mesures, entre altres les de notificar els programes biològics ofensius i defensius des de 1946; declarar els mitjans de producció de vacunes front a malalties humanes, i la creació d'un grup d'experts amb l'objectiu d'identificar les mesures de verificació des d'un punt de vista científic i tècnic.

En 1989 un grup de 800 científics va firmar una declaració oposant-se a l'ús dels progressos de la ciència per al desenvolupament d'armes químiques i biològiques. El text diu el següent: “ Els sotasignants, biòlegs i químics, ens oposedem a l'ús de la nostra investigació amb finalitats militars. Els ràpids avenços de la biotecnologia han catalitzat l'interès creixent per les armes químiques i biològiques en molts països i en el possible desenvolupament de nous agents de guerra. I creiem que aquest fet pot conduir a una altra carrera d'armaments, sense oblidar que la investigació biomèdica ha de conduir al suport i no a la destrucció de la vida. Demanem, per tant, la no implicació conscient en la investigació que condueixi al desenvolupament d'agents de guerra químics o biològics”.

Actualment, els Estats Units són el primer productor i subministrador mundial d'armament. Això no seria possible si no fossin, també, el país que té el pressupost més elevat en R+D militar. A partir de l'11-S, l'anomenada “guerra contra el terrorisme” ha tingut també impacte sobre el pressupost de R+D, amb una marcada tendència a traspasar prioritats des del camp de la recerca civil a la recerca militar. Els augments més importants, i aquells més directament relacionats amb l'amenaça del terrorisme, són d'un 700% en R+D per combatre el bioterrorisme (2400 milions de dòlars), un 19% per a tecnologia espacial (3400 milions) i un 17% en nanotecnologia (679 milions) (SIPRI, 2001). La R+D en nanotecnologia té com a objectiu el desenvolupament de nous mètodes per a la detecció d'agents biològics, químics, radiològics i explosius, i de protecció sobre aquests mateixos (SIPRI, 2001). Així, el que normalment no és té en compte, és que la majoria d'armes nuclears, biològiques i químiques (NBQ o, últimament, “armes de destrucció massiva”, per error comparatiu amb les armes convencionals, que també provoquen destruccions massives) són producte del gran esforç en R+D militar de les grans potències i, molt especialment, dels EEUU durant els últims setanta anys. En l'actualitat científics estatunidencs estan seqüenciant el genoma de diversos patògens (*Brucella suis*, *Burkholderia mallei*, *Clostridium perfringens*, *Coxiella burnetti*, *Franciscella tularensis*, i *Rickettsia typhi*) en un projecte finançat per la Defense Advanced Research Projects Agency (DARPA), que també subvenciona la investigació en ortopoxvirus (DARPA, <http://www.darpa.mil>). A més, entre els projectes que s'han dut a terme en els últims anys en laboratoris militars estatunidencs i que s'han desclassificat, figuren la investigació en soques resistents del virus A de la grip, la producció per fermentació de toxina botulínica, l'avaluació del potencial de mosques i mosquits com vectors de l'àntrax, la viabilitat a llarg termini de liofilitzats de *Yersinia pestis*, l'estudi dels efectes de gasos neurotòxics (GA, GB, GD, GF i VX) en diferents àrees del cervell i molts més projectes relacionats amb la guerra química i bacteriològica (Defense Technical Information Center, http://stinet.dtic.mil/str/tr_fields.html)(Molina, M.A., www.prouinvestigacionmilitar.org).

C) Percepció social de la Biotecnologia

(Camps, V., Giralt, E., Egozcue, J., editors, 2001)

Malgrat la seva diversitat i importància, la majoria dels desenvolupaments i guanys de l'activitat científica i tecnològica són encara una incògnita per a una gran part dels ciutadans, independentment del seu nivell d'educació i formació. Aquest desconeixement suposa un obstacle per a la societat democràtica, que sovint s'ha d'enfrontar a decisions importants sobre aquestes temes, com per exemple la clonació d'animals, els aliments transgènics, la producció d'energia, el canvi climàtic, la gestió dels recursos naturals, etc (Fundació per la Pau, 2002).

Està clar que els avenços de la ciència en el camp de la biotecnologia són tan grans i es produeixen tan ràpidament que cada vegada calen més tecnicismes per explicar-los amb propietat. Això resulta especialment greu quan afecta a conceptes molt bàsics com els gens o l'herència.

El problema principal es redueix moltes vegades a una qüestió de confiança en la persona, mitjà o institució que és al darrere de la informació que es facilita. La informació és, d'altra banda, un negoci important, i per això els mitjans de comunicació solen tendir a magnificar alguns dels aspectes de major impacte de la biotecnologia, tant en les informacions sobre els avenços i possibilitats de futur, sovint explorades creant falses expectatives, com en els possibles problemes, difonent notícies i generalitzacions alarmistes i poc fonamentades. Al final, es genera una desconfiança i un escepticisme sobre el valor de la informació en sí. Tot i així, és cert que hi ha moltes més causes que influeixen en el posicionament d'una persona o d'un col·lectiu davant la biotecnologia i que no depenen del coneixement científic o de la informació detallada sobre el tema, sinó més aviat són conseqüència de plantejaments o ideologies amb interessos de molts tipus, que bàsicament podrien ser econòmics i polítics.

En primer lloc, hi ha una sèrie de plantejaments ideològics, religiosos o no, sobre la naturalesa humana i la seva relació amb la natura i especialment amb el fenomen de la vida. Es basen en una visió filosòfica i crítica del nostre món excessivament tecnificat, que és capaç de desxifrar el genoma humà i és incapaç d'aconseguir un mínim respecte cap als drets fonamentals de les persones i dels pobles, que hauria de ser l'objectiu prioritari.

De vegades no es tracta tant de contraposar la natura a la tècnica com d'evidenciar la contradicció d'aquesta coexistència. Mentre hi ha gent que es dedica a desxifrar el genoma humà i buscar com aquest coneixement pot millorar la vida de les persones, la major part de la humanitat viu sota condicions de pobresa absoluta.

Convé tenir present que, per exemple, l'aplicació de la biotecnologia a l'alimentació humana s'ha centrat més en resoldre problemes de producció que no afecten directament als consumidors i, en canvi, no ha desenvolupat altres línies més dirigides a beneficiar-los directament, com ara la producció d'aliments terapèutics o amb qualitats que els facin desitjables. D'aquesta manera, les persones en general no volen córrer riscos innecessaris a canvi d'uns avantatges que no els afecten directament.

A més, de vegades es dediquen esforços i recursos a la investigació i millora en productes alimentaris amb característiques noves però que no aporten una millora qualitativa del producte sinó que responen a una operació de *marketing* per competir amb productes semblants i augmentar la seva venda. Tot això quan en altres llocs del món l'accés a l'alimentació bàsica no està assegurada.

En segon lloc, hi ha els interessos econòmics que també influeixen en aquestes valoracions i, per tant, cal tenir-los presents. Per exemple, els interessos i les expectatives econòmiques creades per les grans empreses que han estat a l'avantguarda de la producció i distribució de les plantes transgèniques. El comportament general no ha estat diferent del que es dona en altres sectors industrials, però és cert que la societat el percep com una forma de prepotència i imposició que predisposa les persones en

contra. Les contínues fusions que es donen també en aquest àmbit ajuden a alertar davant les pràctiques freqüents típiques dels monopolis, com són la manca de transparència i la imposició dels preus del mercat. També hi ha qui veu amb preocupació aquests llaços de la biotecnologia amb empreses multinacionals molt poderoses de les quals no tenen clar si, donat el cas, sabran anteposar les precaucions bàsiques necessàries als seus interessos econòmics.

També en el cas dels científics pot donar-se una situació similar d'apriorisme a favor de la pròpia investigació, condicionada pels diners que reben per investigar, tot i que normalment no es tracta de diners propis per viure sinó de diners per poder desenvolupar la tasca professional.

Les conseqüències d'aquesta percepció social de la biotecnologia són varies. El fet que algunes de les seves aplicacions hagin despertat reaccions contràries en alguns sectors de la societat està conduint a una manca de suport a la investigació pública i al desenvolupament en aquest camp que pot tenir diferents conseqüències. La ciència és la nostra eina principal per analitzar i comprendre el món que ens envolta, i el progrés científic ha influït profundament en l'evolució de les societats occidentals. Els avenços en genètica molecular d'aquests darrers cinquanta anys han canviat la nostra visió de l'ésser humà i de la seva interacció amb el món. La pèrdua de confiança en la ciència com a forma de captar la realitat pot suposar el renaixement de formes menys racionals de relacionar-se amb el món que posin en perill avenços culturals i socials essencials en les societats. Molts dels avenços de la humanitat han estat possibles gràcies a la ciència, tot i que la seva aplicació ha estat també causa d'alguns dels seus fracassos més grans. Renunciar totalment a la biotecnologia equivaldria a renunciar en bona mesura al progrés en camps tan variats com la medicina, l'agricultura o la indústria.

Donat que, com ja s'ha indicat, la percepció social no és homogènia per a totes les aplicacions de la biotecnologia, les conseqüències s'estan deixant sentir de forma diferent en les seves diferents àrees. Tanmateix, ja sigui perquè la percepció social és negativa (en el cas de les aplicacions a l'alimentació), o perquè aquestes tecnologies es mouen en terrenys morals o èticament sensibles (aplicacions biomèdiques), no hi està havent un suport públic decidit a les investigacions ni als desenvolupaments tecnològics en aquests camps. Les conseqüències d'aquesta manca de suport poden provocar l'abandó d'algunes línies d'investigació que, tot i que són prometedores, no ofereixen a les companyies privades unes perspectives de retorn suficient. D'altra banda, pel que fa a les línies d'investigació amb un potencial de rendibilitat alt, la manca de suport públic farà que aquestes línies d'investigació es desenvolupin exclusivament amb capital privat. La manca de participació pública en les investigacions pot comprometre la seva transparència i dificultar-ne el control i augmentar la dependència en l'ús de les seves aplicacions.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Cultius de microorganismes

En condicions naturals, els microorganismes es desenvolupen en diferents hàbitats i freqüentment en poblacions mesclades o juntament amb altres éssers vius. Tot i així, la major part de la informació de què es disposa dels microorganismes es deriva de l'estudi de cultius purs d'aquests. Sens dubte, aquest fet constitueix una limitació però és dubtós que sense la pràctica de l'aïllament i manteniment de línies clonals la microbiologia hagués arribat a constituir-se com a tal (Parés, R., Juárez, A., 1997).

El cultiu pur és un sistema dinàmic que pot caracteritzar-se en funció de l'augment de la biomassa, de la formació de nous productes que s'acumulen en el medi i de la desaparició o consum de components originals d'aquest. En aquests dos últims casos s'inclou també l'atmosfera circumdant. Un cultiu pur està constituït, doncs, per una població enorme d'individus iguals que viuen sobre un medi uniforme i que es multipliquen en un temps de generació relativament curt. En aquest sentit, s'inclouen igualment bacteris, llevats i algues unicel·lulars. També es podrien considerar els protozous i fins i tot els cultius de cèl·lules d'organismes superiors (Parés, R., Juárez, A., 1997).

En biotecnologia s'anomena *fermentació* a tot aquell procés en el qual s'obté un producte conseqüència de l'activitat dels microorganismes. Els productes obtinguts poden ser les mateixes cèl·lules, enzims, metabòlits cel·lulars (etanol, citrat, làctic...), antibiòtics o substàncies modificades pel metabolisme cel·lular (iogurts, vi, cervesa, vinagre...). En els experiments duts a terme en aquest treball, però, ens referirem generalment a processos de cultiu (i no processos de fermentació) per a producció de proteïnes recombinants, ja que estrictament, *fermentació* en microbiologia s'aplica a aquells processos metabòlics a partir d'un sucre com la glucosa, que s'oxida sense participació de la cadena respiratòria. En el cas de les fonts de carboni no fermentables, l'energia ha de ser proporcionada per la cadena respiratòria (Zimmermann, F.K., Entian, K.D., 1997).

1.1.1. Anàlisi de diferents dissenys de bioreactors que poden emprar-se i de les estratègies de cultiu que aquests impliquen.

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

(Bailey, James E., Ollis, David F., 1987)

Els Reactors de Tanc Agitat són els tipus de reactors més empleats en la indústria. Es pot operar de tres formes diferents: en discontinu (*batch*), en discontinu alimentat (*fed-batch*) o en continu. Els dos primers processos tenen lloc en estat no estacionari mentre que el tercer tipus d'operació opera en estat estacionari (vegeu més endavant), sense incloure els períodes d'arrancada i aturada i sense tenir en compte possibles alteracions o desestabilitzacions.

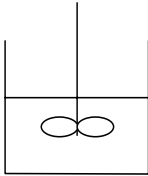
En els reactors de tanc agitat, idealment, la mescla es suposa que és suficientment intensa i uniforme per considerar que les condicions de reacció i les concentracions dels diferents paràmetres són efectivament homogènies en tot el bioreactor. Aquestes aproximacions serien vàlides si tots els gradients existents fossin suficientment petits de manera que la velocitat de reacció local per a una cèl·lula donada no canviés

significativament a mesura que aquesta es mou des d'una posició a una altra dins del reactor. Condicions d'aquest tipus es poden trobar en reactors a escala de laboratori i fins i tot a escala pilot, depenent dels processos involucrats. En el creixement a altes densitats cel·lulars o organismes filamentosos o organismes productors de polímers extracel·lulars, en canvi, les condicions de treball són altament no-Newtonianes, de manera que la mescla ideal no es pot considerar.

Creixement en batch (Reactor Discontínu de Tanc Agitat o RDTA):

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

(Bailey, James E., Ollis, David F., 1987)



En un bioreactor en discontínu, tant el medi de cultiu com l'inòcul s'introdueixen al sistema al principi de l'operació. Excepte l'entrada i sortida de gasos i l'addició d'antiescumant o reguladors del pH, no es preveu la incorporació d'altres materials en l'equip durant el procés. El reactor es troba perfectament mesclat de forma que la concentració de tots els components en qualsevol punt del sistema és la mateixa. El procés es du a terme fins que s'assoleix una conversió determinada, modificant-se així la concentració dels diferents components en el reactor al llarg del temps. En aquest cas, òbviament, els termes d'entrada i sortida de matèria són nuls.

Entre els diferents esquemes operatius d'un bioreactor, el més tradicional i, encara ara, més àmpliament utilitzat a escala industrial, està basat en l'ús de cultius de cèl·lules microbianes en operació discontínua. Els reactors en discontínu s'usen majoritàriament en la indústria alimentària, farmacèutica i biotecnològica en general, ja que en ells es poden assolir i mantenir unes condicions asèptiques durant l'operació en curts períodes, cosa que resulta molt important a l'hora de mantenir una línia cel·lular durant processos en què s'utilitzen medis molt rics en nutrients (sals minerals, fonts de carboni, etc.). No obstant, presenta una sèrie de problemes, entre els quals es poden destacar la pèrdua d'eficàcia degut als períodes d'arrancada i aturada, a la falta d'homogeneïtat del producte obtingut en operacions de càrregues consecutives i a la dificultat d'implementació d'esquemes d'integració energètica.

Cal considerar, també, que generalment opera a baixes densitats cel·lulars, especialment en els períodes inicials i que s'ha d'evitar l'alimentació d'elevades concentracions de substrat per evitar l'alentiment del procés degut a fenòmens d'inhibició (per substrat o producte). En equips que operen en discontínu, a més, el cultiu triga en completar-se, ja que, en el període final, les condicions són molt poc favorables (màxima concentració de producte i mínima de substrat) cosa que provoca la disminució de la velocitat del procés notablement.

El balanç de matèria en mols de component i (el qual pot ser cèl·lules, substrat o producte, per exemple) mostra que la velocitat d'acumulació del component i , donat per la derivada de la quantitat total del component i al bioreactor respecte del temps, ha de ser igual a la velocitat neta de formació d'aquest component i degut a les reaccions químiques que tenen lloc dins del bioreactor.

$$\frac{d}{dt}(V_R \cdot C_i) = V_R \cdot r_{fi}$$

On,

V_R és el volum del cultiu (unitat de volum).

C_i és la concentració del component i al medi (mols i /unitat de volum).

r_{fi} és la velocitat de formació del component i (mols i formats/(unitat de volum·unitat de temps)).

Si no s'afegeix ni s'extreu líquid del bioreactor i la pèrdua del gas per evaporació (*stripping*) en el medi de cultiu és negligible, aleshores V_R roman constant i l'equació anterior es redueix a:

$$\frac{dC_i}{dt} = r_{fi}$$

Un balanç similar es podria formular en termes màssics o de densitat per a aquest component. A més, si el component i estigués present en un corrent gasós que entrés o abandonés el bioreactor, s'haurien d'afegir els termes corresponents a l'entrada o sortida d'aquest component

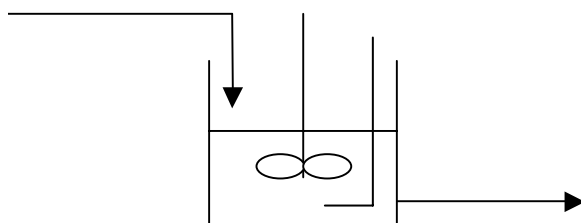
De la segona equació es pot deduir que la mesura de la velocitat temporal de canvi de la concentració del component i permet determinar directament la velocitat total de formació del component i degut a les reaccions (incloses les de la cèl·lula) que tenen lloc dins del reactor en *batch*. En general, la velocitat de formació r_{fi} depèn de l'estat de la població cel·lular (composició, morfologia, distribució d'edats, etc.) i de tots els paràmetres ambientals que influeixen les velocitats de les reaccions en l'interior de les cèl·lules i al medi.

Creixement en continu (Reactor Continu de Tanc Agitat o RCTA)

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

(Bailey, James E., Ollis, David F., 1987)

En la majoria de casos, els reactors continus de tanc agitat són equips cilíndrics amb un sistema d'homogeneïtzació, generalment mecànic, que garanteix que la composició és la mateixa en qualsevol punt del reactor. Són també coneguts com *quimiostats*. En els processos continus té lloc, tant una entrada com una sortida de medi líquid, de manera que el volum operatiu es manté constant. Els avantatges del procés continu inclouen, per tant, la reducció dels costos de capital (degut a l'operació amb una més alta productivitat), la reducció dels costos d'operació (mà d'obra i energia) i l'assoliment d'un millor control del procés.



Com mostra la figura de l'esquerra, la mescla s'aconsegueix amb un agitador, o per el bombolleig del gas d'entrada o per ambdós fenòmens. Es considera que l'agitació o la mescla és prou vigorosa com per assumir que

cada fase dins del recipient és uniforme en quant a la seva composició, és a dir, que les composicions en cada fase no varien amb la posició dins del reactor. D'aquesta suposició de mescla perfecta (o homogènia) es deriva una conclusió molt important: la composició del líquid de sortida del reactor és la mateixa que la del contingut d'aquest. A més a més, degut a aquesta mescla perfecta la concentració d'oxigen dissolt també és la mateixa en tota la dimensió de la fase líquida. Aquest fet és de crucial importància a l'hora de considerar RCTA aerats ja que significa que es pot desvincular el disseny de l'agitador o aerador de la consideració dels processos de reacció. Mentre que el sistema d'aeració mantingui la concentració d'oxigen dissolt en el RCTA per sobre de la concentració limitant, es poden observar els aspectes cinètics cel·lulars del sistema essencialment com un problema a part. Una lògica similar s'aplica sovint als problemes de transferència de calor, els quals poden acompanyar el creixement microbià. Sempre que el reactor estigui ben agitat i tingui una capacitat adequada d'extracció de calor i estigui equipat amb un sistema satisfactori de control de temperatura, es pot assumir que és isoterm a la temperatura desitjada i així procedir amb la investigació dels processos de reacció microbians.

En estat estacionari, on totes les concentracions dins del reactor són independents del temps, es pot aplicar el següent balanç de matèria per a qualsevol component del sistema:

$$\text{Entrada al reactor} - \text{Sortida del reactor} + \text{Generació dins del reactor} = 0$$

Anomenant V_R al volum total de cultiu, aquest balanç de matèria per al RCTA en estat estacionari queda:

$$F (C_{if} \cdot C_i) + V_R \cdot r_{fi} = 0$$

On,

F és el cabal volumètric del corrent d'aliment i sortida del reactor (unitat de volum/unitat de temps),

C_{if} és la composició molar del component i en el corrent d'entrada del reactor (mols i /unitat de volum),

C_i és la composició molar del component i en el corrent de sortida del reactor i en l'interior d'aquest (mols i /unitat de volum).

Arreglant l'equació anterior obtenim:

$$r_{fi} = \frac{F}{V_R} (C_i - C_{if}) = D (C_i - C_{if})$$

A partir d'aquesta equació es pot observar com la velocitat de formació es pot avaluar fàcilment a partir de les mesures de les concentracions d'entrada i sortida del reactor a l'estat estacionari. El paràmetre D s'anomena *velocitat de dilució* i està definit com:

$$D = F/V_R$$

Aquest paràmetre caracteritza el temps de residència o la velocitat de processament de l'RCTA. La velocitat de dilució és igual al nombre de volums de líquid al reactor que

han passat a través del recipient per unitat de temps. La velocitat de dilució, D , és la inversa del temps mitjà de residència.

L'estudi de la cinètica de la població cel·lular en un RCTA té un altre avantatge important, ja que la població cel·lular es pot adaptar a l'entorn constant i pot assolir o aproximar-se molt a un **estat de creixement balancejat o estat estacionari, on les cèl·lules estan en un estat fisiològic constant al llarg del temps**, les velocitats d'entrada i sortida de la xarxa metabòlica al llarg del temps son constants, i no hi ha acumulació de metabòlits. Així, hi ha l'avantatge de poder obtenir un estat cel·lular relativament ben definit i reproducible. Això és més difícil d'obtenir en cultius en *batch*. D'altra banda, els experiments en *batch* es poden dur a terme en *erlenmeyers*, varis a la vegada, en un incubador agitat. L'equipament requerit per a un RCTA és més costós i complicat. Assolir l'estat estacionari en un experiment RCTA pot costar hores o fins i tot dies, augmentant la possibilitat que el cultiu es contami, cosa que duria l'experiment a la ruïna.

Aplicant les equacions anteriors de balanços de matèria per a la biomassa i considerant que el substrat, S , és el component limitant del creixement, es pot suposar que la velocitat volumètrica de creixement serà $\mu \cdot X$ (unitat de mesura de la biomassa/unitat de volum \cdot unitat de temps). Si l'operació es du a terme en estat estacionari, és a dir, exceptuant els períodes d'arrancada i aturada de l'equip, el terme d'acumulació serà nul i, donat que els cabals d'alimentació i sortida són iguals, el balanç de matèria aplicat a la biomassa resulta:

$$F(X_f - X) + V_R \cdot r_X = 0$$

Si es té en compte que $r_X = \mu \cdot X$, i els conceptes de temps de residència i velocitat de dilució, s'obté:

$$r_X = \mu \cdot X = \frac{F}{V_R} (X - X_f) = D(X - X_f) = \frac{1}{g} (X - X_f)$$

Reordenant,

$$D \cdot X_f = (D - \mu) \cdot X$$

Donat que en la majoria dels casos el reactor s'alimenta amb una solució estèril ($X_f=0$), s'obté que $\mu=D$, cosa que indica que, en un *quimiostat*, la velocitat específica de creixement de la biomassa coincideix amb la velocitat de dilució.

Creixement en fed-batch (Reactor Discontinu Alimentat)

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

(Bailey, James E., Ollis, David F., 1987)

Sovint és convenient afegir corrents de líquid en un bioreactor que opera en *batch* mentre el procés de reacció té lloc. Això es podria dur a terme per afegir precursors de productes desitjats, per afegir compostos reguladors com podrien ser inductors en un determinat moment de l'operació en *batch*, per mantenir els nivells de nutrients baixos i

minimitzar així la repressió per catabolít, o per a allargar la fase estacionària amb l'addició de nutrients i així obtenir un producte addicional.

En aquest tipus de configuració, el substrat s'alimenta en càrregues successives i no es retira cap producte, de manera que hi ha una variació del volum del medi durant el procés. La metodologia d'alimentació per càrregues successives o *fed-batch* també permet solucionar alguns problemes que presenta l'operació del reactor en discontinu. Aquest procediment implica que es poden manipular, externament, les concentracions del substrat o dels nutrients en l'equip, modificant la velocitat d'addició i/o la concentració de l'alimentació, d'acord amb una estratègia de control predeterminada o en funció dels resultats obtinguts (prenent com a criteri la mesura de diferents variables com poden ser la concentració de producte o substrat, el pH, l'oxigen dissolt, etc.). El principal avantatge que presenta aquesta tècnica front a l'operació merament discontinua, és que permet controlar o alterar la concentració d'un o més nutrients o substrat en el medi de cultiu. Per aquest motiu podria resultar d'interès en aquells casos en què el creixement cel·lular o l'obtenció d'un producte sigui sensible a la concentració d'una determinada substància o substrat limitant. Així, tot i operant amb microorganismes que presenten similars productivitats específiques, la productivitat global pot multiplicar-se, en ocasions, per un factor de 3 o 4 en relació amb l'obtinguda en un procés discontinu.

El substrat s'afegeix a mesura que es va consumint, mantenint la seva concentració en uns valors que permetin assolir velocitats de reacció acceptables, buscant un equilibri entre l'augment de velocitat per increment de concentració de substrat i disminució per efecte de la inhibició per producte. L'addició de substrat pot efectuar-se en forma cíclica o bé en continu, depenent del cas.

Tal com s'explicarà més endavant, aquest és el tipus d'operació més emprat en processos de producció de proteïnes recombinants amb el sistema de *Pichia pastoris* (Cregg *et al.*, 1993; Stratton *et al.*, 1998; Lin Cereghino J. & Cregg J.M., 2000; Lin Cereghino G.P.L. *et al.*, 2001), el qual també ha estat utilitzat per a la producció recombinant lipases del fong *Rhizopus oryzae* en el grup d'investigació del Departament d'Enginyeria Química de la UAB, en el qual s'inscriu aquest treball (Minning *et al.*, 2001; Serrano, A., 2002; Lin Cereghino, G.P., *et al.*, 2002).

1.2. Metabolisme cel·lular

(Bailey, James E., Ollis, David F., 1987)

(Parés, R., Juárez, A., 1997)

Una cèl·lula viva és un complex reactor químic en el qual tenen lloc més de 1000 reaccions independents catalitzades enzimàticament. El total d'aquestes reaccions bioquímiques que ocorren dins de la cèl·lula és el que s'anomena *metabolisme*. Les reaccions metabòliques tendeixen a agrupar-se en seqüències que s'anomenen *rutes metabòliques* les quals estan connectades entre elles a través de rutes circulars, rutes tancades que s'alimenten a elles mateixes, i a través de les bifurcacions d'aquestes rutes que connecten un seqüència de reaccions amb una altra.

Les reaccions metabòliques poden dividir-se en tres grans blocs: degradació de nutrients, biosíntesi de molècules petites i biosíntesi de grans molècules. Com ja s'ha dit, cada reacció està catalitzada per un enzim. Aquests tenen la funció essencial de determinar quines reaccions tenen lloc i a quina velocitat. Per tal d'apreciar la importància que els enzims tenen a l'hora de regular la velocitat relativa de les reaccions, s'ha de tenir en compte que moltes substàncies reaccionants dins de les cèl·lules (anomenades *metabòlits*) poden ser atacades simultàniament per varis enzims diferents (per exemple, per a oxidar-los, reduir-los o unir-los a altres substàncies). Així doncs, les seqüències de reaccions dins de les cèl·lules es tallen i sobreposen d'una manera molt complexa.

El metabolisme microbià comprèn milers de transformacions químiques diferents. De fet, encara que poguessin donar-se totes a la vegada, no constituïrien per elles mateixes el metabolisme, perquè per a això es requereix una integració. La característica més distintiva de la integració del metabolisme és que aquestes transformacions es duen a terme en una estructura altament organitzada i que, gràcies a la seva activitat, aquesta estructura organitzada es perpetua i incrementa, mantenint-se fonamentalment idèntica a ella mateixa. Sense estructura no hi ha metabolisme i sense metabolisme no hi ha estructura. Aquest aparent cercle viciós en què semblen estar l'estructura i l'activitat química de la cèl·lula es considera que és el resultat d'un llarg procés d'evolució a partir d'una activitat molt simple relacionada amb una estructura també molt simple. Actualment aquesta activitat és molt complexa i té lloc en una estructura també molt complexa i ambdues estan diversificades de forma irreversible.

Una altra característica fonamental de la integració de l'activitat química és que totes les reaccions apareixen ordenades en seqüències molt ben definides en què el producte final d'una és el substrat de la següent. Aquestes seqüències de reaccions s'anomenen *vies o rutes metabòliques* i algunes s'inicien en algun material del medi exterior que ha de passar al protoplasma a través dels embolcalls cel·lulars. Altres acaben en productes que s'alliberen al medi exterior.

Clàssicament les vies metabòliques poden tenir una funció catabòlica o anabòlica. Estrictament, les primeres serien aquelles que partint de certs materials exteriors acaben en altres productes més simples que es retornen al medi exterior. L'única finalitat d'aquestes vies seria la producció d'energia. Els productes finals són de menor pes molecular i globalment la reacció té caràcter oxidant. La seqüència bioquímica de caràcter anabòlic condueix a l'increment dels components o constituents cel·lulars i per

tant suposa sempre una generació positiva de biomassa en el balanç de matèria. També té caràcter reductor i forma molècules de major pes molecular que les de partida.

Així doncs, el terme *metabolisme* s'aplica a tots els processos químics que tenen lloc dins d'un organisme viu. La cèl·lula incorpora uns nutrients que es converteixen en constituents cel·lulars a través del procés denominat *biosíntesi* o *anabolisme*. Aquestes reaccions requereixen una energia que la cèl·lula obté a partir de l'oxidació o degradació de substàncies, les reaccions *catabòliques*, amb la consegüent producció de compostos residuals. Aquest sistema és el que utilitzen els organismes *quimiòtrofs*, que és el cas del present treball. A més de les reaccions de biosíntesi, l'energia obtinguda per les cèl·lules, es pot consumir en la realització de treballs de tipus mecànic, osmòtic, etc., el que s'anomena, en general, *manteniment* (Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998).

1.2.1. Regulació de les vies metabòliques

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

És evident que el complex de vies metabòliques de qualsevol cèl·lula, que inclou milers d'enzims, requereix una coordinació i un control, que s'ajusti independentment, per a evitar el caos i aconseguir la síntesi ordenada de tots els components cel·lulars.

En totes les cèl·lules la regulació pot exercir-se de dues formes: (1) mitjançant canvis en l'activitat d'enzims presents o, (2) per modificació de la síntesi d'aquestes proteïnes, el que condueix a un canvi en la seva concentració cel·lular. Ambdós tipus de regulació es presenten en totes les cèl·lules:

(1) Regulació de l'activitat enzimàtica: la regulació per modificació de l'activitat pot tenir lloc en el sentit d'activació o en el de desactivació, cosa que s'aconsegueix a través d'una unió covalent d'un grup determinat a la molècula proteica, o bé per mitjà de l'associació reversible amb una altra molècula (enzims *alostèrics*). La regulació per enzims *alostèrics* s'utilitza per ajustar els fluxos metabòlics a distància, és a dir, són aquells casos en què el producte final d'una via és l'efector alostèric negatiu del primer enzim d'aquesta (regulació *feedback*).

(2) Regulació de la síntesi dels enzims: existeixen enzims *constitutius* que són necessaris en totes les condicions de creixement i, per tant, es sintetitzen sempre, independentment de la presència de substrats o productes al medi. Altres, en canvi, estan sotmesos a regulació de la seva síntesi, produint-se o no en funció de les condicions del medi. La regulació de la síntesi dels enzims es realitza a nivell de la transcripció i, lògicament, és un procés més lent que la regulació de l'activitat, però permet un estalvi energètic important. En uns casos, la regulació s'exerceix com una inducció de la producció d'enzims com a resposta a la presència d'un *inductor*, que moltes vegades és el mateix substrat. És el cas de molts enzims implicats en el catabolisme de les fonts d'energia i carboni. En altres casos, els enzims que catalitzen la síntesi d'un determinat producte no són sintetitzats si aquest producte, denominat *corepressor*, està present en el medi.

Els mecanismes de regulació anteriors tenen com a objectiu vies concretes del metabolisme, però en molts casos, és necessari un control simultani de tota una sèrie de gens com a resposta a un canvi en l'ambient. Així, es pot evitar una resposta

innecessària d'activació d'un conjunt de gens quan no són imprescindibles. Aquest mecanisme de control global ha estat denominat *repressió per catabolit* o *efecte glucosa*, perquè la glucosa produeix aquest efecte en molts microorganismes. Una conseqüència de la repressió per catabolit és el creixement *diàuxic* que es produeix quan hi ha dos fonts d'energia en el medi i els enzims necessaris per a la seva utilització estan sotmesos a aquest tipus de control. En aquest tipus de creixement el microorganisme utilitza primer la font d'energia millor, és a dir la que proporciona una major velocitat de creixement, per a consumir posteriorment, després d'un petit retràs necessari per a la síntesi dels nous enzims, l'altra font d'energia.

També hi ha casos de regulació mitjançant la degradació d'enzims, com per exemple ocorre en el cas de l'enzim alcohol oxidasa i altres enzims claus del metabolisme del metanol de llevats com ara *Pichia pastoris* (Harder, W., & Veenhuis, M., 1989).

1.3. Llevats

(Gòdia Casablanca, F., López Santín, J., editors, 1998)

Els organismes vius es classifiquen en *procariotes* i *eucariotes* en funció de la complexitat de la seva organització cel·lular. Un grup independent el constitueixen els virus, organismes que no tenen estructura cel·lular. Els fongs són organismes eucariòtics, és a dir, les seves cèl·lules tenen un vertader nucli, amb un conjunt de cromosomes com a portadors de la informació genètica. El seu citoplasma inclou una gran quantitat d'òrgànuls, constituïts per membranes, que realitzen les diferents funcions cel·lulars. Els fongs es poden presentar sota dos formes morfològiques diferents: la filamentosa, constituïda per les *hifes*, en els denominats *fongs filamentosos*, i la unicel·lular en el cas dels *llevats*.

La classificació dels fongs es realitza atenent a l'estructura del micel·li, composició de la paret cel·lular, morfologia de les estructures reproductores i característiques associades al seu cicle sexual. La majoria dels fongs amb aplicació industrial s'inclouen dins dels grups *Zigomicetes* (com per exemple els gèneres *Mucor*, productor de proteases, i *Rhizopus*, productor d'amilases, àcid fumàric i hidroxiprogesteron), *Ascomicetes* (que inclou gèneres com *Claviceps*, productor d'alcaloides, o el llevat *Saccharomyces*, el microorganisme més usat en processos industrials) i *Deuteromicetes* (dins del qual hi ha formes unicel·lulars com *Candida* o micel·liars com *Aspergillus*, *Penicillium* o *Cephalosporium*, de notable importància econòmica per la seva producció d'enzims i antibiòtics).

Els llevats, doncs, són fongs unicel·lulars que s'han utilitzat durant segles per a l'obtenció de productes com el vi, la cervesa o el pa. Tots metabolitzen sucres com la glucosa, fructosa i manosa, però alguns són capaços de fer-ho en condicions anaeròbies, amb la producció d'alcohol i diòxid de carboni en el procés conegut com a *fermentació*.

1.3.1. Llevats metilotròfics

Koichi Ogata va descriure en 1969 la capacitat de certs llevats d'usar metanol com a única font de carboni i energia (Ogata K. *et al.*, 1969, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989). A diferència dels bacteris metilotròfics, l'existència dels quals es coneixia des del segle XIX, el nombre de gèneres de llevats metilotròfics descrits és molt limitat. L'aïllament d'aquest tipus de llevats des del seu habitat natural va requerir processos d'enriquiment sota condicions òptimes, medis de cultius adequats que contenien substàncies antibacterianes com la penicilina o la cicloserina, i un pH de cultiu baix (3-5). En concret, existeixen únicament quatre gèneres de llevats metilotròfics: *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* i *Candida* (Tani Y. *et al.*, 1978, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989). A més, aquests quatre gèneres estan molt relacionats entre ells. Els estudis de Lee J.D. *et al.* (1980, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989) mostraren, a partir de l'anàlisi del seu contingut GC i altres característiques fisiològiques, que els ascomicetes *Hansenula* i *Pichia* són taxonòmicament molt propers, i suggereixen que els asporògens *Torulopsis* i *Candida* no són més que formes imperfectes d'aquells dos.

Pichia pastoris és un llevat metilotròfic facultatiu que pertany al grup dels ascomicetes, que es reproduïx per gemació, homotàlica i la dotació genòmica del qual roman haploide (a no ser que es sotmeti a condicions de limitació per nitrogen) (Lin Cereghino J. & Cregg J.M., 2000).

Aquests llevats comparteixen una ruta específica d'assimilació de metanol (Zimmermann, F.K., Entian, K.D., 1997). Les reaccions inicials tenen lloc en microcossos o orgànuls especialitzats, els peroxisomes, seguit per passos subsegüents en el citoplasma. L'adaptació al creixement sobre metanol implica la inducció de les activitats d'un determinat nombre d'enzims clau (com l'alcohol oxidasa, la catalasa, la formaldehid deshidrogenasa i la dihidroxiacetona sintasa), així com la biosíntesi de peroxisomes (Harder, W., & Veenhuis, M., 1989). L'assimilació del metanol està fortament reprimit per les fonts de carboni múltiples com la glucosa o la glicerina, però l'assimilació simultània d'una font de carboni múltiple i metanol també pot tenir lloc sota determinades condicions de creixement (Stratton J. *et al.*, 1998).

La principal aplicació dels llevats metilotròfics (particularment de *Pichia pastoris*), pel que fa a recerca bàsica, és el seu ús com a organismes models per a l'estudi de la biogènesi de peroxisomes (Faber K.N. *et al.*, 1998; Lin Cereghino J., & Cregg J.M., 2000). Pel que fa a l'àmbit biotecnològic, l'èxit més important va ser el descobriment de la seva excel·lent capacitat per actuar com a cèl·lules hoste de proteïnes heteròlogues. Els gèneres de *Pichia* i *Hansenula* representen una alternativa interessant i avantatjosa en nombrosos casos front als sistemes microbians convencionals d'expressió de proteïnes forànies, com *Escherichia coli* o *Sacharomyces cerevisiae* (Lin Cereghino J., and Cregg J.M., 2000; Gellisen, G., 2000).

1.4. Producció de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*.

1.4.1. Producció de proteïnes heteròlogues en llevats

(Bernard R. Glick & Jack J. Pasternak, 1994)

Els sistemes d'expressió procariòtics són, en principi, útils per produir proteïnes heteròlogues (recombinants) a partir de cDNAs d'origen eucariòtic clonats. Però en molts casos, les proteïnes eucariotes que han estat sintetitzades per bacteris són inestables o no tenen activitat biològica. A més, tot i els curosos mètodes de purificació, el producte final es pot contaminar de compostos bacterians tòxics o que causen un augment de la temperatura corporal en humans i animals (pirogens), en el cas d'aplicacions terapèutiques. Per evitar aquests problemes, s'han desenvolupat els sistemes d'expressió eucariotes per a la producció de proteïnes que poden usar-se com a agents terapèutics en humans o animals. Una proteïna humana que es vol destinar a l'aplicació mèdica generalment ha de ser idèntica a la proteïna natural pel que fa a les seves propietats bioquímiques, biofísiques i funcionals. La incapacitat dels organismes procariotes per produir autèntiques versions d'aquestes proteïnes és, en la majoria dels casos, degut a l'absència de mecanismes apropiats per generar determinades modificacions postraduccional.

Aquestes modificacions que poden tenir lloc en els eucariotes durant l'etapa postraduccional, és a dir, després que la proteïna hagi estat sintetitzada són:

- (1) Formació correcta dels ponts disulfur. Aquesta reacció està catalitzada per un enzim anomenat *disulfur isomerasa*. Una proteïna que no està plegada degudament és inestable i no té activitat.
- (2) Trencaments proteolítics de la forma precursora. Alguns segments d'aminoàcids seleccionats són eliminats per aconseguir una proteïna funcional.
- (3) Glicosilació. Aquesta reacció és la modificació més gran que proporciona estabilitat a la proteïna i, en alguns casos, també les seves propietats distintives. Les glicosilacions de proteïnes més comuns consisteixen en l'addició de residus de sucres específics als aminoàcids serina o treonina (*O-linked glycosilation*) o a l'aspargina (*N-linked glycosilation*).
- (4) Addicions als aminoàcids de les proteïnes. Les modificacions d'aquest tipus inclouen fosforilacions, acetilacions i γ -carboxilacions, entre d'altres.

L'expressió de proteïnes recombinants en *Saccharomyces cerevisiae* ha estat un èxit en nombrosos casos. Però, tot i alguns alts rendiments experimentats, en general, els nivells d'expressió són baixos. A banda, hi altres limitacions amb l'ús d'aquest microorganisme:

- Durant l'escalat, freqüentment es produeix la pèrdua del plàsmid, fins i tot quan s'està usant un promotor induïble.
- Les proteïnes heteròlogues sovint es troben hiperglicosilades, contenint més de 100 residus de manosa en cada oligosacàrid unit a N de la cadena lateral. Pel contrari, les cadenes que per naturalesa contenen un alta quantitat d'oligosacàrids de manosa, tenen només entre 8 i 13 residus d'aquesta. El número extra d'unitats de manosa pot

alterar l'activitat biològica del producte o canviar la seva capacitat de produir una reacció immunològica. També afecta negativament a la vida mitja de la proteïna en sang (Lin Cereghino J. & Cregg J.M., 2000).

- En nombrosos experiments, les proteïnes que havien de ser excretades es quedaven retingudes en l'espai periplasmàtic, cosa que feia la posterior purificació més difícil.

Per aquest motiu, es van investigar altres espècies de llevats i de sistemes eucariòtics que poguessin actuar com a cèl·lules hoste per a la producció de proteïnes heteròlogues. En general, els atributs que es busquen inclouen vectors adequats, amb seqüències reguladores transcripcionals i translacionals específiques, capacitat de transformació, alts rendiments de proteïna, i la capacitat de l'organisme hoste per créixer en condicions industrials. Els llevats candidats alternatius a *Saccharomyces cerevisiae* considerats són *Kluyveromyces lactis*, el qual ha estat usat comercialment per a la producció de lactasa (β -galactosidasa), *Schizosaccharomyces pombe*, llevat que es reproduïx per fissió i no pas per gemació, *Yarrowia lipolytica*, que utilitza alcans com a substrat per al creixement, *Pichia pastoris* i *Hansenula polymorpha*, les quals poden usar metanol com a única font de carboni i energia.

1.4.2. Sistema d'expressió de *Pichia pastoris*

Durant els anys cinquanta va sorgir la idea d'utilitzar els llevats com a fonts de proteïna (*single-cell protein*, SCP) i durant anys es van realitzar diversos treballs d'investigació dirigits a l'ús d'aquests microorganismes com a fonts d'aliment utilitzables com a alternativa, o complement, dels pinsos per al consum animal. A més, per tal d'assegurar la rentabilitat del procés global, la tecnologia de la SCP es va desenvolupar en relació amb l'aprofitament i reutilització de productes residuals generats usualment en processos industrials.

El descobriment dels llevats metilotròfics (Ogata K. *et al.*, 1969, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989) va ser d'especial interès per a la tecnologia de la SCP, degut a què aquests posseeixen característiques més favorables per a aquest procés que els bacteris metilotròfics. Els científics de la companyia *Phillips Petroleum* van investigar i definir medis i protocols adequats per al cultiu del llevat metilotròfic *Pichia pastoris* a partir de metanol (*Phillips Petroleum Company Licesing*, 1986), i juntament amb la seva empresa subsidiària *Provesta*, van dissenyar, també, la configuració necessària dels bioreactors usats per al seu cultiu, de forma que s'assegurés una transferència d'oxigen adequada a elevades densitats cel·lulars (Wegner G.H., 1983, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989).

Ja en la dècada dels noranta, la *Phillips Petroleum Company* va contactar amb el *Salk Institute of Biotechnology/Industrial Associates, Inc.* (SIBA, La Jolla, CA, EUA) per a realitzar estudis de tipus biològic en *Pichia pastoris* i avaluar la possibilitat de desenvolupar un sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues en aquest microorganisme. Aquests estudis, juntament amb els coneixements operacionals de cultiu que es posseïen, permetria l'ús d'aquest sistema d'expressió en processos de producció de proteïnes heteròlogues d'elevat interès humà i industrial (Lin Cereghino J. and Cregg J.M., 2000; Gellissen G., 2000).

Els investigadors del SIBA van aïllar gens i promotors eficaços per a l'expressió de proteïnes forànies en *Pichia pastoris* i van construir vectors, soques i protocols de

manipulació genètica en aquest microorganisme. L'any 1993, *Phillips Petroleum* va cedir la patent sobre *Pichia pastoris* com a sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues a la *Research Corporation Technologies*, RCT (Tucson, AZ) i va donar llicència a la companyia *Invitrogen Corporation* per comercialitzar amb els components del sistema per a recerca (Lin Cereghino J. & Cregg J.M., 2000).

Paral·lelament també s'ha desenvolupat i patentat un sistema d'expressió (soques, marcadors i algun promotor) pel Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba, amb el qual comercialitzen algun producte (Rodríguez, M. *et al.*, 1994; Menendez J. *et al.*, 2003).

El sistema d'expressió de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris* està principalment basat en l'ús del promotor de l'enzim alcohol oxidasa (P_{AOX1}), que està fortament regulat i induït per metanol, fent-lo molt atractiu per a la seva aplicació en la producció de proteïnes recombinants.

A més de les propietats d'aquest promotor, també cal destacar que *Pichia pastoris* és un microorganisme preferentment respiratiu. Aquest fet evita la generació de subproductes no desitjats típics dels processos fermentatius, com l'etanol, cosa que facilita el seu cultiu a elevades densitats cel·lulars (> 100g de pes sec per litre). Assolir elevats nivells de biomassa és molt important en l'expressió de proteïnes que van associades al creixement cel·lular.

Les modificacions post-traduccionals generades per *Pichia pastoris* s'assemblen més a les dels organismes eucariotes superiors que les realitzades, per exemple, per *Sacharomyces cerevisiae*. D'una banda, a diferència d'aquest últim, *Pichia pastoris* té menys tendència a hiperglicosilar proteïnes forànies, és a dir, que la longitud màxima de les cadenes d'oligosacàrids introduïdes normalment no supera els trenta residus de manosa, en comparació amb els 50 o 150 residus generats per *Sacharomyces cerevisiae* (Lin Cereghino J. & Cregg J.M., 2000). D'altra banda, *Pichia pastoris* no conté l'enzim responsable de la formació de residus tipus α 1,3-manosa, principal causant de la naturalesa antigènica de les glicoproteïnes expressades en *Sacharomyces cerevisiae* i que impossibiliten el seu ús amb finalitats terapèutiques (Cregg J.M. *et al.*, 1993). Cal dir que ja existeixen soques "humanitzades", és a dir amb enzims de glicosilació humans clonats en *Pichia pastoris* i que permeten produir proteïnes humanes en *Pichia* amb patrons de glicolisació humanitzats (Hamilton, S.R. *et al.*, 2003).

A més, *Pichia pastoris* pràcticament no excreta proteïnes natives al medi extracel·lular, el que simplifica el procés de recuperació i purificació de les proteïnes forànies quan la seva expressió és extracel·lular. En aquest cas, la capacitat de *Pichia pastoris* per créixer en medis totalment definits també és un avantatge pel que fa a aquests processos de recuperació i purificació de les proteïnes.

Es pot trobar la llista actualitzada de proteïnes que han estat expressades en *Pichia pastoris* a la web <http://www.kgi.edu/html/noncore/faculty/cregg.htm>. En el context d'aquest treball, cal destacar que s'han expressat amb èxit varies lipases en *Pichia pastoris*, totes les quals, exceptuant una d'origen humà (Sahasrabudhe A.V. *et al.*, 1998; Yang Y. & Loewe M.E., 1998), pertanyen a diferents espècies de fongs: les lipases 1 i 4 de *Candida rugosa* (Brocca S. *et al.*, 1998; Tang S.J. *et al.*, 2001) i la lipasa de

Rhizopus oryzae (ROL) (Minning S. *et al.*, 1998). La lipasa 2 de *Candida rugosa* també s'ha expressat en *Pichia pastoris* (Lee G.C. *et al.*, 2002).

En referència a les tècniques de manipulació genètica en *Pichia pastoris*, aquestes són relativament senzilles i similars a les desenvolupades en *Sacharomyces cerevisiae*. Igualment, el fet de ser un microorganisme haploide representa un avantatge, ja que qualsevol mutació genètica es manifesta fenotípicament.

1.4.3. Promotor de l'*AOX1* en *Pichia pastoris*

L'enzim alcohol oxidasa és el responsable de la primera de les reaccions d'oxidació del metanol en *Pichia pastoris* i la seva síntesi està principalment regulada pel promotor usat per excel·lència en l'expressió de proteïnes heteròlogues en aquest microorganisme, el P_{AOX1} . No obstant, existeixen dos gens responsables de la síntesi de l'enzim, el gen de l'alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) i l'alcohol oxidasa 2 (*AOX2*) (Cregg J.M. *et al.*, 1989).

La seqüència de nucleòtids codificant per a l'alcohol oxidasa és homòloga en un 92% entre l'*AOX1* i l'*AOX2*. La proteïna generada per cada un d'ells comparteix una homologia del 95% en quant a composició aminoacídica i del 97% en quant a activitat específica (Koutz P. *et al.*, 1989, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989).

Aquests dos gens estan regulats de forma similar, el producte de cada un d'ells es localitza d'igual manera en l'interior dels peroxisomes i no presenten activitats relatives diferents cap a substrats diferents (Cregg J.M. *et al.*, 1989). A més, altres gèneres de llevats metilotròfics com *Hansenula polymorpha* o *Candida boidinii* únicament disposen d'un sol gen que codifiqui per a l'enzim alcohol oxidasa, per la qual cosa tampoc sembla que sigui un fet molt comú entre gèneres. No obstant, potser simplement significa que encara no s'han pogut reproduir al laboratori les condicions fisiològiques o ambientals en què la disponibilitat dels dos gens per a l'alcohol oxidasa resulti avantatjosa (Cregg J.M. *et al.*, 1989).

Els gens de *Pichia pastoris* *AOX1* i *AOX2*, com ja s'ha mencionat, semblen estar regulats de manera similar, i s'ha observat que aquesta regulació actua a nivell de la transcripció (Cregg J.M. *et al.*, 1989). Malgrat això, el nivell de transcripció assolit per cada un d'ells, en cèl·lules creixent en metanol, és molt diferent. El gen *AOX1* és el responsable de la síntesi del 90% de l'alcohol oxidasa generada en la cèl·lula, mentre que el gen *AOX2* codifica només el 10% restant (Cregg J.M. *et al.*, 1989). Aquestes diferències es deuen a les zones no homòlogues entre ambdós gens, les quals es troben fora de la regió codificant de cada un d'ells, és a dir, en posició 5' i 3' (Koutz P. *et al.*, 1989, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989).

L'elevada taxa de transcripció del gen *AOX1* és una de les dos principals característiques per les quals aquest és el promotor més àmpliament utilitzat per a l'expressió de proteïnes heteròlogues en *Pichia pastoris*. La segona característica fonamental és la seva estricta regulació. L'alcohol oxidasa, a l'igual que altres enzims involucrats en l'oxidació del metanol, està controlada a nivell de transcripció (Cregg J.M. *et al.*, 1989). En cèl·lules creixudes en metanol, els nivells de mRNA detectats per a l'alcohol oxidasa arriben fins a un 5% del total de mRNA polyA⁺. No obstant, en condicions de creixement en presència d'altres fonts de carboni, com la glucosa, aquests nivells són pràcticament indetectables (Cregg J.M. *et al.*, 1988).

El sistema de regulació de la transcripció del gen *AOX1* està sotmès a dos tipus de mecanismes, un sistema de repressió/desrepressió per catabolít i un d'inducció específica per substrat, que en aquest cas concret és el metanol (Tschopp J.F. *et al.*, 1987, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989). En *Pichia pastoris* les condicions de desrepressió no són suficients perquè es doni una transcripció del gen *AOX1*, sinó que es requereix la presència d'un substrat inductor. És a dir, en condicions de creixement en què la font de carboni repressora (glucosa o glicerina) s'ha esgotat per complert (o es troba en condicions limitants), els nivells de mRNA corresponents al gen *AOX1* detectats en la cèl·lula són únicament un 2% d'aquells observats en presència de metanol (Tschopp J.F. *et al.*, 1987; Harder W. *et al.*, 1987, citats a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989). Tanmateix, aquestes condicions sí que són suficients perquè s'observin nivells elevats d'expressió dels enzims metanol oxidasa i formati deshidrogenasa, codificats pels gens *MOX* i *FMD*, dels llevats metilotròfics *Hansenula polymorpha* i *Candida boidinii*, respectivament. Així mateix, en aquestes mateixes condicions, també es detecten nivells d'expressió d'altres enzims relacionats amb la via assimilatòria del metanol en la pròpia *Pichia pastoris*, com la formaldehid o la formati deshidrogenasa (Harder W. *et al.*, 1987, citat a Harder, W., & Veenhuis, M., 1989; Mayer A.F. *et al.*, 1999). En presència de metanol, l'alcohol oxidasa pot representar el 30% del total de proteïna cel·lular soluble degut a la força del promotor *AOX1* (vegeu l'apartat 1.7.2 d'aquesta mateixa Introducció). En absència de metanol, no hi ha síntesi d'alcohol oxidasa.

Cregg J.M. *et al.* (1993) i Lin Cereghino J. i Cregg J.M. (2000) mencionen que, pel que fa al disseny d'estratègies de cultiu, cal tenir en compte que els nivells de transcripció del P_{AOX1} són de 3 a 5 vegades superiors quan les concentracions residuals de metanol en el medi són molt baixes o limitants. A concentracions elevades de metanol (>2 g/l segons alguns autors) ja es comença a veure un efecte en disminució de la velocitat d'assimilació de metanol i de la velocitat específica de creixement màxima. A concentracions de metanol encara més elevades, s'arriba a inhibir el creixement cel·lular per l'efecte tòxic (Zhang W. *et al.*, 2000).

Així doncs, elevats nivells de metanol provoquen la generació de concentracions elevades de metabòlits de naturalesa tòxica per a la cèl·lula, com el formaldehid, l'àcid fòrmic o en la seva forma ionitzada, el formati, l'acumulació del qual pot resultar fins a 100 vegades més perjudicial per a la viabilitat de la cèl·lula que el metanol per ell mateix. L'entrada de metanol a l'interior cel·lular és lliure i la seva oxidació a formaldehid no està inhibida per producte, és a dir, tant el flux de metanol com la generació de formaldehid són processos que no es regulen de forma activa, per tant és necessària una ràpida eliminació d'aquests subproductes tòxics (Jones G.J. *et al.*, 1991).

A més, una gran quantitat de formaldehid a l'interior de la cèl·lula pot arribar a provocar la inactivació de l'enzim alcohol oxidasa (AOX), que acaba per dissociar-se del grup prostètic FAD, i pot provocar la inhibició del creixement cel·lular (Veenhuis M. *et al.*, 1983). No obstant, quan existeixen elevades concentracions de formaldehid i àcid fòrmic a l'interior de la cèl·lula, aquests substrats acaben per excretar-se al medi extracel·lular on, també, a partir de determinats nivells, poden exercir un efecte inhibidor sobre el creixement degut a què poden afectar directament a les proteïnes de la paret cel·lular. Tant el formaldehid com l'àcid fòrmic poden actuar sobre les unions peptídiques de les proteïnes de la paret cel·lular a l'unir-se a grups de lisines, i poden

provocar la desintegració de les seqüències fosfolipídiques, cosa que provoca una aturada del creixement cel·lular (Swartz J. *et al.*, 1981; Jones G.J. *et al.*, 1991).

Cal remarcar que aquest efecte inhibitor només s'observa a concentracions elevades d'aquests compostos. En concret, en el llevat metilotròfic *Hansenula polymorpha* es van determinar unes concentracions de formaldehid i àcid fòrmic inhibidores per al creixement cel·lular de 0.4 g/l i 0.2 g/l respectivament, provocades a partir de concentracions de metanol superiors als 6.5 g/l en el medi de cultiu (Swartz J. *et al.*, 1981). Recentment s'ha correlacionat aquest efecte inhibitor en *Pichia pastoris* a partir de concentracions de metanol de 7 g/l (Kobayashi K. *et al.*, 2000) i fins i tot menors, a partir de 3.65 g/l (Zhang W. *et al.*, 2000).

Totes aquestes observacions són importants a l'hora del disseny dels cultius de producció de proteïnes heteròlogues mitjançant *Pichia pastoris* sota el promotor P_{AOXI}. D'una banda, no es requereix la presència de concentracions elevades de la font de carboni repressora durant la primera etapa del cultiu, sinó únicament aquelles que satisfacin els requeriments nutricionals de les cèl·lules. D'altra banda, una vegada consumida aquesta font de carboni, la inducció de l'expressió s'aconsegueix mitjançant l'addició de metanol al medi de cultiu.

En *Pichia pastoris* la majoria de proteïnes s'han expressat utilitzant vectors d'expressió basats en el promotor P_{AOXI} (<http://www.kgi.edu/html/noncore/faculty/cregg.htm>), malgrat que existeixen altres promotors. Entre aquests promotors alternatius, cal destacar el promotor constitutiu del gen de la gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (P_{GAP}) (Waterman H.R. *et al.*, 1997) i el promotor regulat per font de nitrogen de la formaldehid deshidrogenasa (P_{FLD}) (Shen S. *et al.*, 1998), ambdós comercialment disponibles (Invitrogen). No obstant, els promotors constitutius són inadequats per a l'expressió de proteïnes que són tòxiques per al llevat. El promotor P_{FLD} requereix encara d'estudis per optimitzar-ne el seu ús en cultius a elevada densitat, tot i que s'està avançant en aquesta direcció (Resina D. *et al.*, 2004).

1.4.4. Vectors d'expressió en *Pichia pastoris*

(Bernard R. Glick & Jack J. Pasternak, 1994)

Les primeres proves d'ús del llevat *Pichia pastoris* com a organisme hoste per a la producció de proteïnes heteròlogues va ser el desenvolupament d'un vector per a la producció de l'antigen de superfície del virus de l'hepatitis B (HbsAg). Primer, la seqüència HbsAg va ser clonada entre el promotor de la regió del gen de l'alcohol oxidasa 1 (*AOX1p*) i la regió del senyal de terminació i de poliadenilació (*AOX1t*) del mateix gen.

El plàsmid complet desenvolupat per a aquest primer estudi contenia, doncs, aquesta unitat *AOX1p-HbsAg-AOX1t*; un origen de replicació que funciona en *Pichia pastoris*; un fragment de DNA que conté l'origen de replicació d'*Escherichia coli* pBR322 i un marcador de selecció també d'*Escherichia coli*; un segment de DNA situat a continuació (*downstream*) de la regió *AOX1t* que facilita la integració del DNA afegit (unitat *AOX1p-HbsAg-AOX1t*) dins d'una localització específica del cromosoma; i un gen funcional de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) que codifica l'enzim que és requerit per a la síntesi de l'aminoàcid histidina. La seqüència pBR322 permet al vector

mantenir-se en *Escherichia coli* de tal manera que les etapes de clonació poden dur-se a terme fàcilment.

Per evitar problemes deguts a la inestabilitat del plàsmid, l'estratègia en aquest experiment va ser integrar la unitat *AOX1p-HbsAg-AOX1t* dins del genoma de *Pichia pastoris*. En presència de metanol, un clon portador de la unitat de DNA integrat sintetitza grans quantitats d'HbsAg, el qual queda retingut al citoplasma. Aquesta construcció genètica es va demostrar estable i inalterada després de 200 hores de cultiu en presència de metanol.

L'estructura bàsica dels vectors d'expressió de *Pichia pastoris*, doncs, es compon de les següents seqüències de DNA: un promotor de transcripció, un o varis llocs únics de restricció (on es clona el gen d'interès), una seqüència terminadora 3' pròpia de *Pichia pastoris* (que asseguri la transcripció correcta del gen), un marcador de selecció per a *Pichia pastoris*, així com una seqüència de replicació i selecció pròpies d' *Escherichia coli*.

Aquests plàsmids són en la seva majoria integratius, és a dir, es recombinen amb zones homòlogues del genoma de la cèl·lula assegurant així una major estabilitat. Per tant, els vectors d'expressió també inclouen zones homòlogues al genoma de *Pichia pastoris* amb el propòsit de dirigir la recombinació d'aquests a llocs específics dins del cromosoma. En els vectors de *Pichia pastoris* més utilitzats, aquestes seqüències homòlogues són o bé una regió del gen de l'alcohol oxidasa 1, *AOX1*, o el gen de la histidinol deshidrogenasa, *HIS4*. El gen *HIS4* és considerablement gran (3 kb) i el seu ús està limitat a soques de *Pichia pastoris* auxotròfiques per a l'aminoàcid histidina. Existeixen altres vectors que incorporen, a més del gen *HIS4*, un segon marcador cel·lular, el gen de resistència a l'ampicilina (*Escherichia coli*) o el gen de resistència a la kanamicina (*Escherichia coli*) (Higgins D.R. & Cregg J.M., 1998). No obstant, això augmenta encara més la grandària molecular dels vectors, cosa que dificulta la seva manipulació durant les etapes de clonació i transformació.

Alternativament, existeixen una sèrie de vectors que posseeixen una seqüència de DNA homòloga a la regió 3' del gen de l'AOX, dirigint així la inserció a aquest *locus* i inclouen, a més, un marcador cel·lular de dimensions menors, el gen *SH BLE* (aïllat de *Streptoalloteichus hindustanus*). Aquest gen, de només 375 bp, codifica una proteïna que confereix resistència a la bleomicina Zeocina, l'actuació de la qual és efectiva en *Escherichia coli*, llevats i altres eucariotes (Gatignol A. *et al.*, 1988). Aquesta estructura redueix substancialment les dimensions dels vectors fins a 3.5 kb. A més, aquests vectors permeten la selecció directa dels clons transformats, a diferència dels que incorporen el gen *HIS4*, que a més de la selecció per ampicilina o kanamicina s'han de seleccionar aquells que són *his*⁺.

Per a l'expressió de proteïnes extracel·lulars existeixen vectors que posseeixen senyals de secreció. La més usada és la seqüència de codificació de la regió *prepo* del factor α de *Sacharomyces cerevisiae*, tot i que també existeixen plàsmids que posseeixen la seqüència senyal derivada del gen de la fosfatassa àcida de *Pichia pastoris*, *PHO1*.

En l'actualitat la llista de vectors d'expressió desenvolupats en *Pichia pastoris* és més àmplia i augmenta a mesura que s'incrementen els estudis d'aïllament de gens,

promotors i marcadors alternatius en aquest microorganisme, malgrat que no tots ells estan a disposició comercial (Higgins D.R. & Cregg J.M., 1998; www.invitrogen.com).

Com ja s'ha mencionat, la inserció del vector d'expressió està dirigida, generalment, al gen *HIS4* o al gen *AOX1* del genoma de *Pichia pastoris*. En el primer dels casos, la recombinació implica la incorporació del gen *HIS4* podent efectuar la selecció dels clons transformats his^+ , en soques originalment his^- . El segon cas mereix una descripció més detallada ja que la recombinació entre la zona 3' del gen *AOX1* del vector i del genoma cel·lular pot significar la inactivació o no del gen *AOX1* de *Pichia pastoris*.

La inactivació del gen *AOX1* implica desproveir a la cèl·lula del 90% de l'enzim alcohol oxidasa, quedant únicament el gen *AOX2* funcional. Aquest tipus de cèl·lules metabolitzen molt lentament el metanol degut a la baixa concentració d'alcohol oxidasa sintetitzada i es coneixen com Mut^S (*methanol utilisation slow*). Contràriament, les soques Mut^+ (*methanol utilisation plus*) són aquelles en què la recombinació i inserció del cassat d'expressió no implica la interrupció del gen *AOX1*, i la síntesi d'alcohol oxidasa no es veu afectada. Aquest fet afecta de forma important la capacitat de metabolització del metanol per la cèl·lula i, per tant, la velocitat de creixement d'aquesta en metanol.

La inactivació del gen *AOX1* cel·lular depèn del mode en què es produeix la recombinació específica entre les seqüències homòlogues del gen i el vector. Segons com s'hagi realitzat la linealització del plàsmid, s'originen un o dos extrems homòlegs al gen *AOX1*, de forma que s'afavoreix la recombinació simple o doble entre les seqüències. En aquells casos en què es produeix recombinació simple, la inserció del gen forani s'obté sense afectar a l'*AOX1* cromosòmic. De forma contrària, la recombinació doble, en què ambdós extrems del vector són homòlegs al gen *AOX1*, suposa la incorporació del vector mitjançant substitució i, per tant, la pèrdua del gen *AOX1*. En el primer cas, per tant, no hi haurà pèrdua de material genètic (deleció).

Existeixen soques comercials (Invitrogen) de cada un dels fenotips Mut^{+S} i també diverses soques (no comercials) Mut^- en les quals ambdós gens *AOX* s'han inactivat. Totes les soques comercials de *Pichia pastoris* deriven de la NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*, Peoria, IL) (Higgins *et al.*, 1998).

Les soques GS115 (Mut^+ , his^-) i KM71 (Mut^- , his^-) són les més àmpliament usades per a l'expressió de proteïnes heteròlogues juntament amb *Pichia pastoris* X-33 (soca isogènica respecte a la GS115 en la qual s'ha revertit la seva auxotrofia). Totes elles són comercialitzades per Invitrogen.

Les soques SMD 1168, 1165 i 1163 són deficientes respecte a la síntesi de proteases. En cultius d'elevada densitat cel·lular, la lisi de part de la biomassa allibera proteases vacuolars al medi de cultiu que poden degradar les proteïnes expressades i excretades per *Pichia pastoris*. El gen *PEP4* codifica la proteïnasa A, necessària per a l'activació de certes proteases vacuolars. El gen *PROB1* codifica la proteïnasa B. Per tant, la doble deleció de *PEP4* i *PROB1* disminueix substancialment l'activitat proteolítica de la soca (Higgins D.R. & Cregg J.M., 1998).

Existeixen varis paràmetres que poden afectar l'expressió de proteïnes heteròlogues sota el control transcripcional del P_{AOX1} en *Pichia pastoris*. Alguns d'aquests són intrínsecs

al sistema d'expressió, per exemple, el fenotip Mut de la soca, el lloc d'inserció del gen d'interès dins del genoma cel·lular, el nombre de còpies del gen forani, el tipus d'inserció intra o extracel·lular, la naturalesa del senyal de secreció (en cas d'expressió extracel·lular) o l'activitat de proteases endògenes.

Altres factors estan més relacionats amb la proteïna que s'expressa, com per exemple, el contingut GC/AT del gen a expressar o el grau de toxicitat de la proteïna forània per a la cèl·lula hoste. Així mateix, altres factors importants són l'estabilitat del seu mRNA, així com les modificacions post-transcripcionals i/o traduccional requirides (Gellisen G., 2000).

L'altre gran bloc de paràmetres que influeix sobre el procés de producció està format per aquells factors relacionats amb l'operació de cultiu, és a dir, paràmetres físics com la temperatura, l'agitació i aeració, o químics, com el pH o la composició del medi de cultiu, així com l'estratègia d'inducció amb metanol que es segueixi.

Aquests diferents grups de factors estan a la seva vegada relacionats entre ells i la definició de l'estratègia òptima de cultiu i producció d'una proteïna heteròloga sota el promotor P_{AOXI} en *Pichia pastoris* resulta ser un procediment empíric que depèn de cada cas concret. Tot i així cal destacar que existeixen certes generalitats en els cultius de *Pichia pastoris* a elevada densitat cel·lular, tal i com s'explica a continuació.

1.5. Estratègies de cultiu a elevada densitat cel·lular en *Pichia pastoris*

Els nivells de producció de proteïnes heteròlogues, expressades sota el control del P_{AOX1} en *Pichia pastoris*, que s'assoleixen en cultius a elevada densitat cel·lular són variables i han de ser optimitzats en cada cas (Cregg J.M. *et al.*, 1993). En la gran majoria dels casos, el mode d'operació utilitzat és el *fed-batch*.

Així, la producció de proteïnes recombinants amb qualsevol de les tres soques Mut de *Pichia pastoris* es realitza en bioreactors usant procediments de tres etapes. Les dues primeres etapes del cultiu són iguals per als tres fenotips de soques. La primera etapa és una etapa en *batch* amb glicerina com a font de carboni, la qual serveix per a generar massa cel·lular. La segona fase és una fase en *fed-batch*, en la qual la glicerina s'afegeix a una velocitat de creixement limitant. La limitació de la concentració residual de glicerina en el medi durant aquesta fase permet la desrepressió de la maquinària metabòlica d'assimilació de metanol i permet una transició gradual del creixement en glicerina a metanol (Stratton J. *et al.*, 1998). Sovint, durant aquesta fase s'alimenta de manera simultània amb quantitats de metanol limitants. La tercera fase és la fase d'inducció amb metanol i difereix depenent del fenotip de l'hoste d'expressió utilitzat. No obstant, una característica comuna d'aquesta tercera fase és que els nivells de metanol en el reactor han de ser mesurats i controlats (en línia) amb cura.

Per exemple, les soques Mut⁺ són sensibles a concentracions residuals de metanol elevades. En presència d'excés d'oxigen i metanol, el formaldehid, el primer producte del metabolisme del metanol, s'incrementa fins a nivells tòxics i inhibeix el creixement de les cèl·lules. Així, per al creixement cel·lular i expressió recombinant adequats amb soques Mut⁺, és necessari mantenir una concentració residual baixa en el reactor. L'avantatge de les soques Mut⁺ en relació a les soques defectives d'*AOX* és que la seva velocitat de creixement en metanol (i producció recombinant de proteïna) és molt més elevada. No obstant, la concentració de metanol s'ha de controlar estretament. La cromatografia de gasos i la mesura d'oxigen dissolt en el medi són dos mètodes que han estat sovint utilitzats per a mesurar en línia, directa o indirectament, els nivells de metanol en el reactor (Stratton J. *et al.*, 1998).

Les soques Mut^s (tenen l'*AOX1* deletat) es poden generar durant la seva transformació mitjançant esdeveniments de reemplaçament de gens en els quals el gen *AOX1* és reemplaçat pel casset d'expressió (vector d'expressió). Alternativament, es pot utilitzar una soca de *Pichia pastoris* com ara la KM71, la qual conté el gen *AOX1* interromput, amb vectors d'expressió inserits mitjançant una integració amb un sol esdeveniment de recombinació. Tal com s'ha dit anteriorment, aquestes soques creixen lentament amb metanol perquè depenen del gen *AOX2* per a sintetitzar alcohol oxidasa. L'estratègia de cultiu per a una soca Mut^s és la mateixa que per a una Mut⁺, excepte que la velocitat d'alimentació de metanol és més baixa, per tal de mantenir una concentració entre el 0.2 i 0.8% en el reactor (Stratton J. *et al.*, 1998). Un avantatge de les soques Mut^s es que el cultiu no és tan sensible al metanol residual en el medi del reactor, comparat amb les soques Mut⁺, i per tant les estratègies de control de la concentració de metanol (i el mateix procés d'escalat) poden ser més senzills.

Una estratègia d'inducció alternativa per a soques Mut^s és utilitzar una alimentació mixta de glicerina:metanol. Brierley *et al.* (1990) varen investigar diferents relacions glicerina:metanol d'alimentació, que anaven canviant al llarg del temps. L'increment gradual i lent de la proporció de metanol durant la fase d'alimentació mixta resultà en un augment important dels nivells d'expressió de proteïna recombinant i un escurçament de la fase d'inducció de 175h a 45 h. No obstant, l'alimentació mixta a velocitats elevades també podia donar lloc a la producció de concentracions inhibidores d'etanol (Brierley, R.A. *et al.*, 1990; D'Anjou, M.C. & Daugulis A.J., 2000).

Aquestes estratègies d'alimentació mixta també s'han aplicat amb el mateix resultat en les etapes de transició entre la fase de creixement en glicerina i la d'inducció amb metanol en processos de cultiu en *fed-batch* utilitzant soques Mut⁺ (Minning S. *et al.*, 2001; Serrano A., 2002).

Existeixen varis exemples de cultius amb llevats metilotròfics, en què s'ha descrit un augment del rendiment cel·lular biomassa-substrat en metanol mitjançant l'addició del metanol combinat amb altres fonts de carboni a concentracions limitants (Müller R.H., 1986). A més, s'ha observat que l'addició de substrats mixtes augmenta la velocitat de consum del metanol i s'obté una major productivitat final del sistema (Chirovulu V. *et al.*, 1997; Katakura Y. *et al.*, 1998).

Les soques Mut⁻ de *Pichia pastoris* (per exemple, la soca KM7121), les quals tenen disrupcions tant en el gen *AOX1* com en el *AOX2* també es poden utilitzar per a producció de proteïnes recombinants amb el sistema basat en el P_{AOX1} (Chirovulu V. *et al.*, 1997). Aquestes soques són totalment defectives en alcohol oxidasa i per tant no poden utilitzar metanol. No obstant, el metanol encara induirà la transcripció del P_{AOX1} i l'expressió dels gens regulats per aquest promotor. L'incapacitat de la soca per créixer sobre metanol requereix l'ús d'una font de carboni alternativa, com la glicerina, per créixer i produir proteïna. No obstant, l'excés de glicerina pot produir repressió del P_{AOX1}, afectant l'expressió de gens recombinants. Chirovulu *et al.* (1997) desenvoluparen estratègies per a la fase d'inducció del *fed-batch* basades en un concepte similar al de l'alimentació mixta desenvolupat per a soques Mut^s: La glicerina s'alimentava en condicions de limitació de creixement (concentració residual al reactor zero o propera a zero) mentre que el metanol es mantenia al 0.5%. Només calia afegir metanol periòdicament (cada 5-6 h) per a compensar el que es perdia per evaporació del reactor.

Tot i que la casa Invitrogen dona unes pautes o protocols de cultiu (Fermentation guidelines, www.invitrogen.com), la decisió sobre quin esquema de producció cal emprar, així com la selecció dels paràmetres específics dins de cada esquema (pH òptim, perfil d'alimentació de metanol etc), estan determinats normalment de manera empírica per a cada proteïna a produir (particularment en el cas de les estratègies d'alimentació mixtes). A més, les dades quantitatives sobre el metabolisme de *Pichia pastoris* (i la seva regulació) són molt escasses comparades amb les que es disposen sobre *Saccharomyces cerevisiae*, la qual cosa limita el disseny racional de les estratègies d'addició simultània dels substrats que cal emprar (és a dir, un disseny racional de les estratègies d'operació del cultiu) i/o el desenvolupament de noves soques productores amb millores genètiques incorporades (enginyeria metabòlica). Així el desenvolupament d'eines i metodologies per a caracteritzar, estimar, modelitzar i controlar l'estat fisiològic de les cèl·lules creixent en diferents substrats i en barreges

dels mateixos s'entreveu com a eina valuosa per al desenvolupament de processos de producció de proteïnes recombinants en cultius de *Pichia pastoris* a elevades densitats cel·lulars.

Històricament, un dels mètodes més utilitzats per controlar l'etapa d'inducció en cultius en *fed-batch* de *Pichia pastoris* és el recomanat per Invitrogen (Invitrogen Fermentation guidelines, www.invitrogen.com), basat en el seguiment indirecte de la concentració de metanol a partir de l'oxigen dissolt. No obstant, s'ha vist que pot donar problemes (Serrano A., 2002). En resum, l'estratègia consisteix en el seguiment del valor de l'oxigen dissolt en el medi de cultiu com a indicatiu de l'evolució del creixement cel·lular i com a base, per tant, de l'addició de substrat durant l'etapa de *fed-batch*. L'augment del valor de la pressió parcial de l'oxigen, pO_2 , en el brou de cultiu s'interpreta com una limitació de la font de carboni i, per tant, s'incrementa la velocitat d'addició del substrat. Malgrat tot, existeixen factors característics del procés de cultiu en bioreactor que poden afectar igualment al valor de la pO_2 , com l'addició d'antiescumant o les possibles variacions de pressió en la capçalera del bioreactor i poden donar lloc, per tant, a interpretacions errònies sobre la disponibilitat o carència del metanol al medi. Igualment, aquest mètode pot resultar poc eficaç si els nivells de metanol al bioreactor no romanen per sota d'aquella concentració de metanol que resulta tòxica per al creixement. En aquest cas, concentracions massa elevades de metanol afectarien al creixement cel·lular provocant una reducció de la velocitat de consum d'aquest i una menor producció de la proteïna d'interès, tal i com observà Katakura Y. *et al.* (1998) i Serrano A. (2002). D'altra banda, tal i com s'ha dit anteriorment, elevades concentracions de metanol també exerceixen un efecte negatiu sobre els nivells de transcripció iniciats pel promotor del gen *AOXI*, P_{AOXI} , els quals són de 3 a 5 vegades superiors en condicions de creixement amb concentracions limitants de metanol en respecte als assolits durant el creixement cel·lular amb excés de metanol (Cregg J.M. *et al.*, 1993).

En aquest context, en els darrers anys hi ha hagut un impuls important en l'adaptació i/o desenvolupament d'eines de seguiment, modelització i control de l'estat fisiològic i paràmetres clau dels cultius de *Pichia pastoris* a elevades densitats, especialment la concentració de metanol al bioreactor i la velocitat específica de creixement (Cornelissen G. *et al.*, 2001; Surribas A. *et al.*, 2003). En general els diferents models que s'han aplicat a *Pichia pastoris* estan basats en models estequiomètrics que descriuen únicament l'evolució de la biomassa, el substrat i el producte (D'Anjou & Daugulis, 2001; Ren H.T. *et al.*, 2003). Queda obert, per tant, un gran camp de recerca pel que fa a la construcció de models estructurats que descriguin els processos de síntesi i secreció de la proteïna heteròloga. Finalment, pel que fa al control del procés, l'estratègia més efectiva és el manteniment de la concentració de metanol constant al medi, a partir de la mesura en línia d'aquest paràmetre (Mayson B.E. *et al.*, 2003; Trinh L.B. *et al.*, 2003; Sinha J. *et al.*, 2003). Es poden trobar, també, alguns treballs pel que fa a la realització del control per mantenir la velocitat específica de creixement (Mayson B.E. *et al.*, 2003; Trinh L.B. *et al.*, 2003; Sinha J. *et al.*, 2003).

Tal com s'ha dit, les estratègies de cultiu en *fed-batch* són les més utilitzades per a processos de producció de proteïnes recombinants en *Pichia Pastoris*. No obstant, també hi ha alguns exemples a la bibliografia de processos de producció en continu, tant amb sistemes basats en el P_{AOXI} (Curvers S. *et al.*, 2001) com en el promotor constitutiu P_{GAP} (Goodrick J.C. *et al.*, 2001). Altrament, els sistemes de cultiu en *quimiostat* han

mostrat ser de molta utilitat en estudis fisiològics de caracterització necessaris per al disseny de processos de producció de proteïnes recombinants basats en llevats metilotròfics (Curvers S. *et al.*, 2001; Goodrick J.C. *et al.*, 2001).

1.6. Lipases

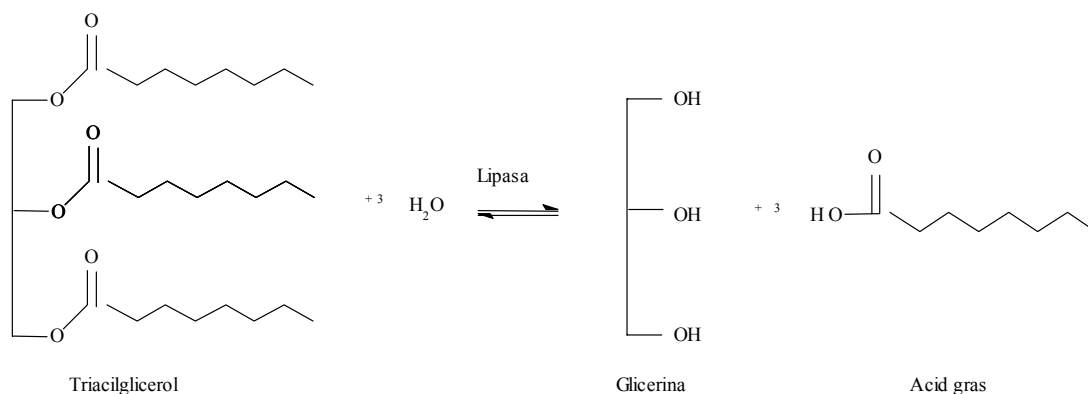
Una de les aplicacions més importants dels cultius és l'obtenció d'enzims. Els enzims són proteïnes que actuen com a catalitzadors biològics. Tenen la propietat d'augmentar específicament la velocitat de les reaccions químiques. Cada tipus d'enzim té la seva pròpia estructura molecular que determina el tipus de reacció química que pot catalitzar.

Les reaccions enzimàtiques resulten particularment interessants per les condicions de treball suaus a què tenen lloc, en contrast amb les reaccions químiques convencionals, i suposen una reducció important de productes secundaris degut a l'especificitat dels enzims per modificar enllaços químics determinats.

Com s'ha explicat al preàmbul d'aquest treball, normalment les soques naturals de microorganismes tenen una capacitat limitada per a la producció d'altas concentracions de metabòlits, cosa que les fa poc interessants des del punt de vista industrial. L'aplicació dels coneixements microbiològics i de l'enginyeria bioquímica permet l'optimització de les condicions que envolten el procés de cultiu, però té com a límit la dotació genètica de cada microorganisme i la seva expressió en les condicions de cultiu. L'altre problema de les soques naturals és que normalment secreten multitud d'isoenzims, com és el cas de molts organismes productors de lipases (i activitats semblants com ara les esterases), sigui perquè una soca té múltiples gens de lipasa (com és el cas del llevat *Candida rugosa*, per exemple), com perquè hi ha fenòmens de processament proteolític diferencial que donen lloc a diferents formes actives a partir d'un sol polipèptid. Això complica molt la seva separació, ja que augmenten les etapes a efectuar de manera que disminueix el rendiment, fent aquesta inviable i cara a gran escala. La tecnologia del DNA recombinant permet produir de manera separada una isoforma concreta, facilitant-ne la seva purificació.

1.6.1. Característiques generals de les lipases

Les lipases (triacilglicerol ester acilhidrolases, E.C.3.1.1.3) són enzims que catalitzen la hidròlisi de triglicèrids per donar àcids grassos lliures, mono i diglicèrids, i glicerina. Aquesta reacció és d'equilibri, de forma que la lipasa pot catalitzar també la síntesi de triglicèrids a partir d'àcids grassos i glicerina. L'equilibri entre una reacció i l'altra està controlat pel contingut d'aigua en el medi de reacció, de forma que, en condicions no aquoses, la lipasa catalitza la reacció de síntesi d'èsters.



La característica que diferencia les lipases d'altres enzims que també poden hidrolitzar ésters, com per exemple les esterases, és la necessitat d'una interfase orgànico-aquosa per realitzar la seva acció catalítica. S'anomena *activació interfacial* a aquest augment de l'activitat catalítica degut a la presència de la interfase. A la natura, les lipases actuen a la interfase orgànica-aquosa per transformar els glicèrids insolubles en aigua en compostos que poden ser fàcilment transportats a través de la paret cel·lular.

Les lipases són produïdes per animals, plantes, fongs filamentosos, llevats i bacteris. La biotecnologia centra el seu interès en les lipases microbianes. Les propietats de les lipases poden diferir molt en funció del seu origen. L'especificitat, per exemple, està directament relacionada amb el microorganisme productor d'aquestes lipases.

En general les lipases es poden dividir en dos grups:

- Lipases no específiques, que són aquelles que hidrolitzen el triglicèrid per obtenir àcids grassos en qualsevol de les posicions possibles. Per exemple *Candida rugosa* produeix lipases de tipus no específic respecte la posició de la glicerina (Macrae A.R. & Hammond R.C., 1985).
- Lipases específiques, que es divideixen a la vegada en dos subgrups: les lipases d'especificitat posicional, les quals hidrolitzen preferentment unes posicions determinades dels triacilglicerols (com per exemple la lipasa de *Rhizopus oryzae* d'aquest treball), i les d'especificitat per l'àcid gras, que catalitzen la hidròlisi d'un determinat tipus d'àcid gras.

A partir d'estudis de purificació i caracterització s'ha deduït que les lipases produïdes per llevats són proteïnes glicosilades amb un pes molecular comprès entre 25 i 60 kDa (Börgstrom B. & Brockman H., 1984). Les lipases d'origen bacterià presenten pesos moleculars que oscil·len entre els 20 i 50 kDa.

1.6.2. Aplicacions de les lipases

Lipases en Síntesi Orgànica

Les lipases s'utilitzen com a biocatalitzadors en molts processos industrials, especialment dels camps dels olis i greixos, detergents, panificació, fabricació de formatges i processament de paper i cuir. A més, són els enzims més emprats en química orgànica sintètica, perquè, com s'ha explicat, catalitzen reaccions d'hidròlisi d'ésters d'àcids carboxílics (o la reacció inversa, corresponent a l'esterificació) en solvents orgànics i amb elevada regio-, quimio- i/o estereoselectivitat, característiques totes elles altament desitjables en síntesi orgànica.

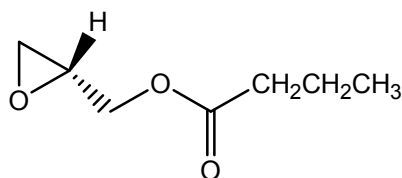
Hi ha nombrosos articles de revisió sobre les aplicacions sintètiques de les lipases. Destaquen les recents revisions de:

- Reetz (Reetz, M.T., 2002), en la qual es descriuen avenços molt recents en la selectivitat i procediments pràctics per incrementar l'activitat en medi orgànic o en diòxid de carboni supercrític.

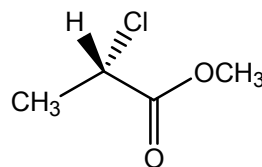
- Berglund (Berglund, P., 2001), en què es descriuen mètodes per incrementar o invertir l'enantioselectivitat de les lipases en operacions sintètiques.
- Banerjee U.C. *et al.* (2001), revisió general que tracta de la producció, purificació, caracterització i aplicacions de les lipases.
- Carrea G. & Riva S. (2000), una revisió general sobre la utilització d'enzims (incloent-hi les lipases) en solvents orgànics i en el qual es defineix l'interessant concepte de l'enginyeria del medi, que pot comportar la inversió de l'enantioselectivitat d'una lipasa en canviar el solvent orgànic.

També cal esmentar els articles de revisió recents de Vicente Gotor, de la Universidad de Oviedo, que descriuen algunes aplicacions recents d'aquests enzims en síntesi orgànica, per exemple, l'aplicació de les lipases en la preparació de productes farmacèutics (Gotor V., 2002) o d'altres derivats d'interès biològic (Gotor V., 2000) i la utilització de les lipases en la formació d'amides i carbamats (Gotor V., 1999).

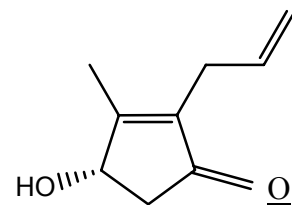
Entre les aplicacions industrials de les lipases cal esmentar la producció, en escala de més de 10 tones per any, del butirat de (*R*)-glicidil, un intermedi en la síntesi de β -bloquejants (Bommarius A.S. *et al.*, 1998). També és important el procés desenvolupat per Stauffer Chemical per a la hidròlisi enantioselectiva d'esters de l'àcid 2-cloropropiònic racèmic (Dahod S.K. & Siuta-Mangano P., 1987). I, en el camp dels insecticides d'estructura piretroide, la preparació de (*S*)-Bioallethrin es realitza a partir de la resolució mitjançant lipases (Sumitomo, 1973; Hoechst, 1988) de l'intermedi racèmic 2-al·lil-3-metil-4-hidroxí-2-ciclopentenona (al·letrolona).



Butirat de (*R*)-glicidil



(*S*)-2-cloropropionat de metil



(*S*)-al·letrolona

1.6.3. Lipasa de *Rhizopus oryzae*

En aquest treball, s'ha utilitzat el gen codificador d'una lipasa del fong *Rhizopus oryzae* com a gen per expressar heteròlogament en *Pichia pastoris*. A part de la facilitat de seguiment dels seus nivells d'expressió amb un senzill assaig d'activitat lipolítica (veure apartat 3.3.2 dels Materials i Mètodes), el qual permet seguir fàcilment els nivells de transcripció a partir del promotor de l'alcohol oxidasa 1, enzim clau en l'assimilació del metanol, l'enzim presenta nombroses aplicacions d'interès en el camp de la química fina.

El fong *Rhizopus oryzae* és un organisme amb capacitat lipolítica, un dels hàbitats naturals del qual és el fruit de la palma. Taxonòmicament aquest fong és sinònim de

Rhizopus arrizhus. D'aquest fong s'ha aïllat una lipasa extracel·lular coneguda amb l'abreviatura ROL (lipasa de *Rhizopus oryzae*) (Ben Salah A. *et al.*, 1994).

La síntesi de lipases és una característica comú en les diferents espècies del gènere *Rhizopus*. S'han descrit fins a 30 lipases diferents sintetitzades per les diferents espècies d'aquest fong, les principals aplicacions de les quals és la modificació de lípids. Les lipases sintetitzades per les diferents espècies de *Rhizopus* difereixen bàsicament en certs aminoàcids. Per exemple, la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) es diferencia de les de *Rhizopus niveus* (RNL), *Rhizopus delemar* (RDL) i *Rhizopus javanicus* (RJL) en la substitució dels grups His 134 i Ile 234 per Asn i Leu, respectivament (Minning S. *et al.*, 1998). Beer H.D. *et al.* (1998) apunten que les diferents formes de lipasa derivades d'una mateixa soca de *Rhizopus* són resultat del processament proteolític diferenciat d'un mateix gen, que dona lloc a diferències respecte l'estructura tridimensional de l'enzim que es tradueixen en una diferent especificitat respecte a la longitud de les cadenes dels àcids grassos que reconeixen.

La seqüència del gen que codifica per a la lipasa extracel·lular de *Rhizopus oryzae* utilitzada en aquest treball està dipositada al *Gene Bank* amb el número d'accés AF229435. El gen codifica per un polipèptid que comprèn una seqüència senyal de 26 aminoàcids, una proseqüència de 97 aminoàcids i la regió de la lipasa madura de 269 aminoàcids (Beer H.D. *et al.*, 1996). La lipasa extracel·lular nativa de *Rhizopus oryzae* posseeix un pes molecular de 32 kDa (segons anàlisi per SDS-PAGE), quatre llocs potencials de N-glicosilació i posseeix 3 ponts disulfur en la seva estructura final (Beer H.D. *et al.*, 1996). L'enzim natiu purificat és estable en el rang de pH de 4.5 a 7, a 30°C i un pH òptim d'activitat de 8.5 (Ben Salah A. *et al.*, 1994).

L'expressió heteròloga de la lipasa madura de *Rhizopus oryzae* (ROL) va ser realitzada per primera vegada en cèl·lules d'*Escherichia coli* per Beer H.D. *et al.* (1996) tot i que van formar cossos d'inclusió que van dificultar la posterior purificació. En el mateix treball també es va comprovar que la ROL madura posseeix certa activitat fosfolipasa, pel que l'expressió de l'enzim madur (desproveït de la proseqüència) resultava tòxic per a la cèl·lula. No obstant, l'expressió de la lipasa juntament amb la seva proseqüència no mostrava aquestes propietats degut a què la proseqüència modula l'activitat i el correcte plegament de la ROL en *Escherichia coli* (Beer H.D. *et al.*, 1996). Es van observar resultats similars en l'expressió extracel·lular de la ROL i la pro-ROL en *Sacharomyces cerevisiae*. Els nivells d'expressió de la pro-ROL obtinguts amb aquest sistema van ser, tot i així, molt baixos (Takahashi S. *et al.*, 1998).

Minning S. *et al.* (1998) van realitzar per primera vegada l'expressió extracel·lular de la ROL madura en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* obtenint uns nivells de producció satisfactoris (fins a 60 mg d'enzim actiu per litre de cultiu) i unes propietats similars a les descrites per a la ROL nativa. La ROL recombinant obtinguda amb aquest sistema d'expressió posseeix un pes molecular de 30 kDa, un pH òptim d'activitat de 8.1 a 30°C i un punt isoelèctric ≥ 9.3 , i no presentava glicosilació.

L'estudi inicial sobre la producció de la ROL en *Pichia pastoris* a escala de bioreactor, realitzat per Minning S. *et al.* (1998), es va dur a terme utilitzant un medi de cultiu complex i el següent esquema de treball: una primera fase de cultiu en *batch*, usant glicerina com a font de carboni per generar biomassa, seguida d'una etapa d'inducció en *fed-batch*, alimentada pel substrat inductor, és a dir, el metanol. L'estratègia

d'alimentació del metanol en la fase d'inducció es va basar en una de les aproximacions més usades per al control d'aquest tipus de cultius, és a dir, l'estratègia recomanada pel manual d'*In vitro* fermentation guidelines que, com s'ha explicat a l'apartat 1.5 d'aquesta Introducció, consisteix en el seguiment del valor de l'oxigen dissolt en el medi de cultiu com a indicatiu de l'evolució del creixement cel·lular i com a base, per tant, de l'addició de substrat durant l'etapa de *fed-batch*.

Serrano A. (2002) va realitzar estudis d'optimització del procés de producció de ROL en *Pichia pastoris*. En primer lloc, va substituir el medi complex per un medi totalment definit, sintètic. Aquest canvi de medi va provocar que, en el moment en què es deixava d'alimentar les cèl·lules amb glicerina (al final de l'etapa *batch*) i es passava al *fed-batch* de metanol, no hi havia una aparició immediata d'activitat lipolítica al medi, sinó que es produïa un període en què l'activitat lipolítica extracel·lular no es detectava al cultiu. Durant aquest període de temps pràcticament tampoc es produïa un increment en el valor de la biomassa assolida. Aquest fet suggeria una absència de fixació de la font de carboni cap a material cel·lular i/o proteïna, i donat que existia disponibilitat de metanol (sense arribar a acumulacions excessives que resultarien perjudicials), aquesta aturada en el creixement cel·lular i en la producció de proteïnes, es pensa que podria ser deguda a una limitació energètica.

A partir d'aquesta observació, Serrano A. (2002) va provar una altra estratègia, consistent en la introducció d'una etapa de cultiu, prèvia a l'inici del *fed-batch* de metanol, en què s'usa una combinació de substrats metanol/glicerina amb el propòsit de proporcionar una font de carboni i energia més rica al sistema i, igualment, adaptar les cèl·lules a la presència del metanol en etapes prèvies a la d'inducció. Aquesta etapa de transició entre l'etapa *batch* i *fed-batch* consisteix en l'addició simultània dels dos substrats, glicerina i metanol. Així, l'addició de metanol es va iniciar a meitat de la fase exponencial de creixement en glicerina. Durant aquest període, el metanol es va acumular al medi fins a assolir una concentració màxima que no va superar els 5 g/l i igualment es va assegurar la presència de metanol quan la concentració de glicerina va arribar a nivells limitants en el cultiu cel·lular. En el moment en què la glicerina es va consumir totalment, els microorganismes van començar a consumir metanol a una velocitat molt superior a l'observada en els cultius anteriors. Globalment, aquesta estratègia, dissenyada de manera empírica, va reduir el temps de cultiu i va augmentar els nivells d'activitat lipolítica finals, cosa que va fer augmentar, també, la productivitat en un factor de 13 respecte al procés descrit per Minning *et al.* (1998). Aquests estudis corroboraren els resultats obtinguts amb estratègies semblants per Brierley *et al.* (1990) i mostraren, doncs, la importància del disseny de les condicions i esquemes de cultiu en *fed-batch* pel que fa a la productivitat final del procés.

1.7. Metabolisme del metanol en llevats metilotròfics i metabolisme central del carboni en llevats

1.7.1. Metabolisme del metanol en els llevats metilotròfics

L'oxidació completa del metanol a CO_2 i H_2O en microorganismes metilotròfics engloba tant vies dissimilatòries (de generació d'energia) com vies assimilatòries (de biosíntesi de material cel·lular). No obstant, aquest metabolisme en els llevats metilotròfics difereix, respecte al dels bacteris metilotròfics, en tres aspectes principals:

- La naturalesa dels enzims involucrats: per a l'oxidació inicial del metanol els llevats no posseeixen metanol deshidrogenases sinó alcohol oxidases.
- La compartimentació del procés: en els llevats, part de l'oxidació del metanol ocorre dins d'òrgànuls cel·lulars denominats peroxisomes. Aquests compartiments membranosos alberguen alguns dels enzims i metabòlits involucrats en el procés d'oxidació del metanol com, per exemple, l'alcohol oxidasa i la catalasa. Durant el creixement en presència de metanol, els peroxisomes poden arribar a ocupar el 90% del volum cel·lular, mentre que en presència d'altres fonts de carboni, com la glucosa o la glicerina, són inapreciables (Veenhuis M. *et al.*, 1983).
- La via de generació d'energia: en els bacteris metilotròfics l'oxidació del metanol està acoblada a la cadena de transport d'electrons. Tanmateix, en els llevats metilotròfics es genera poder reductor en forma de NADH en reaccions posteriors a la fixació primera del metanol en formaldehid. Aquest NADH es produeix en el citosol i s'oxida, en absència de transportadors específics cap a l'interior de la mitocondria, gràcies a l'activitat d'una NADH deshidrogenasa situada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna (Moore A.L. & Rich P.R., 1980).

La figura 1.7.2-1 mostra les principals reaccions involucrades en el procés de metabolització del metanol en llevats metilotròfics, així com la compartimentació del conjunt del procés en l'interior de la cèl·lula.

1.7.2. Metabolisme energètic en llevats metilotròfics

En la via energètica d'oxidació del metanol a CO_2 i H_2O en llevats metilotròfics es defineixen bàsicament dues etapes (figura 1.7.2-1):

- La primera etapa consisteix en l'oxidació del metanol a formaldehid. Aquesta reacció té lloc en l'interior del peroxisoma, és essencial per a l'assimilació del metanol, però d'ella no es desprèn energia per a la cèl·lula.
- En una segona fase, part del formaldehid generat abandona el peroxisoma i s'oxida fins a CO_2 en el citosol. Els enzims que catalitzen aquesta segona fase són dependents del NAD^+ i de la seva activitat es desprèn poder reductor en forma de NADH. Els llevats metilotròfics obtenen energia per a la seva activitat cel·lular mitjançant l'oxidació d'aquest poder reductor (NADH) generat en el citosol. Cada una d'aquestes etapes pot diferir lleugerament entre diferents

gèneres de llevats metilotròfics però, a grans trets, aquestes són les principals reaccions que tenen lloc.

En el llevat *Pichia pastoris* la primera reacció d'oxidació del metanol està catalitzada per l'enzim alcohol oxidasa (AOX) el qual s'ubica en l'interior dels peroxisomes. L'alcohol oxidasa (AOX) requereix la presència del metanol i oxigen molecular (com a acceptor final d'electrons) i la seva activitat sobre aquests substrats genera formaldehid i peròxid d'hidrogen com a productes (figura 1.7.2-1). L'eliminació d'aquests subproductes és molt important i essencial per a la cèl·lula ja que la seva acumulació és tòxica per a la cèl·lula.

L'enzim AOX està format per vuit subunitats proteiques agrupades en dos tetràmers i posseeix una mida molecular d'aproximadament 600 kDa (Van Dijken J.P. *et al.*, 1976). Aquest enzim és clau per a l'assimilació del metanol i la seva síntesi pot arribar a assolir el 30% de la proteïna total soluble de la cèl·lula, probablement degut a les seves característiques cinètiques (Veenhuis M. *et al.*, 1983; Cregg J.M. *et al.*, 1989). L'alcohol oxidasa posseeix una baixa afinitat per als seus substrats, el metanol i l'oxigen. En particular, el valor de K_m per a l'oxigen està al voltant de 0.24-0.4 mM, mentre que la concentració màxima d'oxigen en aire saturat és d'aproximadament 0.2 mM (Harder W. *et al.*, 1987). Per tant, l'AOX ha de treballar en l'interior de la cèl·lula molt per sota de les seves condicions òptimes, cosa que es compensa augmentant la taxa de síntesi de l'enzim per a obtenir elevades concentracions d'aquest (Cregg J.M. *et al.*, 1989). Aquest fet és molt important en l'expressió de proteïnes heteròlogues que es troben sota el control del promotor del gen que codifica per a aquest enzim.

Paral·lelament l'enzim catalasa també es sintetitza a nivells elevats degut a què és la responsable de l'eliminació del peròxid d'hidrogen format en l'interior del peroxisoma. L'oxidació posterior del formaldehid fins a CO_2 ocorre en el citosol i es realitza a través de dos enzims dependents de NAD^+ : la formaldehid i la formiat deshidrogenases (FLD i FMD respectivament) (figura 1.7.2-1).

La formaldehid deshidrogenasa (FLD) no actua sobre el formaldehid lliure sinó sobre un compost intermedi generat de forma espontània a través de la reducció del formaldehid i el glutatió (GSH), el S-hidroximetilglutatió. El glutatió (GSH) és un tripèptid tiòlic que forma part dels sistemes de protecció de la cèl·lula front a determinades condicions d'estrés de tipus nutricional, oxidatiu o derivat de determinades condicions ambientals, com podrien ser l'acumulació d'elevades quantitats de metanol o formaldehid, el que és d'especial importància en processos de cultiu en presència de metanol (Penninckx M.A., 2000). La formaldehid deshidrogenasa (FLD) catalitza l'oxidació d'aquest substrat intermedi, el S-hidroximetilglutatió, generant S-formilglutatió i NADH.

Cal mencionar que la formaldehid deshidrogenasa (FLD) està igualment implicada en la via d'assimilació de les amines metilades com a fonts de nitrogen, característica coneguda com a metazotrofia. La metazotrofia està més àmpliament estesa entre els diferents gèneres de llevats que la capacitat d'assimilar metanol com a única font de carboni i d'energia. La desmetilació de les amines metilades genera formaldehid i amoni. L'amoni s'utilitza com a font de nitrogen i el formaldehid s'oxida fins a CO_2 mitjançant la FLD i els successius enzims citats en la via d'assimilació del formaldehid generat a partir del metanol.

Seguint amb la via d'assimilació del metanol, el S-formilglutatió, generat per la FLD, és posteriorment oxidat fins a CO₂ mitjançant l'enzim formiat deshidrogenasa (FMD). Aquesta oxidació es realitza de forma directa o bé a través del compost generat de la hidròlisi del S-formilglutatió.

En alguns llevats metilotròfics, com per exemple *Candida Boidinii*, existeixen hidrolases específiques que hidrolitzen el S-formilglutatió en formiat i glutatió. El formiat generat s'oxida a través de la formiat deshidrogenasa (FMD) a CO₂ i es genera NADH. Tanmateix, Van Dijken J.P. *et al.* (1976b), va comprovar *in vitro*, mitjançant una suspensió de formiat deshidrogenasa purificada de *Hansenula polymorpha*, l'oxidació directa del S-formilglutatió només en presència de NAD⁺.

Així doncs, la via definitiva per la qual s'oxida el formaldehid fins a CO₂ sembla variar entre els gèneres dels llevats metilotròfics. En qualsevol cas, el poder reductor generat en aquest procés (NADH) es localitza fora de les mitocondries i la seva oxidació es du a terme mitjançant un enzim (NAD deshidrogenasa) localitzat en la part externa de la membrana mitocondrial interna, que canalitza els equivalents reductors en la cadena de transport d'electrons. No obstant, durant el creixement en presència d'altres fonts de carboni, com la glucosa, la generació d'energia depèn d'una NADH deshidrogenasa situada en la cara interna de la membrana mitocondrial que oxida el NADH produït en el cicle dels àcids tricarbòxílics (TCA), el qual té lloc en l'interior de la mitocondria. En aquest cas es generen més mols d'ATP a partir d'un mol de NADH, cosa que explicaria la diferència de velocitats de creixement dels llevats metilotròfics en relació amb la font de carboni usada per al seu cultiu (Moore A.L. & Rich P.R., 1980).

Tanmateix, existeixen estudis recents realitzats amb els llevats *Candida boidinii* i *Hansenula polymorpha*, que apunten a l'existència d'una via independent del glutatió per a l'oxidació del formaldehid fins a CO₂ que resulta energèticament més rentable (Sakai Y. *et al.*, 1995; Murdanoto A.P. *et al.*, 1997). Aquesta via implica la formació de formiat de metil a través de l'oxidació del formaldehid mitjançant l'enzim formiat de metil sintasa (MFS). Aquest enzim és una alcohol deshidrogenasa de tipus III unida a NAD⁺ que es localitza en l'interior de la mitocondria (Murdanoto A.P. *et al.*, 1997). Per tant, aquesta via de consum del formaldehid suposa una via energèticament més rentable donat que els equivalents reductors, generats en forma de NADH per l'enzim formiat de metil sintasa (MFS), es troben directament a l'interior de la mitocondria. Determinats canvis en les rutes metabòliques dels microorganismes estan associats a canvis en les condicions fisiològiques de creixement d'aquests, pel qual es sosté la possibilitat que aquesta sigui una via alternativa de destoxificació del formaldehid, i generació d'energia, per a la cèl·lula en presència d'elevades concentracions d'aquest substrat (Murdanoto A.P. *et al.*, 1997).

La via per la qual el C del metanol s'assimila en els llevats metilotròfics i que permet sintetitzar els enllaços C-C per a la generació del material cel·lular es du a terme mitjançant la condensació de trioses a hexoses (Figura 1.7.2-1). Les trioses procedeixen de la fixació del formaldehid que es troba en els peroxisomes (originat per l'oxidació del metanol). El resultat net d'aquesta via és la formació d'un mol de trioses per cada 3 mols de formaldehid i 3 mols d'ATP.

En concret, les trioses formades són el monofosfat de gliceraldehid (GAP) i la dihidroxiacetona (DHA). En el llevat *Pichia pastoris* aquests compostos s'obtenen a partir de la transferència d'un grup glicolaldehid des de la xilulosa monofosfat (Xu₅P) al formaldehid, pel que aquesta via d'assimilació del C es coneix com a via de la xilulosa monofosfat, i l'enzim clau que realitza aquesta transferència és la dihidroxiacetona sintasa (DAS), que es troba dins dels peroxisomes (Goodman J.M., 1985). Posteriorment, la dihidroxiacetona (DHA) es fosforila (DHAP) i es condensa amb el gliceraldehid monofosfat (GAP) formant la fructosa-1,6-difosfat (FBP). Dues molècules de fructosa-1,6-difosfat (FBP) i una de dihidroxiacetona fosforilada (DHAP) es combinen, mitjançant determinades reaccions, per a generar tres molècules de Xu₅P, amb què el cicle queda tancat.

La ubicació dels diferents enzims involucrats en l'assimilació del metanol i alguns dels seus metabòlits intermedis varia entre l'interior del peroxisoma i el citosol. Per tant, la via d'assimilació del C en els llevats metilotròfics també ocorre de forma compartimentada i suposa un trànsit dels components del sistema cap a dins i fora del peroxisoma.

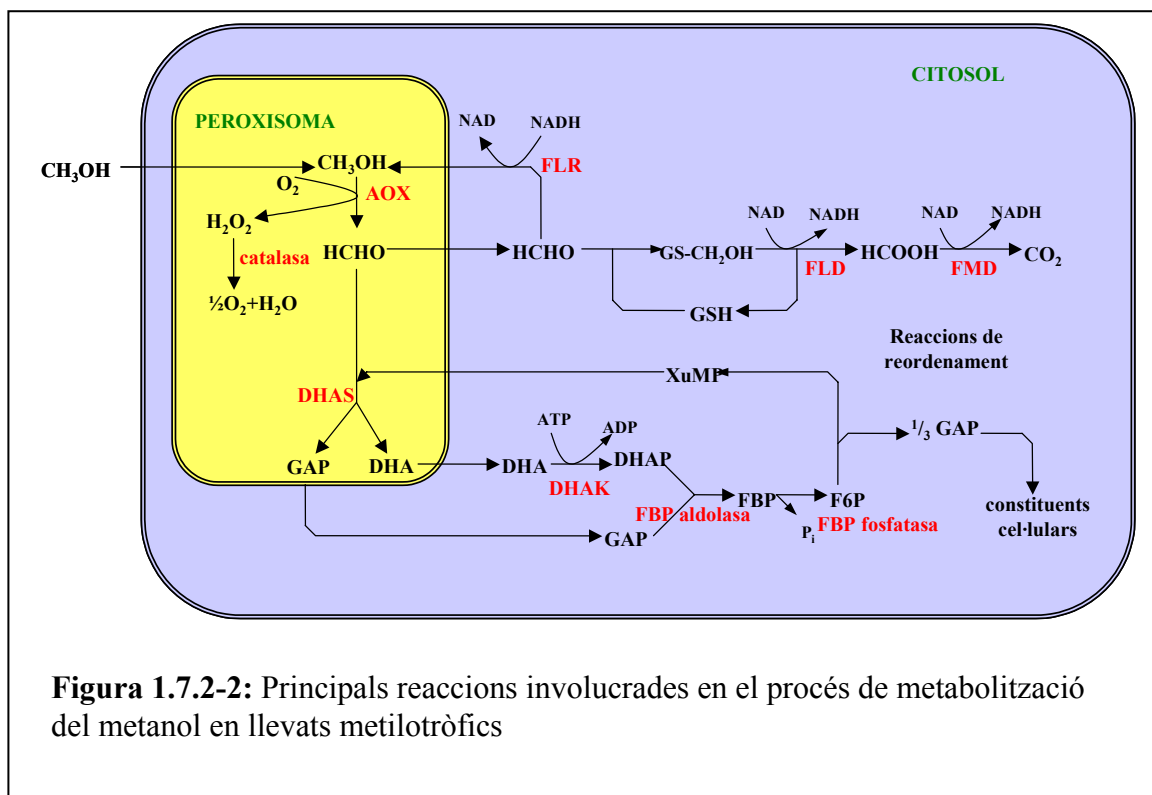


Figura 1.7.2-2: Principals reaccions involucrades en el procés de metabolització del metanol en llevats metilotròfics

1.7.3. Metabolisme central del carboni en llevats

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* ha jugat un rol central en l'evolució de la microbiologia, la bioquímica i la genètica. Així, durant els darrers 25 anys, aquest llevat s'ha convertit en un dels organismes model per a la genètica molecular i la biologia cel·lular, cosa que va culminar el 1996 quan s'assolí per primera vegada el coneixement complet del genoma d'un organisme eucariota. Malgrat que hi ha variacions significatives del metabolisme entre diferents llevats l'estudi del metabolisme que es durà a terme a continuació estarà basat, doncs, en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Zimmermann, F.K., Entian, K.D., 1997). Per als altres llevats, en canvi, hi ha un coneixement molt desigual i parcial (Flores C.L. *et al.*, 2000).

1.7.3.1. Rutes catabòliques

(Bailey, James E., Ollis, David F., 1987)

(Zimmermann, F.K., Entian, K.D., 1997)

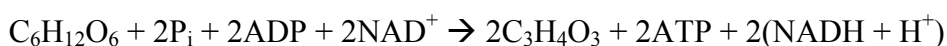
El trencament dels nutrients per a l'obtenció d'energia s'anomena *catabolisme*. Els carbohidrats són el tipus de fonts de carboni més importants en les fermentacions. La majoria dels microorganismes que poden usar els carbohidrats per a fermentar són capaços de fermentar la glucosa. Hi ha com a mínim set rutes diferents de fermentació de la glucosa i la seva presència així com els productes finals d'aquestes depenen dels microorganismes implicats. La utilització com a nutrients d'altres sucres diferents de la glucosa sovint implica una primera conversió d'aquests fins a glucosa o fins a algun dels intermedis de la ruta catabòlica d'aquesta.

Ruta de la glicòlisi

Aquesta ruta inclou deu etapes catalitzades enzimàticament que comencen per la glucosa i acaben en piruvat. Cada etapa és prou simple i inclou una isomerització, la fragmentació de l'anell, o la transferència d'un petit grup com l'hidrogen o el fosfat. Es produeixen dos mols de piruvat per mol de glucosa. L'hidròlisi de l'ATP està acoblada a dues reaccions que d'altra banda no tindrien lloc espontàniament. Dues reaccions més generen prou energia com per poder dur a terme la fosforilació de l'ADP (figures a l'Apèndix 6.8.1). Com que aquestes dues reaccions tenen lloc per duplicat, per cada mol de glucosa processat, l'efecte global resulta en una fosforilació efectiva de l'ADP. La deshidrogenació del gliceraldehid-3-fosfat està acoblada a la reducció de NAD^+ , i aquesta reacció també té lloc dues vegades per cada mol de glucosa. D'aquesta manera, doncs, amb aquesta ruta hi ha un emmagatzematge d'energia química així com una obtenció de poder reductor.

Una altra funció essencial de la ruta de la glicòlisi és la provisió d'esquelets de carboni com a material inicial per a les reaccions cel·lulars biosintètiques. No només pel que fa al piruvat sinó que els altres intermedis de la ruta poden ser emprats com a substrats per a la biosíntesi.

Aquest conjunt de reaccions bioquímiques s'anomena *glicòlisi*. La majoria de reaccions en aquesta ruta estan properes a l'equilibri i ràpidament reversibles. Així, l'estequiometria final de la ruta de la glicòlisi és la següent:

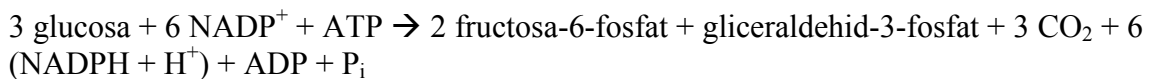


Ruta de la Pentosa Fosfat (Pentose Phosphate Pathway o PPP , també anomenada ruta de l'hexosa monofosfat)

La funció més important d'aquesta ruta, que comença amb l'oxidació de la glucosa fosfat, és l'abastament de la cèl·lula amb NADPH, el qual s'encarrega de transportar electrons a les reaccions biosintètiques. L'efecte net final d'aquesta ruta és la completa oxidació d'un mol de glucosa-6-fosfat alliberant CO₂ i transferint tots els electrons al NADP⁺ (figura a l'apartat 6.8.2 de l'Apèndix). També hi ha un consum d'ATP:



Per tal de proveir a la cèl·lula d'ATP, pot tenir lloc també un cicle incomplet de la ruta de la pentosa fosfat,



Si aquesta fructosa-6-fosfat i el gliceraldehid-3-fosfat a partir d'aquí segueixen la ruta de la glicòlisi fins a piruvat, la fosforilació de l'ADP té lloc sis vegades. L'obtenció neta d'energia és aleshores de 5/3 ATPs per cada mol de glucosa, encara menys que el rendiment energètic de la ruta de la glicòlisi. Tot i així, la ruta de la pentosa fosfat és avantatjosa en el sentit que d'ella s'obté ribosa-5-fosfat i eritrosa-4-fosfat, a més dels seus intermedis, les quals són precursors importants per a la síntesi de les purines i pirimidines. Aquests components no són presents en la ruta de la glicòlisi. És important, doncs, que les cèl·lules puguin disposar de múltiples vies catabòliques per a un mateix nutrient i que puguin emprar més d'una d'aquestes rutes simultàniament per tal d'optimitzar el creixement considerant a la vegada els requeriments energètics així com els dels metabòlits precursors.

La ruta de la pentosa fosfat es pot dividir en dues parts. En la part oxidativa, irreversible, la glucosa-6-fosfat és oxidada fins a ribulosa-5-fosfat i CO₂. El NADPH, que es requereix per a la biosíntesi reductiva, és generat pels dos enzims deshidrogenasa implicats. Degut a què en *Saccharomyces cerevisiae* no s'ha detectat activitat transhidrogenasa, no pot tenir lloc la conversió directa del NADH en NADPH. La part oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat és considerada, doncs, la font principal d'obtenció del NADPH en *Saccharomyces cerevisiae*.

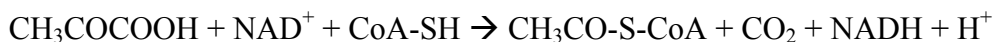
La part no oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat, reversible, la ribulosa-5-fosfat passa a fructosa-6-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat. Com que la glucosa-6-fosfat, la fructosa-6-fosfat i el gliceraldehid-3-fosfat són també intermedis de la ruta de la glicòlisi, aquestes dues rutes estan en estret contacte. Els intermedis de la part no oxidativa de la ruta de les pentoses fosfat es necessiten per a la biosíntesi de diverses molècules. La ribosa-5-fosfat és el precursor del fosforibosil pirofosfat, el qual es necessita en la biosíntesi dels nucleòtids de purina i pirimidina, dels àcids nucleics, de varis coenzims, i dels aminoàcids histidina i triptòfan. L'eritrosa-4-fosfat, un altre dels

intermedis d'aquesta ruta, és el precursor de la síntesi dels aminoàcids aromàtics triptòfan, fenilalanina i tirosina, així com també de la biosíntesi del *p*-aminobenzoat i del *p*-hidroxibenzoat.

La contribució de la PPP al metabolisme de la glucosa és només el 0.9% en cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* creixent en medi ric en glucosa (Gancedo J.M. & Lagunas R., 1973). En medi sintètic augmenta fins al 2.5%, probablement regulat per l'increment de la demanda de NADPH.

1.7.3.2. Cicle del TCA

Les reaccions implicades en la respiració comencen amb el piruvat. En el metabolisme respiratori, aquest piruvat no és reduït fins a un producte final utilitzant els àtoms d'hidrogen obtinguts durant el processament de la glucosa, sinó que aquest poder reductor es reserva per a altres moments. A més, encara es genera més poder reductor a partir del piruvat convertint aquest en Acetil Coenzim A (Acetil CoA), un derivat de l'àcid acètic. La següent reacció està catalitzada pel complex enzimàtic conegut com a complex de la deshidrogenasa pirúvica,



L'Acetil CoA és també un intermedi clau en el catabolisme dels aminoàcids i dels àcids grassos. Com a conseqüència, tres classes de biomolècules poden ser oxidades a través de l'Acetil CoA.

La primera fase d'aquesta oxidació està duta a terme en una seqüència cíclica de reaccions anomenada *cicle dels àcids tricarboxílics (cicle TCA)* (figura a l'apartat 6.8.3 de l'Apèndix). Els dos àtoms de carboni restants (procedents del piruvat, el qual ha perdut un carboni a CO_2 en la reacció a acetil CoA) entren al cicle per a crear àcids de sis àtoms de carboni a partir d'un de només quatre àtoms de carboni (àcid oxalacètic). Després d'una volta al cicle, però, dos àtoms de carboni es perden en forma de molècules de CO_2 . Així, la primera part de la respiració, consumeix tots els àtoms de carboni procedents del substrat original del piruvat.

L'estequiometria global del cicle TCA és la següent:



D'aquesta manera, el cicle TCA sembla tenir una única funció catalítica: no hi ha cap més entrada de carboni a banda de la del substrat inicial. Però aquest cicle, a més, té una funció molt important com a generador de precursors per a les reaccions biosintètiques. Com a conseqüència, alguns intermedis en el cicle estan essent constantment extrets del cicle i cal que siguin restituïts. Això s'aconsegueix amb la síntesi de l'àcid oxalacètic a partir de piruvat o d'algun altre àcid de tres àtoms de carboni. Alternativament, en

alguns microorganismes, com és el cas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, els intermedis del cicle TCA són restablerts amb el *cicle del glioxilat*, el qual té l'efecte net de produir una molècula de succinat per la condensació de dues molècules d'acetat. Estrictament, seria a partir de dues molècules d'Acetil CoA, el qual pot provenir de diferents fonts, però bàsicament de compostos de menys de 2C com ara l'acetat i l'etanol, així com de la degradació d'àcids grassos. És per aquest motiu, que el cicle del glioxilat està sobretot actiu quan les cèl·lules creixen sobre acetat, etanol o oleat-àcid oleic. Això en molts casos ve acompanyat de biogènesi de peroxisomes. El succinat produït passa a oxalacetat i aquest, seguint la gluconeogènesi, arriba a glucosa i pentoses, de manera que el llevat pot construir totes les molècules a partir d'aquestes fonts de carboni.

1.7.3.3. Enzims característics del metabolisme central del carboni en llevats (Zimmermann, F.K., Entian, K.D., 1997)

Piruvat quinasa

L'enzim piruvat quinasa és l'últim en la ruta glicolítica del catabolisme dels sucres. Catalitza la conversió de fosfoenolpiruvat a piruvat per l'addició d'un protó i la pèrdua d'un grup fosfat que es transfereix a l'ADP. La reacció catalitzada per aquest enzim és essencialment irreversible *in vivo* i és un punt molt important de control de la regulació del flux de la part baixa de la glicòlisi que va des de fructosa-1,6-difosfat a piruvat.

La regulació de l'activitat de la piruvat quinasa és particularment important en les cèl·lules o teixits en què poden tenir lloc tant la glicòlisi com la gluconeogènesi depenent de la disponibilitat de diferents fonts de carboni i de l'aportació d'oxigen. Sota condicions d'excés de glucosa, l'activitat de la piruvat quinasa hauria de ser suficientment elevada com per proveir suficient quantitat d'ATP i piruvat, el qual ocupa un rol central en el metabolisme. D'altra banda, sota condicions gluconeogèniques, és necessària una inhibició de la reacció catalitzada per la piruvat quinasa per tal d'evitar un cicle fútil a través dels passos catalitzats per la piruvat carboxilasa i la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa.

La piruvat quinasa del llevat *Saccharomyces cerevisiae* està codificada pel gen *PYK1*. L'activitat de l'enzim piruvat quinasa en llevats està controlada, a banda de la modulació de l'activitat de l'enzim, a nivell de la transcripció i post-transcripció. Tot i que els nivells basals d'expressió de l'enzim són relativament alts, les activitats de la piruvat quinasa en cèl·lules crescudes sobre fonts de carboni fermentables són entre 6 i 20 vegades majors que les crescudes en un medi gluconeogènic.

Varis senyals metabòlics contribueixen a la inducció de l'activitat de la piruvat quinasa. Un augment de les concentracions de metabòlits de la part baixa de la ruta glicolítica sota condicions gluconeogèniques poden induir parcialment la piruvat quinasa, però aquests mateixos metabòlits no són necessaris per a la completa inducció. En canvi, un increment en la concentració de glucosa-6-fosfat, és suficient per a la inducció parcial de l'enzim piruvat quinasa. No obstant, la completa inducció de l'expressió enzimàtica requereix un increment de les concentracions dels metabòlits glucosa-6-fosfat i fructosa-6-fosfat. La regulació de l'expressió del gen *PYK1* és, doncs, complexa, i depèn de les condicions de creixement.

Les propietats bioquímiques de la piruvat quinasa dels llevats suggereixen que aquesta ocupa un rol important en el control de la ruta de la glicòlisi en *Saccharomyces cerevisiae*. A partir d'investigacions *in vitro* s'ha suggerit que les propietats reguladores de la piruvat quinasa, especialment la seva sensibilitat a la fructosa-1,6-difosfat, haurien de ser importants sota condicions tant glicolítiques com gluconeogèniques. Durant el metabolisme amb altes concentracions de glucosa extracel·lular, el contingut intracel·lular en àcids fosfoglicèrids i fosfoenolpiruvat disminueix. A mesura que es va consumint la glucosa i el flux glicolític disminueix, el nivell d'aquests intermedis augmenta, indicant un canvi regulatori en l'activitat de la piruvat quinasa. Les mesures dels continguts intracel·lulars de varis efectors de la piruvat quinasa comprovats *in vitro* confirmen una relació directa, *in vivo*, només entre el nivell de fructosa-1,6-difosfat i l'activitat de la piruvat quinasa. Així doncs, es pot concloure que el control positiu de la piruvat quinasa per la fructosa-1,6-difosfat, la concentració intracel·lular de la qual és baixa durant el creixement en etanol i alta durant el creixement en glucosa, proporciona un mecanisme interruptor entre la glicòlisi i la gluconeogènesi. Baixes quantitats de fructosa-1,6-difosfat bloquejarien la reacció de la piruvat quinasa i quantitats suficients de fosfoenolpiruvat per a proveir el flux gluconeogènic.

Piruvat Descarboxilasa

El piruvat, com a producte final de la glicòlisi, pot ser després degradat per dos enzims diferents. El complex de la piruvat deshidrogenasa converteix el piruvat a CO_2 i Acetil CoA, el qual és després metabolitzat en el cicle TCA i completament degradat a CO_2 . La piruvat descarboxilasa, en canvi, catalitza la primera reacció, irreversible, que condueix a la producció d'etanol, amb la formació de CO_2 i d'acetaldehid, el qual a la vegada serà reduït a etanol per l'enzim alcohol deshidrogenasa. El repartiment del piruvat entre aquestes dues vies possibles sembla que està molt ben controlat. Les diferències entre la capacitat i afinitat dels dos enzims pel mateix substrat comú, el piruvat, contribueix a aquest control: la piruvat deshidrogenasa té aproximadament deu vegades més afinitat però també deu vegades menys capacitat que la piruvat descarboxilasa. Això significaria que, sota condicions limitants de disponibilitat de piruvat, la majoria d'aquest és degradat via piruvat deshidrogenasa. Mentre que si el piruvat es troba en nivells alts, per exemple durant la fermentació de sucres, la quantitat de piruvat en excés que supera la capacitat de la piruvat deshidrogenasa estaria disponible per a la reacció de la piruvat descarboxilasa i seria metabolitzat a etanol. Tanmateix, aquesta aproximació tan simple no té en compte que el flux que va al cicle TCA disminueix durant la fermentació dels sucres degut a la repressió per glucosa de les funcions mitocondrials, mentre que s'incrementa la inducció de l'expressió del gen de la piruvat descarboxilasa. Així, la capacitat de les dues rutes alternatives sembla més dirigida cap a la piruvat descarboxilasa quan la glucosa, i per tant el piruvat, és abundant. Així doncs, els mecanismes reguladors obren o tanquen una determinada via alternativa, les quals estan només operatives sota unes determinades condicions fisiològiques. D'altra banda, cap de les dues rutes sembla completament eliminada sota cap d'aquestes condicions, ja que, per exemple, un determinat flux cap a la branca mitocondrial és necessari per a assegurar la producció de precursors per a les vies biosintètiques.

Així doncs, l'activitat de la piruvat deshidrogenasa és més alta en les cèl·lules crescudes en glucosa que en etanol. Aquesta inducció per glucosa ha estat demostrat que és deguda a l'elevada expressió dels gens estructurals *PDC1* i *PDC5* en un anàlisi de

Northen blot com per estudis de regulació dels promotors dels gens. Aparentment, el nivell basal de *PDC* en etanol difereix bastant entre diferents espècies de llevats, donant lloc a quocients d'inducció que varien entre 4 i 50. La inducció per glucosa és també evident en l'expressió d'altres gens que codifiquen enzims de la part baixa de la glicòlisi i per a l'alcohol deshidrogenasa.

Rutes des de Piruvat fins a Acetil Coenzim A i Oxalacetat

El piruvat, producte final de la glicòlisi, és un metabòlit important que participa en varies reaccions. Dues d'aquestes produeixen intermedis que alimenten el TCA com són l'Acetil CoA i l'oxalacetat. Tant en l'anabolisme com en el catabolisme aeròbic, la conversió a Acetil CoA és una reacció molt important del piruvat. L'oxidació completa de l'Acetil CoA en el TCA és la font principal d'energia sota condicions aeròbiques. A més, l'AcCoA es requereix en la biosíntesi dels àcids grassos i molts aminoàcids. Els intermedis del TCA consumits per a la biosíntesi són reposats per l'acció de la piruvat carboxilasa. Aquest enzim produeix oxalacetat a partir de piruvat i CO₂.

La conversió de piruvat en Acetil CoA pot dur-se a terme directament per la via del complex de la piruvat deshidrogenasa, un complex multienzimàtic **localitzat a la mitocòndria** en *Saccharomyces cerevisiae* (Maaheimo H. *et al.*, 2001). Alternativament, l'Acetil CoA pot formar-se a partir de piruvat via l'acetaldehid i l'acetat. Els enzims implicats en aquest “bypass” són la piruvat descarboxilasa, l'acetaldehid deshidrogenasa i l'acetil-coenzim A sintasa. Aquesta ruta **es creu que té lloc al citosol** en *Saccharomyces cerevisiae*. La primera etapa d'aquest anomenat “bypass” és la conversió del piruvat en acetaldehid per la piruvat descarboxilasa. L'activitat de la piruvat descarboxilasa és tres o quatre vegades major en un medi de glucosa que d'etanol. L'Acetil CoA citosòlic pot ser transportat a través de la membrana mitocondrial per la llançadora de la carnitina. L'acció combinada d'aquests enzims estalvia completament la necessitat d'Acetil CoA format a la mitocòndria, i per això el nom de “bypass”.

Complex de la piruvat deshidrogenasa

El complex de la piruvat deshidrogenasa, abreviat PDH o també PDC, és un gran complex multienzimàtic. Pertany a una classe d'enzims que catalitzen la descarboxilació oxidativa d' α -cetoàcids mitjançant l'àcid lipoic. Tres d'aquests complexos enzimàtics han estat identificats. Són específics per al piruvat (PDH), per a l' α -cetoglutarat (complex KGD) o per a α -cetoacids de cadena ramificada.

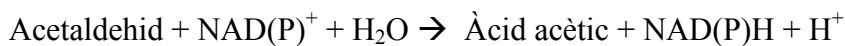
Malgrat les variacions en l'estructura, localització i composició en diferents organismes, els components essencials i l'estructura del complex piruvat deshidrogenasa està remarcablement conservat. Per l'acció concertada dels tres enzims en el complex, la piruvat deshidrogenasa (E1), la dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2) i la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3), el piruvat és convertit a Acetil CoA. En el pas final, l'oxidada lipoamida es regenera per l'acció de l'E3 utilitzant NAD⁺ i FAD com a cofactors. La reacció neta és doncs:



Actualment no està encara clar què determina el flux a través del complex de la piruvat deshidrogenasa, PDH o “bypass”. S’ha postulat el següent: degut a la major afinitat del complex PDH de la mitocòndria pel piruvat en comparació amb la piruvat descarboxilasa citosòlica, la majoria del piruvat fluirà a través de la PDH quan hi hagi baixes concentracions de glucosa i per tant, baixes concentracions de piruvat. A concentracions de glucosa més elevades, cada vegada hi haurà més conversió del piruvat en acetaldehid, el qual anirà a Acetil CoA a través del “bypass”. Encara a concentracions més altes de glucosa, l’activitat de l’ACS (acetil coenzim A sintasa) esdevindrà limitant, i l’acetaldehid també serà convertit a etanol i així iniciant la fermentació. A més de la diferència pel que fa a les afinitats pel piruvat, la inducció tres o quatre vegades major de la piruvat descarboxilasa a elevades concentracions de glucosa i la reducció de l’activitat de l’acetaldehid deshidrogenasa sota aquestes mateixes condicions també deuen jugar un paper important. Investigacions més recents han trobat que, a baixes concentracions de glucosa, el piruvat és majoritàriament convertit a Acetil CoA per la PDH. Com que l’acetil coenzim A sintasa converteix una molècula d’ATP en AMP per cada molècula d’Acetil CoA formada, el “bypass” és menys eficient energèticament. Com a conseqüència, el rendiment de la cèl·lula serà menor.

Aldehid deshidrogenasa (“bypass”)

L’oxidació de l’acetaldehid a àcid acètic és duta a terme per dos isoenzims.



Les dues acetaldehid deshidrogenases en *Saccharomyces cerevisiae* poden distingir-se pels seus cofactors. Un isoenzim utilitza exclusivament NADP^+ mentre que el segon té una afinitat molt més elevada pel NAD^+ tot i que també accepta NADP^+ . Tots dos enzims semblen estar reprimits per glucosa a jutjar per la disminució en la seva activitat a mesura que augmenta la velocitat de dilució en cultius en *quimiostat*.

Acetil Coenzim A sintasa (“bypass”)

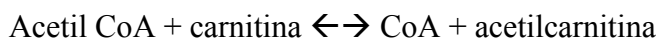
La conversió de l’acetat en Acetil CoA és facilitada per l’acetil Coenzim A sintasa (ACS). La reacció obté l’energia necessària de la conversió de l’ATP en AMP:



Primers estudis indicaven que, en *Saccharomyces cerevisiae*, hi havia presents dues formes diferents de l’enzim. En cultius considerats no aeròbics, la majoria de l’activitat de l’ACS era present en la fracció microsomal, però en la fase estacionària l’activitat de cèl·lules de cultius aeròbics estava associada principalment a la mitocòndria.

Llançadora de la carnitina (“bypass”)

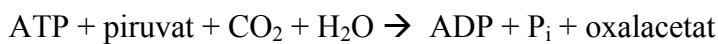
L’enzim carnitina acetiltransferasa (CAT) catalitza l’intercanvi de grups acetil entre la carnitina i l’Acetil CoA, ambdós **en la matriu mitocondrial i en el citosol** en *Saccharomyces cerevisiae*:



Juntament amb la carnitina acetiltranslocasa controlen la relació d'Acetil CoA/CoA en els dos compartiments cel·lulars. En els eucariotes superiors, una llançadera de carnitina és present, també, en els peroxisomes. En cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* crescudes sobre àcid oleic, el qual provoca la inducció dels peroxisomes, l'activitat de la CAT s'incrementa deu vegades en comparació amb les cèl·lules crescudes sobre glucosa. Estudis posteriors van mostrar que l'activitat està aproximadament repartida a parts iguals entre la mitocondria i els peroxisomes.

Piruvat carboxilasa

L'enzim piruvat carboxilasa catalitza la reacció del piruvat amb el CO₂ per donar oxalacetat:



L'**oxalacetat és transportat a través de la membrana mitocondrial** i incorporat al cicle del TCA per reposar els intermedis que es van consumint per a la biosíntesi. La piruvat carboxilasa és dependent de la biotina en eucariotes superiors i fongs. L'enzim està **localitzat exclusivament al citosol** en *Saccharomyces cerevisiae*.

1.7.4. Gluconeogènesi i cicle del glioxilat

La cadena glicolítica és la ruta principal del metabolisme dels carbohidrats en els llevats però també té un paper important durant el creixement en altres fonts de carboni diferents dels sucres, com l'etanol, la glicerina, el priuvat, etc. Com que els components cel·lulars essencials es deriven dels fosfats dels sucres, el creixement sobre altres fonts de carboni requereix la síntesi de sucres a partir dels precursors. Aquest procés es coneix amb el nom de *gluconeogènesi*. Aquesta implica la reversió de totes, o algunes, de les reaccions glicolítiques, depenent del nivell al qual aquest substrat no sucre s'incorpora a la ruta glicolítica. La majoria de les reaccions de la glicòlisi són reversibles sota condicions fisiològiques i, en general, el mateix tipus d'enzim és utilitzat durant el creixement en sucres fermentables o en fonts de carboni no sucres, no fermentables. Tot i així, hi ha dues reaccions en la cadena glicolítica que no poden ser revertides durant la gluconeogènesi degut a les concentracions desfavorables del substrat disponible per la cèl·lula. Aquestes són les reaccions catalitzades per la fosfofructoquinasa i per la piruvat quinasa. Per estalviar-se aquestes reaccions durant la gluconeogènesi, *altres* reaccions catalitzades per *altres* enzims han estat seleccionades. La formació de fosfoenolpiruvat s'assoleix a partir d'oxalacetat, consumint energia en forma d'ATP (en altres organismes s'utilitza GTP), i la formació de fructosa-6-fosfat a partir de fructosa-1,6-difosfat ocorre a través d'una reacció d'hidròlisi. Els enzims que catalitzen aquestes etapes són la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) i la fructosa-1,6-difosfatasa (FbPase). Depenent de la natura de la font de carboni no sucre, poden ser necessaris enzims auxiliars addicionals. En particular, els enzims del cicle del glioxilat són necessaris per al metabolisme dels compostos de dos carbonis, de manera que aquests enzims es poden considerar gluconeogènics.

La gluconeogènesi i el cicle del glioxilat són necessaris per a la biosíntesi del fosfat dels sucres quan les cèl·lules creixen sobre substrats no fermentables C2 i C3 així com àcids grassos. Com que aquests metabòlits de la glicòlisi són més convenientment produïts en

presència de glucosa o altres sucres fàcilment fermentables, la síntesi de tots els enzims gluconeogènics i del cicle del glioxilat està fortament reprimida sota aquestes condicions.

En *Saccharomyces cerevisiae* els **enzims del cicle del glioxilat estan localitzats en el citoplasma**. Aquesta situació és diferent a la dels llevats que usen alcans, com *Candida tropicalis*, on l'isocitrat liasa i la malat sintasa s'ha vist que es troben **als peroxisomes**. El cicle del glioxilat proveeix la gluconeogènesi d'oxalacetat. Aquest és descarboxilat per la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) per donar fosfoenolpiruvat, el qual és el primer metabòlit comú de la gluconeogènesi i la glicòlisi.

Els enzims gluconeogènics fructosa-1,6-difosfat i fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) distingeixen la gluconeogènesi de la glicòlisi. Els enzims claus del cicle del glioxilat estan codificats pels gens *ICL1* (isocitrat liasa), *MLS1* (malat sintasa) i *MDH2* (malat deshidrogenasa, citosòlica). Un segon gen de la malat sintasa específicament requerit per a la degradació d'allantoin és codificat per *DAL7*.

1.7.4.1. Enzims gluconeogènics

Fructosa-1,6-difosfatasa (FbPase)

Aquest enzim catalitza la hidròlisi de la fructosa-1,6-difosfat a fructosa-6-fosfat i fosfat inorgànic, reacció que es requereix per al metabolisme de tots els substrats gluconeogènics. Mentre que els diferents substrats utilitzaran diferents enzims gluconeogènics en les etapes inicials del metabolisme, tots utilitzaran la FbPase com a pas final.

L'enzim està subjecte a múltiples mecanismes de regulació en *Saccharomyces cerevisiae*. Està inhibit per AMP, per exemple. En les cèl·lules creixudes sobre glucosa, l'enzim FbPase no es sintetiza (repressió per catabolít) i l'addició de glucosa a cèl·lules que contenen FbPase indueix una ràpida inactivació de l'enzim (inactivació per catabolít). S'han vist diferències en aquests mecanismes de regulació per a diferents llevats, però no s'ha estudiat específicament el cas dels llevats metilotròfics.

Fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK)

L'enzim PEPCK catalitza la formació de fosfoenolpiruvat (PEP) a partir d'oxalacetat. És dependent de l'ATP i difereix en aquest fet de l'enzim d'altres organismes el qual depèn del GTP. Potser el mecanisme principal de regulació de la seva activitat és la concentració del seu substrat, l'oxalacetat. L'afinitat de l'enzim per l'oxalacetat sembla que sigui baixa tot i que els valors recollits són variats. Tal i com ocorre amb la FbPase, els nivells de PEPCK estan regulats per la repressió per catabolít així com per la inactivació per catabolít.

L'enzim PEPCK en els llevats està **localitzat al citosol** a diferència d'algunes espècies animals on l'enzim es troba a la mitocondria. Els mutants que no disposen de l'enzim PEPCK no poden créixer sobre fonts de carboni de 2C o sobre piruvat o lactat però sí, en canvi, sobre glicerina. En llevats, l'única manera de sintetitzar PEP en la gluconeogènesi és a través de la PEPCK, una situació diferent de la que es troba en *Escherichia coli*, on a més de la PEPCK existeix la PEP-sintasa.

Isocitrat liasa (cicle del glioxilat)

La isocitrat liasa catalitza el trencament de l'isocitrat a glioxilat i succinat. Aquest enzim es requereix en el creixement sobre compostos 2C així com pel creixement sobre alcans en llevats capaços d'usar-los. El **més probable és que l'enzim en *Saccharomyces cerevisiae* sigui citosòlic** ja que fins i tot després del creixement del llevat sobre àcid oleic, el qual indueix els peroxisomes, no es troba isocitrat liasa en aquests orgànuls. En canvi, aquest enzim en *Hansenula polymorpha* i *Candida tropicalis* sembla que es troba als peroxisomes. No s'ha descrit cap mecanisme de regulació alostèric per a la isocitrat liasa però l'enzim està sotmès tant a la repressió per catabolít com a la inactivació per catabolít.

Malat sintasa (cicle del glioxilat)

L'enzim malat sintasa catalitza la formació de malat a partir de glioxilat i Acetil CoA. S'han identificat dos gens que codifiquen per a dos isoenzims de la malat sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*. Un d'ells és regulat per la font de nitrogen, mentre que l'altre, tal com s'espera per la seva participació en el cicle del glioxilat, és reprimit per glucosa. **No es disposa encara de la informació sobre les característiques bioquímiques així com de les localitzacions dels dos isoenzims en *Saccharomyces cerevisiae*.** Tot i així, com que s'ha trobat malat sintasa tant en els peroxisomes com en el citoplasma, es podria pensar que els dos isoenzims tenen rols fisiològics diferents. A més, s'ha suggerit que encara un altre gen podria codificar per la malat sintasa en *Saccharomyces cerevisiae*, però no està clar que tots els llevats tinguin més d'un gen/isoenzim per a una mateixa reacció, tampoc en aquest cas específic (Flores C.L. *et al.*, 2000).

Enzim màlic

El piruvat citosòlic que es produeix al citosol per la glicòlisi i pot ser transportat dins de la mitocondria generant, d'aquesta manera, piruvat mitocondrial. Però el piruvat mitocondrial també pot ser també sintetitzat a partir del malat per l'enzim màlic. En *Saccharomyces cerevisiae* aquest enzim pot necessitar com a cofactor o bé el NADH o el NADPH. El gen que codifica aquest enzim màlic s'ha identificat recentment i s'ha vist que està **localitzat exclusivament a la mitocondria** en *Saccharomyces cerevisiae* (Boles E. *et al.*, 1998).

Es pot aprofundir en el coneixement del metabolisme central del carboni per a *Saccharomyces cerevisiae* a partir de la bibliografia (Michal G., 1998; Zimmermann, F.K. & Entian, K.D., 1997) i les bases de dades següents:

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index>

<http://wit.mcs.anl.gov/WIT2/CGI/index.cgi>

<http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html>

<http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/index.html>

1.7.5. Repressió i inactivació per catabolit

(Zimmermann, F.K., Entian, K.D., 1997)

Repressió per catabolit

Hi ha altres qüestions relacionades amb els enzims gluconeogènics, els quals no estan presents en els llevats que creixen en presència de glucosa. La seva absència va en paral·lel amb nivells molt baixos dels seus corresponents mRNAs. Aquests nivells tan baixos podrien ser deguts a un bloqueig en la transcripció del DNA, a un descens en l'estabilitat dels mRNA quan la glucosa està present o a una combinació d'ambdós efectes. Encara que s'hagi vist que la glucosa incrementa la conversió de l'mRNA del *PCK1* (fofoenolpiruvat carboxiquinasa), l'efecte principal de la glucosa sembla que està a nivell de la transcripció. A més de la repressió per glucosa, la inducció per una font de carboni 2C podria ser operativa per al gen de l'isocitrat liasa i el gen de la malat sintasa ja que els nivells de mRNA corresponents són més baixos en llevats crescuts sobre glicerina que en llevats crescuts en acetat o etanol, és a dir, que els nivells de repressió són diferents segons el substrat, anant de major repressió a menor per a la glucosa, la glicerina i l'acetat/etanol.

Inactivació per catabolit

L'expressió "inactivació per catabolit" va ser introduïda per analogia amb la de "repressió per catabolit" per designar el procés de ràpida inactivació de l'enzim d'un llevat després de l'addició al medi de glucosa. Aquest efecte afecta a una sèrie de sistemes diferents, des d'enzims gluconeogènics fins a molècules de transport. La característica de la inactivació per catabolit comú a tots els sistemes estudiats fins ara és la seva irreversibilitat: en tots els casos, la recuperació de l'activitat perduda requeria la síntesi de proteïnes. Molt probablement la proteolisi de la proteïna estigui implicada en la inactivació, però, donat que no es detecten productes de degradació intermedis d'aquest trencament, s'ha suggerit que la reacció proteolítica inicial és la limitant de la velocitat. La inactivació de la fructosa-1,6-difosfat ha estat el procés més àmpliament estudiat, mentre que, per exemple, el cas de la malat deshidrogenasa no ho ha estat tant, segurament donada la presència d'isoenzims estables que poden emmascarar el procés.

L'addició de glucosa a cèl·lules que creixen en fonts de carboni no fermentables causa una ràpida caiguda de l'activitat de la FbPase. S'ha observat que la FbPase i la PEPCK comparteixen el mateix sistema d'inactivació que té una capacitat limitada, mentre que la malat deshidrogenasa és degradada per un sistema diferent. Malgrat tot, els resultats obtinguts amb la malat deshidrogenasa no són completament consistents amb aquesta idea.

La inactivació per catabolit de la FbPase no s'observa en el llevat *Schizosaccharomyces pombe* malgrat la gran homologia entre les seqüències de l'enzim d'aquest llevat i el de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquesta absència de la inactivació per catabolit podria ser deguda o bé a una falta del sistema degradatiu en *Schizosaccharomyces pombe* o a algunes característiques específiques de la proteïna de *Saccharomyces cerevisiae* que no estan presents en l'enzim de *Schizosaccharomyces pombe*. Així doncs, l'expressió en *Saccharomyces cerevisiae* de l'enzim de *Schizosaccharomyces pombe* podria proporcionar informació sobre els determinants de la inactivació. L'enzim de *Schizosaccharomyces pombe* no era inactivat en *Saccharomyces cerevisiae* i la FbPase

d'*Escherichia coli* expressada en *Saccharomyces cerevisiae* també era reàcia a la inactivació. Malgrat que els diferents enzims mostraven un alt grau d'homologia, les seves diferències estaven disperses al llarg de la molècula dificultant la localització precisa dels determinants de la degradació.

La informació sobre la inactivació per catabolít d'altres enzims gluconeogènics és menys extensa. Mentre que no hi ha informació sobre la inactivació de la malat sintasa, tant la PEPCK com la isocitrat liasa estan subjectes a la inactivació per glucosa i la inactivació de la PEPCK és irreversible. Tot i que s'ha descrit una forma fosforilada de la PEPCK, no hi ha hagut més treballs sobre el possible significat d'aquesta modificació postranscripcional. La isocitrat liasa, però, es fosforila després de l'addició de glucosa. Aquesta fosforilació causa una disminució, que és reversible, en l'activitat.

Com s'ha indicat abans, la inactivació per catabolít no està restringida només als enzims gluconeogènics sinó que també s'ha descrit per a la malat deshidrogenasa i per als transportadors de sucres. En el cas de la malat deshidrogenasa, **només l'enzim citoplasmàtic** sembla que estigui sotmès a la inactivació per catabolít.

Significat fisiològic dels mecanismes regulatoris que afecten els enzims gluconeogènics

Mentre que els enzims gluconeogènics es requereixen per al creixement en fonts de carboni no sucres, són completament dispensables en presència de glucosa, i fins i tot podrien ser perjudicials en aquestes circumstàncies ja que podrien permetre l'operació dels cicles fútils. Un cicle fútil té lloc sempre que el producte d'una quinasa és el substrat d'una fosfatasa i els dos enzims operen simultàniament. El balanç net de la reacció és la hidròlisi de l'ATP amb la producció d'ADP i fosfat. La raó de ser de la repressió i la inactivació per catabolít, almenys per a la FbPase i la PEPCK, s'ha pensat que és la d'evitar aquests cicles fútils.

En llevats creixent en glicerina, la PEPCK s'expressa tot i que no és necessària, i l'enzim antagònic, la piruvat quinasa és funcional sota aquestes condicions. Estudis de la inactivació de la malat deshidrogenasa van trobar que un llevat amb una forma truncada de la malat deshidrogenasa 2, la qual interfereix amb la inactivació per catabolít d'altres enzims, mostrava un creixement retardat durant el canvi de medi amb acetat a medi amb glucosa.

Per explicar el significat fisiològic d'aquesta inactivació per catabolít, s'ha pensat que els aminoàcids derivats de la proteïna degradada han de ser reutilitzats pel llevat. Malgrat que aquest punt encara no ha estat provat es pot concloure que un llevat que mostra una inactivació per catabolít té algun avantatge en competició amb altres soques que no han desenvolupat aquest tipus de control.

Repressió per glucosa en llevats

En *Saccharomyces cerevisiae* i llevats relacionats, la repressió per glucosa és un sistema altament complex i descriu l'adaptació de les activitats enzimàtiques a nivell de transcripció dels respectius gens a la font de carboni preferent, generalment glucosa. El mecanisme de regulació és prou diferent del que es troba a *Escherichia coli*. El llevat *Saccharomyces cerevisiae* pot utilitzar diverses fonts de carboni pel seu creixement. Depenent de la font de carboni accessible, s'activen diferents enzims i rutes

metabòliques. En presència d'etanol o altres fonts de carboni no fermentables, l'energia l'ha de proveir la cadena respiratòria, i com a conseqüència, les molècules C6 s'han de sintetitzar per gluconeogènesi. En *Saccharomyces cerevisiae* el cicle del glioxilat és la major part de la gluconeogènesi i proveeix oxalacetat, el qual és descarboxilat per la fosfoenolpiruvat carboxiquinasa (PEPCK) fins a fosfoenolpiruvat, l'intermedi comú de la gluconeogènesi i la glicòlisi. Exceptuant la fructosa-1,6-difosfatasa, totes les altres reaccions enzimàtiques de la gluconeogènesi es comparteixen amb la glicòlisi.

En presència de glucosa, les condicions metabòliques són completament diferents. La glicòlisi és la ruta que obté un major rendiment energètic i es produeix etanol. Els gens de tots els enzims específicament necessaris per a la gluconeogènesi (incloent els del cicle del glioxilat) deixen d'ésser transcrits. Els altres enzims subjectes a la repressió per glucosa són els de la cadena respiratòria, la majoria dels àcids del cicle TCA, els enzims de la β -oxidació del peroxisoma, els enzims que utilitzen disacàrids com a substrats i els enzims involucrats en el metabolisme de la galactosa.

1.7.6. Utilització de la glicerina pels llevats

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* pot utilitzar la glicerina com a única font de carboni. Sorprenentment, la seva velocitat de creixement amb glicerina és considerablement menor comparada amb la que presenta sobre etanol. El creixement en glicerina requereix una glicerina quinasa per produir glicerina-3-fosfat, el qual és després oxidat a dihidroxiacetona fosfat per una glicerina-3-fosfat deshidrogenasa mitocondrial (situada a la cara externa de la membrana mitocondrial) que depèn del FAD.

La glicerina pot ser emprada com una font de carboni sota condicions de creixement aeròbiques per moltes espècies de llevats, però, a més, en *Saccharomyces cerevisiae* i altres llevats té un paper clau en l'osmoregulació (Nevoigt, E., & Stahl, U., 1997).

En el llevat *Pichia pastoris*, la glicerina és una font de carboni emprada comunament en cultius de producció de proteïnes heteròlogues a elevada densitat cel·lular (Cregg J.M. *et al.*, 1993; Lin Cereghino J. & Cregg J.M., 2000). La ruta catabòlica de la glicerina inclou la difusió passiva a través de la membrana cel·lular, la fosforilació per una glicerina quinasa i l'oxidació per una fosfat-ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial. Aquesta ruta ha estat majoritàriament estudiada i caracteritzada per als llevats *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* (Flores C.L. *et al.*, 2000). Per al llevat *Schizosaccharomyces pombe* s'ha descrit una ruta alternativa d'assimilació de la glicerina que inclou una glicerina deshidrogenasa unida al NAD^+ i una dihidroxiacetona quinasa, així com en *Saccharomyces cerevisiae* creixent sobre condicions d'elevada concentració salina al medi de cultiu (Norbeck J. & Blomberg A., 1997).

1.7.7. Transportadors de metabòlits a través de les membranes mitocondrial i del peroxisoma

En *Saccharomyces cerevisiae*, l'oxalacetat es produeix tant com a intermedi del cicle del TCA en la matriu mitocondrial a partir del malat (i així, donant oxalacetat mitocondrial), com a partir del piruvat citosòlic per l'acció de la piruvat carboxilasa al citosol (i per tant, generant oxalacetat citosòlic). Per assegurar l'aportació anapleròtica del cicle TCA, l'oxalacetat citosòlic és transferit a través de la membrana mitocondrial per la proteïna portadora de l'oxalacetat (OAC o *oxaloacetate carrier*) (Indiveri C. *et*

al., 1998) de manera que es reomple el *pool* d'oxalacetat mitocondrial. Aquest transport està conduït per la força motriu dels protons en la part interna de la membrana mitocondrial, és a dir, que l'oxalacetat és transferit de forma activa a través de la membrana (figura 4.3.3-1 dels resultats). Aquesta forma d'operar indica una transferència unidireccional des del citosol fins al mitocondri.

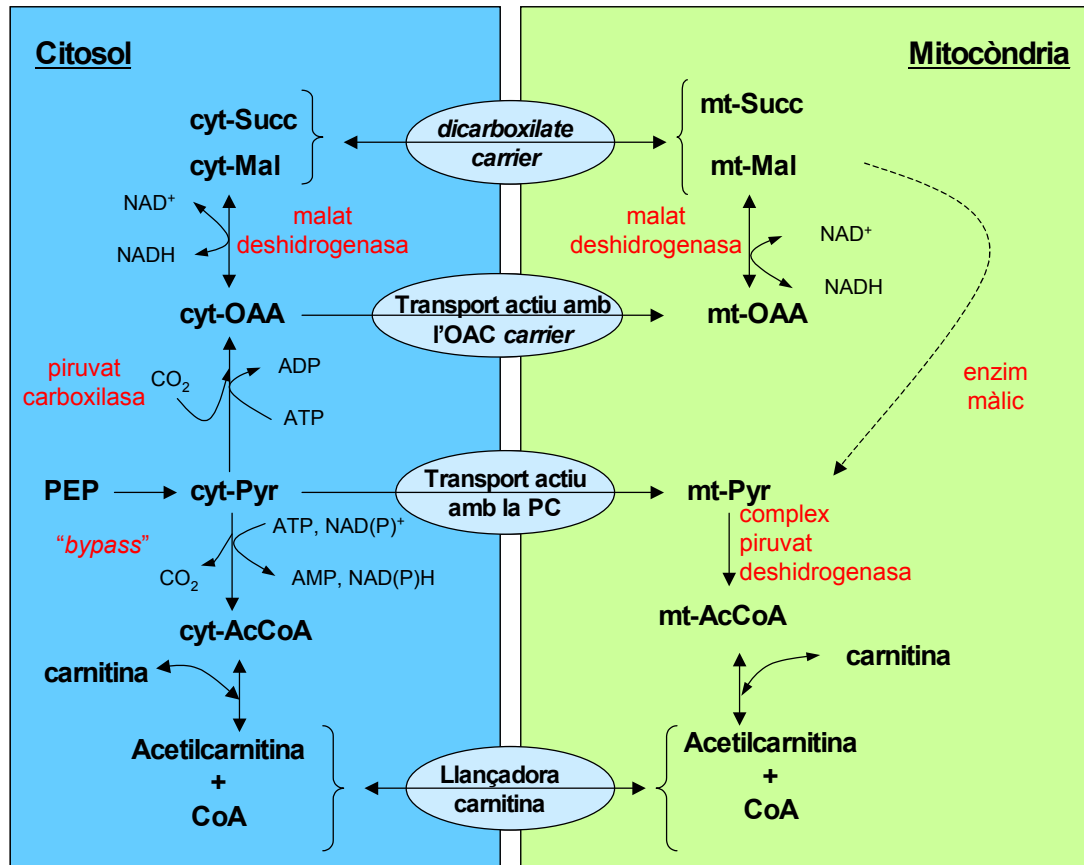
El rol fisiològic del transportador OAC és, doncs, el transport unidireccional de l'oxaloacetat citoplasmàtic cap a la mitocondria amb intercanvi de ions hidroxil. També pot catalitzar reaccions d'intercanvi de substrats; concretament s'ha postulat un altre possible rol: la transferència d'equivalents reductors des de la mitocondria al citoplasma mitjançant la catàlisi d'un intercanvi malat/oxaloacetat quan les concentracions intramitocondrials de malat i NADH són altes (és a dir, la llançadora malat-oxaloacetat) (Bakker, B.M. *et al.*, 2001).

El piruvat citosòlic es produeix al citosol per la glicòlisi i una part d'aquest és transportat dins de la mitocondria generant, d'aquesta manera, piruvat mitocondrial, malgrat que aquest també pot ser sintetitzat a partir del malat per l'enzim màlic. El piruvat és transportat des del citosol fins a la mitocondria per la proteïna portadora del piruvat (PC). Aquest transport és activament conduït per la força motriu mitocondrial del protó, cosa que suggereix, doncs, un transport del piruvat altament unidireccional des del citosol fins a la mitocondria.

També cal tenir en compte el transportador DIC (*dicarboxylate carrier*), el qual s'encarrega del transport, o intercanvi electroneutre mitjançant una reacció de ions dicarboxilats (com per exemple el malat i el succinat), de manera que s'intercanvia aquest dicarboxilat per P_i . El rol fisiològic d'aquest transportador DIC és el transport de dicarboxilats citoplasmàtics cap a la matriu mitocondrial, amb la funció de proporcionar intermedis del TCA, important-los del citosol a la mitocondria.

Pel que fa a l'Acetil CoA, l'Acetil CoA mitocondrial i el citosòlic, provenen del piruvat mitocondrial (a partir del complex de la piruvat deshidrogenasa) i citosòlic (per la via de la ruta citosòlica del "bypass", la primera reacció de la qual està catalitzada per la piruvat descarboxilasa), respectivament. Quan *Saccharomyces cerevisiae* està creixent únicament en glucosa, s'espera que tot l'Acetil CoA provingui exclusivament del piruvat. L'Acetil CoA pot creuar la membrana mitocondrial per la via de la llançadora de la carnitina (Van Roermund C.W.T. *et al.*, 1999) (apartat 1.7.3 d'aquesta Introducció). En aquesta, la carnitina acetiltransferasa (CAT) (Indiveri C. *et al.*, 1998) catalitza l'intercanvi dels grups acetil entre la carnitina i l'Acetil CoA (el qual no pot per ell mateix travessar la membrana mitocondrial), i l'acetil translocasa. L'acetil translocasa representa un sistema carnitina/acetilcarnitina que serveix per compensar els *pools* d'Acetil CoA mitocondrial i citosòlic per difusió facilitada (Maaheimo H. *et al.*, 2001). Aquesta llançadora de la carnitina també s'ha vist que participa en el transport d'Acetil CoA a través de la membrana dels peroxisomes, amb la mateixa funció i mecanisme (Bakker B.M., 2001; Hettema E.H. & Tabak H.F., 2000; Palmieri, L. *et al.*, 1999; Van Roermund C.W.T. *et al.*, 1995).

Es pensa que existeixen mecanismes de transport equivalents als descrits per a la mitocondria per al peroxisoma, però exceptuant aquest mecanisme de transport de l'AcCoA, encara no han estat caracteritzats (Van Roermund C.W.T. *et al.*, 1995).



1.7.8. Síntesi dels aminoàcids

Hi ha vuit intermedis diferents que uneixen el metabolisme central del carboni amb la biosíntesi dels aminoàcids: 3-fosfoglicerat (3PG), oxaloacetat (OAA), piruvat (Pyr), 2-oxoglutarat (OxGlu), ribosa-5-fosfat (R5P), Acetil Coenzim A (AcCoA), fosfoenolpiruvat (PEP) i eritrosa-4-fosfat (E4P).

El primer que cal tenir en compte quan s'estudien les rutes de síntesi dels aminoàcids en cèl·lules eucariotes, és la compartimentalització o localització subcel·lular del conjunt de molècules, o *pool*, de precursors a partir del qual es generen certs grups d'aminoàcids o famílies. Els aminoàcids que es generen a partir del Pyr, l'AcCoA i l'OAA poden ser sintetitzats a partir dels *pools* mitocondrials o citosòlics d'aquests (figura 3.5.3-1). La identificació de la localització subcel·lular dels intermedis de la biosíntesi dels aminoàcids requereix el coneixement de la localització dels enzims que catalitzen la seva incorporació en l'esquelet de carboni d'aquests aminoàcids (Michal G., 1998).

Les rutes de síntesi dels diferents aminoàcids a partir dels seus precursors o intermedis del metabolisme central del carboni es poden consultar amb detall a les figures de l'apartat 6.8.4 de l'Apèndix.

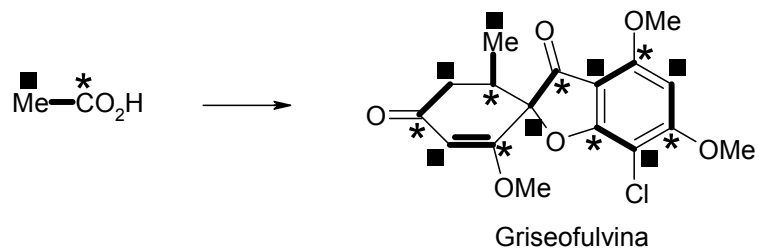
1.8. RMN de ^{13}C i estudis de metabolisme

1.8.1. Introducció general i històrica

La investigació de rutes metabòliques mitjançant administració de precursors marcats amb ^{13}C i seguiment per RMN de ^{13}C és una tècnica emprada des de fa molts anys en estudis de metabolisme secundari (Simpson T.J., 1975, Simpson T.J., 1987), que també ha trobat més recentment utilitat en estudis quantitius de metabolisme primari i intermediari dins del camp de l'enginyeria bioquímica i de l'anàlisi de fluxos metabòlics (Schmidt K., 1999; Wiechert W., 2001; Shachar-Hill Y., 2002), i fins i tot en l'estudi de plantes senceres (Shachar-Hill Y., 2002, Ratcliffe R.G. *et al.*, 2001). Ja des dels estudis inicials (Simpson T.J., 1975, Simpson T.J., 1987) es va fer palesa la superioritat del marcatge amb isòtops estables (p.ex., ^{13}C) en comparació amb el marcatge amb isòtops radioactius (p.ex., ^{14}C). Així, emprant precursors monomarcats (p.ex., els clàssics [1- ^{13}C]-acetat o [2- ^{13}C]-acetat), la senzilla determinació d'un espectre RMN permet assignar immediatament les posicions d'un metabòlit o família de metabòlits) en les quals hi ha hagut incorporació de l'isòtop, mitjançant l'augment d'intensitat del senyal corresponent, una informació que sovint està disponible el mateix dia en què s'aïlla el metabòlit en qüestió. Cal comparar això amb les llargues i tedioses degradacions, sovint múltiples (que a més han de ser quantitatives), necessàries per localitzar la radiomarca en experiments emprant radioisòtops.

A més, la utilització de substrats multimarcats amb ^{13}C (com, p.ex., el clàssic [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-acetat) dona informació addicional que no es pot obtenir emprant radioisòtops, ja que permet seguir la incorporació dins del metabòlit d'enllaços carboni-carboni intactes (Simpson T.J., 1975, Simpson T.J., 1987), mitjançant la mesura de constants d'acoblament ^{13}C - ^{13}C , $^1\text{J}_{\text{CC}}$. Aquestes constants d'acoblament únicament presenten valors significatius (30-60 Hz per enllaços simples; 50-100 Hz per enllaços dobles) si els dos isòtops ^{13}C estan directament units per enllaç químic. Com que l'abundància natural del ^{13}C és d'un 1.1%, la probabilitat que dos carbonis consecutius dins una molècula a abundància natural siguin tots dos ^{13}C és de l'ordre de 0.01%, per sota dels límits de detecció de la RMN. Per tant, si s'administra un precursor tal com [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-acetat i el metabòlit presenta senyals amb constants d'acoblament ^{13}C - ^{13}C a un enllaç, $^1\text{J}_{\text{CC}}$, es pot afirmar que s'ha incorporat la unitat intacta d'acetat, amb el seu enllaç carboni-carboni.

En aquest context, resulta il·lustrativa la comparació de dos estudis clàssics sobre la biosíntesi de griseofulvina pel fong *Penicillium griseofulvum*. El primer estudi (Birch A.J., 1957), emprant radiomarcatge amb ^{14}C , requerí mesos de treball degradatiu, acuradament quantitatiu, per tal de determinar el destí de totes les radiomarquies. El segon estudi (Sato Y. *et al.*, 1976), emprant ^{13}C , assolí els mateixos resultats en molt menys temps, i a més la incorporació de [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-acetat permeté determinar els parells de carbonis procedents de cada una de les set unitats intactes d'acetat incorporades al metabòlit. També va permetre confirmar la presència, com a intermedi biosintètic, d'un metabòlit simètric en un dels dos anells (la griseofenona C), resultat que no es podia haver obtingut emprant només radiomarcatge:



Per ampliar els coneixements sobre RMN, els seus fonaments i la seva evolució històrica es poden consultar les referències de Macomber R.S. (1998), Günther H. (1995) i Hornak J.P., *The Basics of NMR* (<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>).

1.8.2. Situació actual: metodologia RMN

Les millores en instrumentació RMN s'han centrat en les darreres dues dècades en la disponibilitat de camps magnètics cada vegada més elevats (ja existeixen instruments comercials que treballen a 900 MHz per protó, i hi ha prototips que treballen a 1 GHz per protó), que presenten sensibilitats més elevades i són també més estables. Juntament amb la generalització de la selecció de coherències mitjançant gradients polsants de camp magnètic (Parella T., 1998), amb les tècniques bidimensionals de detecció inversa (Martin G.E. & Hadden C.E., 2000) i amb la utilització de polsos selectius de radiofreqüència de perfil predeterminat (Berger S., 1997; Parella T. *et al.*, 1999), s'ha facilitat l'obtenció d'espectres multidimensionals de mostres cada vegada més complexes (extractes biològics sense separació prèvia, o directament cultius dins del tub RMN), amb gran fiabilitat i reproduïbilitat, sense haver d'acumular els senyals RMN durant temps exageradament llargs.

1.8.3. Metodologia ^{13}C -RMN i ponderació dels fluxos metabòlics en recerca biotecnològica (Szyperski T., 1998)

Les rutes metabòliques, les quals estan definides per la naturalesa química dels metabòlits, són prou ben conegudes per a molts organismes d'interès biotecnològic. Per contra, el control i la regulació *in vivo* de la xarxa metabòlica sembla que encara és un gran camp inexplorat per la recerca experimental. Això és degut al poc coneixement que encara es disposa sobre:

- l'estructura tridimensional i la dinàmica de les macromolècules biològiques involucrades en el metabolisme
- els mecanismes de les reaccions enzimàtiques i els processos de transport
- la termodinàmica i cinètica de les reaccions bioquímiques *in vivo*
- l'eficiència de la producció d'ATP cel·lular

També és deu a què els avanços conceptuals fins ara assolits són relativament recents.

Un dels primers paradigmes de la regulació metabòlica, com per exemple el rol central d'algunes escasses reaccions limitants catalitzades per enzims alostèrics, que van proporcionar les bases per als intents de manipulació del metabolisme cel·lular durant varies dècades, ha estat recentment desafiat per la nova visió de la “modulació en diversos centres actius”. Aquesta visió ha estat alimentada pels resultats obtinguts de l'anàlisi del control metabòlic (MCA) i per la teoria dels sistemes bioquímics, que són dos aproximacions matemàtiques relacionades. D'igual manera, la regulació de les velocitats de les reaccions metabòliques, anomenades “fluxos metabòlics”, és generalment distribuïda entre tots els enzims de la xarxa de manera que més d'un únic enzim exerceix un control significatiu sobre una ruta determinada, i la distribució ponderada de la regulació sobre diversos enzims pot variar amb un canvi de l'estat metabòlic. Així doncs, la seva regulació pot difícilment explicar-se apropiadament amb una aproximació reduccionista, per exemple, només amb l'anàlisi dels components de la xarxa no s'aconsegueix una guia suficient per al redisseny racional de la xarxa amb èxit.

El redisseny racional del metabolisme cel·lular amb l'objectiu d'optimitzar els sistemes vius per a aplicacions biotecnològiques ha estat anomenat “enginyeria metabòlica”. Aquestes modificacions de la xarxa de bioreaccions pretenen assolir una redirecció dels fluxos de carboni i energia per aconseguir augmentar la producció, conversió o degradació de compostos biotecnològics d'interès. Aquests objectius estan normalment estretament relacionats amb els de l'enginyeria bioquímica, la qual dedica els seus esforços a la manipulació de cèl·lules per a la recerca mèdica i farmacèutica. Clarament, l'enginyeria metabòlica depèn de l'elucidació de la xarxa de bioreaccions per dirigir la introducció d'una manipulació genètica específica. Per a tal efecte, cal

- la recopilació de les dades experimentals disponibles sobre els components de la xarxa,
- la identificació dels “nodes crítics” en la xarxa (punts de bifurcació en els quals la divisió del flux repercutirà més efectivament sobre el rendiment de la producció) i la seva rigidesa,
- una estimació dels fluxos *in vivo* (caracterització de l'estat metabòlic de la cèl·lula per a un conjunt definit de paràmetres ambientals),
- descripció teòrica de la xarxa considerant, per exemple, el MCA.

Els mètodes per desvetllar l'estructura de la xarxa metabòlica i per determinar els fluxos *in vivo* juguen un rol molt important en l'enginyeria metabòlica. Els fluxos representen l'última manifestació ponderada de tots els components del sistema viu que influeixen el metabolisme i són, juntament amb les dimensions dels *pools* metabòlics, les observacions claus que uneixen el coneixement experimental sobre els components de la xarxa i la descripció teòrica d'aquesta. A més, la determinació dels fluxos sota condicions experimentals variades ajuda a la identificació dels nodes crítics i la seva rigidesa. A la vegada, això suggereix com enfocar el redisseny de la xarxa, per exemple, amb la introducció de rutes bioquímiques alternatives o amplificant o desregulant enzims importants.

Els experiments de marcatge radioactiu i amb isòtops estables tenen una llarga tradició en l'exploració de les rutes bioquímiques i s'han utilitzat per deduir constants de velocitat de reacció, així com quocients de fluxos a través de rutes que procedeixen d'un node comú. Entre el gran nombre de protocols de marcatge utilitzant isòtops estables (com són ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{31}P), aquells basats en el ^{13}C tenen un rol predominant

en la recerca metabòlica ja que proporcionen la informació central sobre la química orgànica de la vida. En contrast amb els experiments de marcatge amb ^{14}C , es pot obtenir informació específica sobre la localització sense necessitat de degradació dels metabòlits utilitzant la ressonància magnètica nuclear de ^{13}C o amb l'espectrometria de masses. Els experiments amb marcatge ^{13}C també ofereixen l'oportunitat única de comprovar la formació o trencament dels enllaços covalents dins de la xarxa de bioreaccions a través de l'observació de les constants d'acoblament escalars ^{13}C - ^{13}C o de les constants d'acoblament dipolars en un o diversos espectres de RMN.

Una alternativa, sovint àmpliament utilitzada com a mètode per estimar fluxos *in vivo* és el *metabolic flux balancing* (MFB), que es pot traduir com “ponderació de fluxos metabòlics”, el qual combina l'estequiometria de les reaccions que constitueixen la xarxa de bioreaccions, mesures de les velocitats de consum i producció de substrats i productes, els requeriments biosintètics per a la producció de biomassa i balanços de massa en estat pseudoestacionari dels intermedis metabòlics.

1.8.4. Metodologia METAFoR (Metabolic Flux Ratio Analysis)

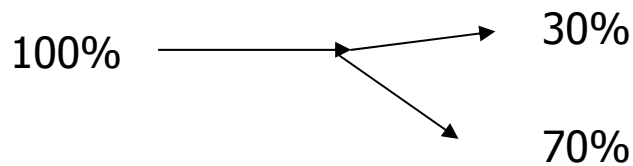
Els experiments de marcatge amb isòtops estables amb l'ús simultani de l'espectroscòpia d'RMN i/o l'espectroscòpia de masses (Szyperski T, 1998) són una tècnica molt potent per a l'estudi del metabolisme. Especialment, la tècnica del marcatge fraccional biosintèticament dirigit (BDF) amb marcatge ^{13}C dels aminoàcids proteics s'ha desenvolupat amb èxit per a l'estudi de les reaccions o rutes bioquímiques actives en una cèl·lula i per a quantificar els quocients dels fluxos metabòlics (Szyperski T, 1995). El marcatge BDF ha estat aplicat a l'estudi del metabolisme central d'eubacteris (Szyperski T, 1995; Sauer U. *et al.*, 1999; Sauer U. *et al.*, 1997), així com de cèl·lules eucariotes de llevat (Maaheimo H. *et al.*, 2001; Fiaux J. *et al.*, 2003). A més, en cultius amb glicerina com a única font de carboni, s'han estudiat també les rutes de biosíntesi dels aminoàcids en l'arqueobactèria *Haloarcula hispanica* (Hochuli, M. *et al.*, 1999).

L'anàlisi del flux metabòlic (MFA) és la metodologia fins ara més utilitzada per quantificar els fluxos metabòlics *in-vivo* (intra i extracel·lulars). Les característiques més importants d'aquest mètode són les següents:

- Es necessiten mesures de fluxos extracel·lulars, normalment velocitats de consum i de formació de substrats i productes.
- Cal suposar un model estequiomètric previ per a les principals reaccions intracel·lulars actives (model metabòlic).
- El resultat dels càlculs és un mapa del flux metabòlic.

El mètode escollit en el present treball, el METAFoR (Metabolic Flux Ratio Analysis), en canvi,

- no requereix mesures experimentals de les velocitats de consum de substrat i producció de metabòlits,
- permet identificar les rutes metabòliques actives (cosa que simplifica l'elaboració del model metabòlic suposat inicial)
- permet l'obtenció de fraccions de fluxos metabòlics o repartiment de les rutes metabòliques en cada bifurcació:



- es poden quantificar els fluxos metabòlics a partir de la informació anterior i la mesura experimental de poques velocitats de consum o producció de metabòlits.

1.8.5. Biosíntesi d'aminoàcids: mètode SZYPERSKI

En el camp de la biosíntesi d'aminoàcids, que constitueix l'objectiu principal del present treball, la situació és molt més complicada que en el camp del metabolisme secundari, atesa la multiplicitat de rutes i cicles metabòlics del metabolisme intermediari del qual en formen part els aminoàcids. Els experiments requereixen el subministrament de precursors (p.ex., glucosa, acetat, glicerina, etc.) marcats amb ^{13}C en una o en diverses posicions (preferentment totes), amb seguiment per RMN de ^{13}C . Però la interpretació dels resultats depèn del nombre de rutes metabòliques involucrades i del nombre de passades dels metabòlits a través dels diversos cicles metabòlics (Klapa M.I. *et al.*, 1999; Park S.M. *et al.*, 1999; Wiechert W. *et al.*, 1999; Möllney M. *et al.*, 1999).

Des de l'any 1995 es disposa de la metodologia general descrita per Szyperski (Szyperski T., 1995; Szyperski T. *et al.*, 1996), que permet quantificar el grau de participació de diversos cicles metabòlics en la biosíntesi d'aminoàcids proteïnogènics per cultius de microorganismes alimentats amb un únic precursor, uniformement marcat amb ^{13}C , com a única font de carboni. En l'article original (Szyperski T., 1995) es formula un model matemàtic per abordar el problema i es descriu la seva aplicació a cultius d'*Escherichia coli*, emprant mescles de glucosa i [$^{13}\text{C}_6$]-glucosa com a precursor i única font de carboni. Acabada la fermentació, se separa la fracció de proteïnes i es sotmet a hidròlisi àcida. La mescla d'aminoàcids que han sobreviscut al procés d'hidròlisi, sense més separació posterior, s'analitza per RMN bidimensional, emprant tècniques de correlació ^1H - ^{13}C per detecció inversa (HSQC, HMQC) amb selecció de coherències mitjançant gradients. Amb temps d'espectròmetre suficientment llargs, es poden obtenir espectres amb prou resolució en la dimensió indirecta F1 (^{13}C) per tal d'observar els multiplets causats per les constants d'acoblament ^{13}C - ^{13}C a un enllaç ($^1J_{\text{CC}}$) dels diversos isotopòmers presents, i amb prou resolució en la zona dels protons corresponents en la dimensió directa F2 (^1H) per tal d'observar senyals separats per a cada aminoàcid. La Figura 1.8.5-1 presenta l'espectre complet de la regió alifàtica en un d'aquests experiments emprant el mètode de Szyperski, mentre que la Figura 1.8.5-2 correspon a la regió aromàtica.

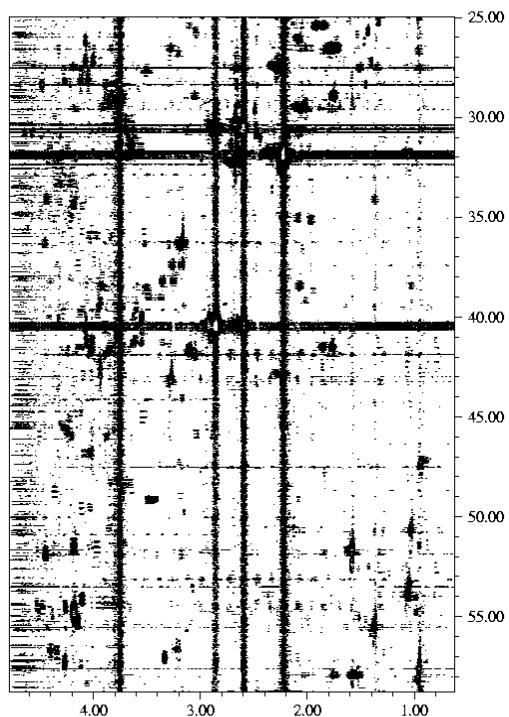


Fig. 1.8.5-1. Regió alifàtica

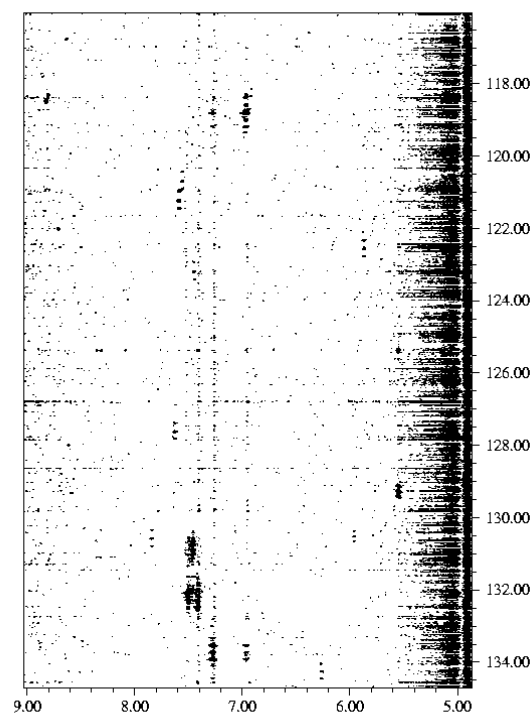


Fig. 1.8.5-2. Regió aromàtica

Malgrat l'excel·lent resolució que presenten ambdós espectres, obtinguts en acumulacions diferents, resulta evident la dificultat d'extreure'n dades quantitatives fiables sense interferències del considerable soroll de fons, especialment visible en la dimensió vertical F1 (^{13}C), degut a l'efecte denominat "soroll t_1 ", que es manifesta en forma d'intenses ratlles verticals que emmascaren senyals d'interès.

La quantificació relativa dels isotòpomers per a cada aminoàcid s'assoleix sumant totes les seccions monodimensionals en F1 (la dimensió ^{13}C) de, p.ex., el carboni α d'aquest aminoàcid i integrant els diversos multiplets de l'espectre unidimensional de ^{13}C resultant. La quantificació absoluta del grau de margatge del carboni α de cada aminoàcid requereix l'obtenció d'un espectre monodimensional de ^1H de la mescla d'aminoàcids amb prou sensibilitat i resolució per tal de poder integrar el senyal del protó α de cada aminoàcid i els dels seus satèl·lits ^{13}C .

Evidentment, l'aplicació del mètode de Szyperski en la forma descrita presenta un molt elevat grau d'exigència instrumental pel que fa a l'estabilitat i sensibilitat de l'espectròmetre RMN. Cal treballar amb espectròmetres de molt elevat camp (p.ex., 600 MHz o més per ^1H), per tal d'augmentar la dispersió assolible en la dimensió F2 i separar així amb prou resolució els senyals (sovint solapats a camps inferiors) de cada aminoàcid. Cal també acumular l'espectre bidimensional de la mescla d'aminoàcids durant períodes llargs de temps (sovint un cap de setmana sencer), per tal d'augmentar la relació senyal/soroll pels senyals més febles (p.ex., els dels aminoàcids menys abundants). I cal també obtenir per separat els espectres de la regió alifàtica, per una banda, i de la regió aromàtica, per altra banda, la qual cosa augmenta el temps d'espectròmetre necessari. Però si es disposa d'un bon espectròmetre de molt alt camp,

els resultats són sovint molt bons. Així, a les figures 1.8.5-3 i 1.8.5-4 es presenten, respectivament, la regió aromàtica completa i una ampliació corresponent a l'aminoàcid histidina d'un d'aquests experiments. La qualitat assolible és, com es pot veure, molt elevada, al menys en casos favorables com el presentat.

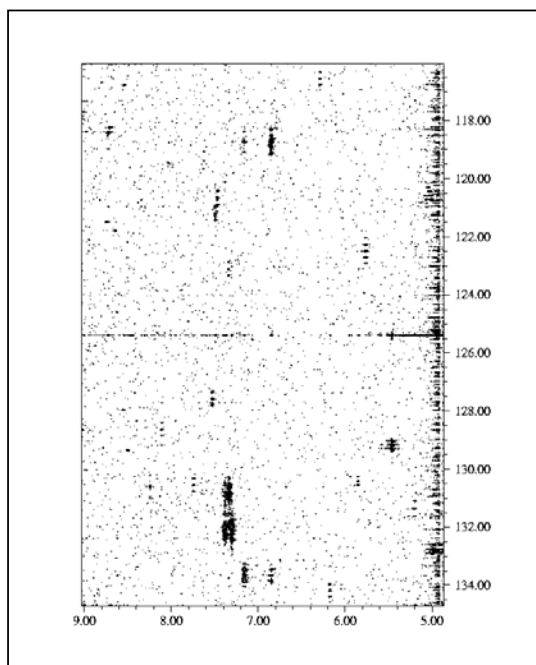


Fig. 1.8.5-3

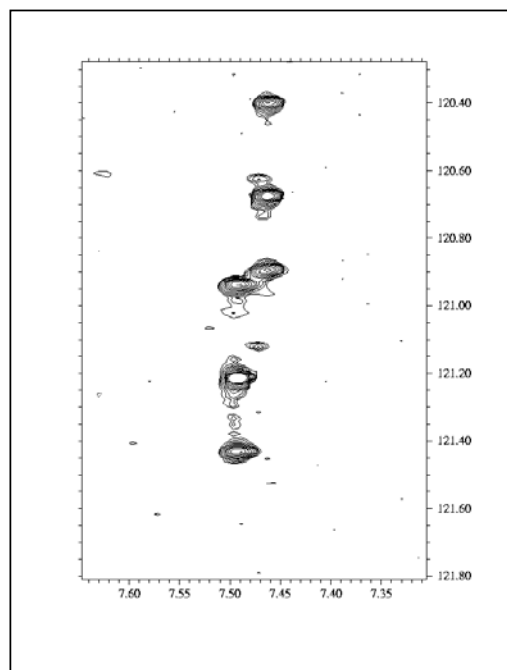


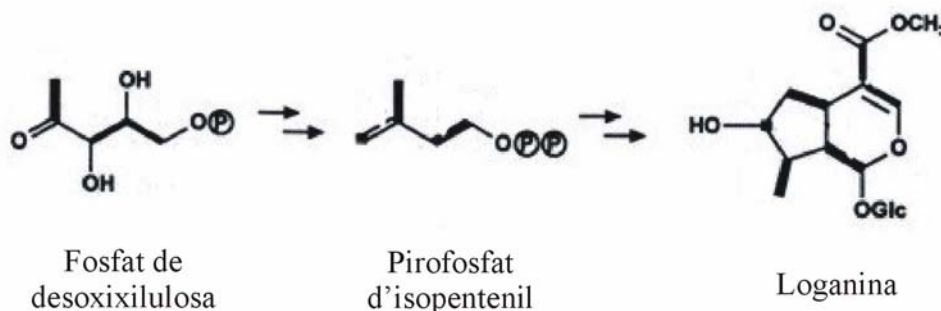
Fig. 1.8.5-4

1.8.6. Biosíntesi d'aminoàcids: millores recents

A més de la utilització directa del mètode de Szyperski immodificat (Fiaux J. *et al.*, 1999; Flores S. *et al.*, 2002), diversos autors hi han afegit recentment certes millores. D'una banda cal esmentar treballs en els quals la mescla d'aminoàcids procedents d'hidròlisi es sotmet directament (és a dir, sense separació prèvia dels aminoàcids individuals) a anàlisi per RMN emprant tècniques espectroscòpiques modificades per optimitzar-ne els resultats. Cal esmentar aquí l'escalat J (*J scaling*), que permet multiplicar el valor de les constants d'acoblament $^1J_{CC}$ en la dimensió F1 per un factor enter i eliminar així problemes de solapament de senyals de multiplets diferents (Schmidt K. *et al.*, 1999). També l'obtenció d'espectres J amb filtre HSQC, que permet la determinació precisa dels valors de les constants d'acoblament $^1J_{CC}$ (Davidson A.P. *et al.*, 1999), i el mètode INADEQUATE modificat que es denomina COSY ^{13}C - ^{13}C amb filtre biquàntic (Kjellberg A. *et al.*, 1999), en el qual els dobles en F1 (^{13}C) deguts a les constants $^1J_{CC}$ apareixen en antifase (aplicat en aquest article a un polisacàrid, no pas a aminoàcids).

Altres mètodes es basen en la separació prèvia dels aminoàcids individuals, procediment molt més antic (Eisenreich W. *et al.*, 1991) però que permet alleujar certs problemes de solapament de senyals en RMN. Això ha permès la determinació quantitativa de la incorporació de ^{13}C als aminoàcids del metabolisme intermediari, pas central en un

estudi de les contribucions relatives de la clàssica ruta mevalonoide i la nova ruta no mevalonoide de biosíntesi de la loganina (Eichinger D. *et al.*, 1999).



Per altra banda, en combinació amb noves seqüències RMN desenvolupades per obtenir els valors de les constants d'acoblament ^1H - ^{13}C a dos o tres enllaços, $^2\text{J}_{\text{CH}}$ i $^3\text{J}_{\text{CH}}$, respectivament, ha permès obtenir la distribució completa dels isotopòmers marcats amb ^{13}C en diverses posicions, incloses les no consecutives (de Graaf A.A. *et al.*, 2000). I amb combinació amb una variació d'aquest mètode RMN, que permet quantificar el marcatge ^{13}C de carbonis no protonats (Wendisch V.F. *et al.*, 1997), s'ha aplicat a estudis *in vivo* de fluxos metabòlics paral·lels i bidireccionals (Petersen S. *et al.*, 2000).

1.8.7. Altres tècniques per a la determinació dels fluxos metabòlics en recerca biotecnològica

(Szyperski T., 1998)

Com ja s'ha explicat, la introducció de molècules marcades amb ^{13}C en una xarxa metabòlica produeix metabòlits marcats amb ^{13}C de manera no aleatòria. La determinació de l'enriquiment específic de cada àtom i l'elucidació de les abundàncies relatives de cada isotopòmer en un *pool* de metabòlits és el centre d'interès de tots els estudis del metabolisme. Els dos tipus d'experiments més comuns que permeten assolir aquest objectiu són l'espectrometria de ressonància magnètica nuclear (RMN), tractada fins ara a la Introducció, i l'espectrometria de masses (MS).

Espectrometria de masses (MS)

Els isòtops ^{12}C i ^{13}C difereixen en una unitat en el seu pes atòmic. Per a molècules petites (< 2000 Da), aquesta diferència es pot detectar fàcilment utilitzant l'MS moderna. En comparació amb l'RMN, doncs, l'MS és una eina altament sensible. Aquest fet ha provocat el desenvolupament de sistemes integrats que combinen les tècniques d'MS amb cromatografia de gasos (GC). La majoria dels estudis de metabolisme on s'ha emprat MS s'han dut a terme amb aquests aparells GC-MS ja que garanteixen la separació de mescleres complexes prèvia a l'anàlisi d'espectrometria de masses.

Un metabòlit que té n àtoms de carboni pot estar marcat fins en n ^{13}C nuclis i, per exemple, la massa molecular detectada per MS pot variar entre M (només àtoms ^{12}C) fins a $M+n$ (només àtoms ^{13}C). Així, l'espectrometria de masses mesura la massa total

d'un determinat isotopòmer però no és sensible a la posició del marcatge dins de l'esquelet de carboni. Per a segons quines aplicacions especials, es pot efectuar un marcatge múltiple en localitzacions específiques introduint un isòtop estable addicional, per exemple ^2H en D-[1,6- $^{13}\text{C}_2,6,6\text{-}^2\text{H}_2$] glucosa, ja que un anàlisi per MS del metabòlit marcat permet la identificació no ambigua de l'origen posicional del nucli ^{13}C .

Les intensitats relatives dels pics ($M+i$, $i=1,\dots,n$) proporcionen la distribució massica dels diferents isotopòmers (MID) i la intensitat de cada un d'aquests pics reflecteix l'abundància de tots els (n_j) ^{13}C -isotopòmers amb j ^{13}C àtoms (és a dir, sense diferenciar la seva localització en l'esquelet de carboni). Els enriquiments posicionals dels isòtops ^{13}C només poden calcular-se, doncs, en MS si les MIDs del ió molecular i dels fragments d'aquest són accessibles, cosa que es pot aconseguir només amb l'anàlisi de dos o més derivats químics del metabòlit que donen lloc a diferents patrons de fragmentació. A més, l'MS no es pot aplicar encara per determinar les abundàncies relatives de fragments ^{13}C - ^{13}C en esquelets de carboni grans, cosa que seria important per poder comprovar la procedència dels enllaços covalents en una xarxa de bioreaccions. Només si les molècules fonts que s'alimenten a la xarxa, en la qual els productes del trencament es dilueixen amb els *pools* dels metabòlits no marcats, estan marcades amb ^{13}C uniformement en tots els seus carbonis, la detecció espectral de la massa de les molècules font permet deduir una conservació uniforme, i per tant també específica quant a la posició, dels enllaços covalents. Les espectroscòpies GC-MS i ^{13}C -RMN poden complementar-se exitosament i el seu ús conjunt ofereix un ampli ventall experimental per descriure el sistema sota consideració.

Tot i que l'acurada rutina de la MS pot millorar-se amb el que s'anomena *selected ion monitoring* (SIM), o seguiment selectiu de determinats ions, el qual centra l'anàlisi en un nombre reduït de ions i fragments de masses característiques, molt acuradament escollits per correspondre a segments moleculars concrets, la seva precisió per mesurar els enriquiments dels isotopòmers està limitada al 0.1% dels àtoms. Això significa que està restringit a experiments que proporcionen metabòlits enriquits significativament, és a dir, que els experiments duts a terme amb enriquiments propers a l'abundància natural de ^{13}C són difícilment factibles, cosa que també ocorre emprant RMN de ^{13}C .

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS DE LA TESI

2.1. Antecedents del Grup de recerca

Durant els darrers cinc anys, el Grup d'enginyeria de processos de producció de proteïnes recombinants en llevats del Departament d'Enginyeria Química de la UAB ha centrat la seva recerca en el desenvolupament i optimització de processos de producció recombinant de lipases microbianes amb el llevat metilotròfic *Pichia pastoris* per al seu ús en aplicacions de química fina. Concretament, s'ha centrat en la producció i aplicació d'una lipasa del fong *Rhizopus oryzae* i, més recentment, de l'isoenzim 2 de la família de lipases del llevat *Candida rugosa*. L'interès del grup també s'ha estès a la producció de proteïnes d'ús veterinari (salut i reproducció animal).

L'estratègia utilitzada per al desenvolupament de processos de producció integra elements de l'enginyeria genètica, de l'enginyeria bioquímica, i de l'anàlisi de biosistemes i enginyeria metabòlica. Així, cal destacar el programa de recerca centrat en l'aplicació de noves eines genètiques (per exemple, nous promotors alternatius al P_{AOXI} , Resina D. *et al.*, 2004) o combinació d'eines genètiques i tècniques de genètica molecular existents al desenvolupament de processos de producció de proteïnes recombinants en *Pichia pastoris* (per exemple, la construcció de soques amb múltiples còpies del gen d'interès, combinat amb l'ús de soques de diferent constitució genètica [fenotip Mut], Serrano A., 2002; Serrano A. *et al.*, 2001). Aquests treballs de recerca s'han desenvolupat de manera integrada i paral·lela amb el programa de recerca de bioenginyeria (Cos O. *et al.*, 2004), centrat en el disseny d'estratègies de cultiu en *fed-batch* a elevades densitats cel·lulars amb la incorporació d'eines de modelització i de seguiment de paràmetres importants del cultiu (com per exemple, el seguiment *online* de metanol –Surribas A. *et al.*, 2003– o d'estimació de la velocitat específica de creixement), així com el desenvolupament d'algorismes de control.

Finalment, el Grup ha obert amb el treball present un tercer programa de recerca centrat en el camp de l'anàlisi de biosistemes i enginyeria metabòlica, amb l'objectiu d'adaptar i aplicar tècniques i metodologies d'anàlisi quantitatiu de la fisiologia cel·lular al cas de *Pichia pastoris* com a eina per adquirir coneixements bàsics sobre el metabolisme i fisiologia d'aquest llevat. Aquest interès sorgí a partir de l'experiència inicial en el camp del desenvolupament de processos de cultiu a elevades densitats cel·lulars amb *Pichia pastoris* per produir lipases microbianes (Minning S. *et al.*, 2001; Serrano A., 2002), en la qual es va posar de manifest el fet que el desenvolupament – sobretot disseny i optimització d'estratègies de cultiu– de processos de producció de proteïnes recombinants en *Pichia pastoris* es duia a terme de manera bastant empírica i costosa en termes de temps i recursos. Aquest fet estava relacionat (almenys en part) amb la manca de coneixements quantitativs de la fisiologia del catalitzador, que en aquest cas és el llevat *Pichia pastoris*. Aquesta manca de coneixements (en relació al llevat *Saccharomyces cerevisiae*) limitaven enormement els coneixements de la funció cel·lular de *Pichia pastoris* (a tots els nivells: genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma, i *fluxoma*) i, conseqüentment, l'estimació i modelització de l'estat fisiològic de les cèl·lules al llarg d'un procés de cultiu com a base per al disseny i optimització racional d'estratègies de cultiu, així com per al possible disseny d'estratègies d'enginyeria metabòlica.

En particular, en els estudis inicials mencionats anteriorment (Serrano A., 2002), es posà de manifest la importància de les condicions de cultiu i l'estratègia de cultiu –sobre tot pel que fa a les estratègies d'alimentació de substrats mixtes- en la productivitat del sistema. Tot i així, fins al moment, no es disposava de cap estudi sistemàtic i quantitatiu del metabolisme de *Pichia pastoris* creixent sobre barreges de substrats com per exemple glicerina i metanol, àmpliament utilitzats en processos de cultiu per a producció de proteïnes recombinants, el qual pogués servir de base de coneixement per al disseny de les estratègies d'alimentació en processos de cultiu en *fed-batch*.

El present treball s'emmarca en el camp de l'anàlisi quantitatiu de biosistemes i pretén, doncs, ser un estudi bàsic del metabolisme central del carboni que permeti millorar els coneixements que actualment es tenen del llevat *Pichia pastoris*, i la seva modelització per a la selecció racional de condicions i estratègies controlades de cultiu i, en últim terme, d'enginyeria metabòlica.

2.2. Context en què s'emmarca el present treball

Tal i com s'ha explicat al punt anterior, el Grup de recerca ha centrat les seves activitats de recerca dels darrers anys en la producció de lipases recombinants en *Pichia pastoris*. Aquesta línia de recerca s'inicià en l'etapa final del projecte “*Microbial production of native and recombinant taylor-made lipases for fine chemicals production*” (projecte), finançat per la Unió Europea dins el 4^{art} programa marc. El projecte es centrava en l'enginyeria, producció i aplicació de lipases microbianes (de fongs i llevats). Una de les lipases model fou una lipasa del fong *Rhizopus oryzae* (ROL). En el projecte s'investigà l'expressió recombinant d'aquesta lipasa en diferents hostes, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris*, i es demostrà que aquest darrer sistema era el més prometedor per desenvolupar un procés de producció de ROL (i les altres lipases model) per a aplicacions en química fina. D'altra banda, les lipases es poden considerar també com a proteïnes reporteres (de fàcil seguiment mitjançant un senzill test d'activitat) per a l'estudi de *Pichia pastoris* com a sistema d'expressió de proteïnes recombinants. Així doncs, aquest projecte europeu fou el punt de partida de les activitats de recerca del Grup centrades en aquest sistema d'expressió, les quals han estat desenvolupades al llarg dels darrers 4 anys dins el marc de projectes subsegüents finançats per la CICYT (i també a través de convenis amb empreses de l'àmbit de la biotecnologia).

2.3. Objectius del present treball

Es plantegen dos objectius principals:

El primer és estudiar de manera sistemàtica el metabolisme central del carboni (especialment pel que fa al creixement amb alimentació simultània de glicerina i metanol) de *Pichia pastoris* com a base de coneixement per poder dissenyar estratègies de fermentació en l'etapa de transició del creixement de glicerina a metanol (selecció d'esquemes d'alimentació, composició del medi, etc.), i poder caracteritzar i/o dissenyar modificacions genètiques de les soques.

El segon gran objectiu del present treball és l'adaptació del mètode escollit per realitzar els estudis de caracterització del metabolisme de *Pichia pastoris*. Aquest mètode, basat en tècniques de marcatge isotòpic amb ¹³C de substrats (fonts de carboni) i tècniques de

2D-NMR per a l'anàlisi de quocients de fluxos metabòlics (*METAFor analysis*, *Metabolic Flux Ratio analysis*), fou desenvolupat inicialment per Szyperski (1995) prenent *Escherichia coli* com a organisme model i glucosa com a substrat model. Posteriorment (Maaheimo H. *et al.*, 2001), la metodologia es va estendre al cas d'organismes eucariotes (és a dir, amb compartiments subcel·lulars), concretament al llevat *Saccharomyces cerevisiae* creixent igualment en glucosa.

Així doncs, el segon gran objectiu d'aquest treball és adaptar el formulisme METAFoR al cas d'un llevat (*Pichia pastoris*) creixent en substrats diferents a la glucosa, i més particularment, al cas d'alimentació simultània de dos substrats, glicerina i metanol. A més, es pretén que aquesta metodologia pugui ser emprada en el futur de manera sistemàtica en l'estudi d'altres paràmetres clau dels processos de cultiu i producció de proteïnes recombinants basats en *Pichia pastoris*, tant genètics (per exemple, soques de diferent constitució genètica: cas dels diferents fenotips Mut), com ambientals (per exemple: ús d'altres fonts de carboni no repressores del *PAOX1*, diferents fonts de nitrogen, etc.), així com la caracterització al nivell de fluxos metabòlics dels estats d'estrès fisiològics de rellevància en el disseny del procés de cultiu: l'estrès osmòtic, respostes d'estrès a la sobreexpressió de proteïnes heteròlogues, entre d'altres.

2.4. Plantejament del present treball

El mètode escollit per realitzar l'estudi del metabolisme central del carboni del llevat *Pichia pastoris* ha estat el *Metabolic Flux Ratio* (METAFoR) *Analysis* (Szyperski T., 1995), és a dir l'anàlisi de la distribució fraccional dels fluxos metabòlics, mitjançant tècniques de marcatge isotòpic de substrats amb ^{13}C combinades amb tècniques de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN).

La proposta d'estudi del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* es basa en l'estudi del mateix en cèl·lules creixent en quimiostats (és a dir que es troben en estat fisiològic estacionari) sota una sèrie de diferents condicions ambientals; concretament, medis de cultiu amb barreges de glicerina i metanol en proporcions diferents, i a diferents velocitats específiques de creixement. D'aquesta manera, es pretén adquirir coneixements sobre la distribució de fluxos metabòlics que proporcionin informació sistemàtica i quantitativa sobre la regulació del metabolisme del metanol de *Pichia pastoris*, particularment en condicions de creixement sobre substrats mixtes (metanol + una segona font de carboni).

MATERIALS I MÈTODES

La soca control de *Pichia pastoris* X-33/pPIC α A (sense el gen de la ROL) es va construir en aquest treball segons el mateix procediment de transformació però usant el vector comercial pPICZ α A (*Invitrogen*).

Així doncs, els plàsmids emprats en aquest treball són els següents:

Vector	Promotor	Marcador de selecció	Tipus d'expressió	Característiques d'ús	Incorporació ROL
pPICZ α	P _{AOX1}	<i>ble^r</i>	S	Senyal de secreció α -MF prepo. MCS. Resistència a zeozina. His i myc <i>tags</i> .	SÍ (pPICZ α -ROL)
					NO (pPICZ α)

S: secretada. MCS: *multiple cloning site*. *ble^r*: resistència al compost Zeozina (adaptat de Higgins *et al.*, 1998).

3.1.2. Manteniment de les soques

Per a períodes de temps limitats (1-2 setmanes), les cèl·lules de *Pichia pastoris* i *Escherichia coli* es mantenen a 4°C en plaques d'agar YPD (10 g/l d'extracte de llevat, 20 g/l de peptona, 20 g/l de dextrosa i 20 g/l agar), i en plaques d'agar LB (5 g/l d'extracte de llevat, 10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl i 20g/l d'agar), respectivament. Quan és necessari, el medi es suplementa amb 100 μ g/ml de zeocina (*P. pastoris*) o 25 μ g/ml de zeozina per a *E. coli*. En el medi LB amb zeocina, la concentració de NaCl es redueix a 5 g/L (*low salt*-LB).

Per al manteniment a -70°C (per a llargs períodes de temps), s'elaboren glicerinat amb un 15% (w/v) de glicerina per a les cèl·lules de *Pichia pastoris* i d'*Escherichia coli*, crescudes en medi YPD i LB o LB-low salt, respectivament, tal com recomana *Invitrogen*.

3.1.3. Transformació: obtenció de competents i condicions d'electroporació

Es van utilitzar cèl·lules competents d'*Escherichia coli* DH5 α comercials (*Life Technologies*) i el protocol de transformació, basat en el xoc tèrmic, proporcionat per la mateixa companyia.

Les cèl·lules competents de *Pichia pastoris* es van elaborar segons el següent procediment: es realitza un cultiu de *Pichia pastoris* X-33 en 5 ml de medi YPD líquid (10 g/l d'extracte de llevat, 20 g/l de peptona i 20 g/l de dextrosa) a 30°C, 250 rpm, durant 24 hores, que s'usa per inocular ½ litre de cultiu de medi YPD que es deixa créixer fins a una densitat òptica a 600 nm (OD₆₀₀) d'1.3-1.5, sota les mateixes condicions. Les cèl·lules es centrifuguen a 1500 xg durant 10 minuts, a 4°C i es resuspenen en 100 ml de medi YPD + 2 ml HEPES 1 M (àcid 2-hidroxiethylpiperazine-N'-2-butanosulfònic), a pH 8.00. S'afegeixen 2.5 ml de DTT 1 M (dithiothreitol) i s'incuben durant 15 minuts a 30°C i 100 rpm. Posteriorment s'afegeix aigua destil·lada estèril a 4°C fins a un volum de 250 ml i es centrifuga una altra vegada a les mateixes condicions. Es realitza una tercera i quarta centrifugació, en les mateixes condicions, resuspenent el sediment de cèl·lules primer en 250 ml i després en 125 ml d'aigua destil·lada estèril a 4°C. Posteriorment, es repeteixen dos centrifugacions més en què es

resuspèn el sediment en 20 ml i 0.5 ml de sorbitol estèril 1 M a 4°C. Es realitzen alíquotes de 80 µl de cèl·lules que es guarden a -70°C. Les cèl·lules de *Pichia pastoris* es transformen per electroporació (Cregg, J.M. & Russell, K.A., 1998). Aquesta es fa a terme mesclant 80 µl de cèl·lules competents amb 5-10 µg de DNA linealitzat. La mescla s'incuba en gel durant 5 minuts. El pols elèctric aplicat és de 2500 v, usant un electroporador *Bio Rad Gene-Pulser*, a 25 µF de capacítància, 400 Ω de resistència, i cubetes estèrils de 0.2 cm de *Bio Rad*. Immediatament després s'afegeix 1 ml de sorbitol 1 M estèril a 4°C i s'incuba la mescla a 30°C durant una hora sense agitació. Posteriorment s'afegeixen 0.8 ml de medi fresc YPD i s'incuben les cèl·lules durant 3 hores, a 30°C i 250 rpm. Finalment, es sembren 200 µl d'aquesta suspensió de cèl·lules en plaques RDB (sorbitol 1 M, 10 g dextrosa, 13.4 g de *yeast nitrogen base (w/o aa & ammonium sulfate)*, $4 \cdot 10^{-4}$ g de biotina i 20 g d'agar, per litre d'aigua destil·lada) + 100 µg/ml de zeozina. Les plaques s'incuben a 30°C durant 72 hores.

3.2. Cultius

3.2.1. Cultius en medi sòlid (plaques de Petri)

Per a la realització de l'estudi de la soca KM7121, es fabriquen un conjunt de plaques d'agar que contenen *Tween80*, el qual permet visualitzar la producció de lipasa, amb diferents concentracions de metanol (inductor de la producció de lipasa) per als següents substrats: glicerina, ribosa, xilosa, fructosa, glucosa, mannososa, sorbitol i mannitol. També es fabriquen les corresponent plaques de control sense altra font de carboni a banda del metanol.

La composició d'aquestes plaques és, per cada litre de medi, 3 g de metanol, 10 ml de *Tween80*, 6.7 g de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (Difco) (composició a l'apèndix 6.2), 15g d'agar, $4 \cdot 10^{-4}$ g de biotina i, per a les plaques que no són control, 20 g de font de carboni (glicerina, ribosa, xilosa, fructosa, glucosa, mannososa, sorbitol o mannitol).

3.2.2. Bioreactors i condicions d'operació

Els inòculs per als cultius continus es realitzen en erlenmeyers amb *baffles* d'un litre amb volums de treball de 100 ml de medi YPD amb zeozina, el qual conté 10 g/l d'extracte de llevat, 20 g/l de peptona, i 20 g/l de dextrosa.

Les condicions de creixement dels inòculs són de 30°C i 250 rpm d'agitació i el temps d'incubació són de 24h. La DO_{600} final a la qual s'atura el creixement dels inòculs és aproximadament 40-50. Els inòculs es centrifuguen a 4500xg i les cèl·lules es resuspenen en aigua destil·lada estèril per al seu cultiu en el bioreactor, a una DO_{600} inicial entre 0.5 i 1.0.

Els cultius en bioreactor es duen a terme en un medi mínim (MM) definit que conté, per litre d'aigua destil·lada, 0.17 g de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) *sense aminoàcids ni* $(NH_4)_2SO_4$ (Difco) (composició a l'apèndix 6.2), 5 g $(NH_4)_2SO_4$, 10g de font de carboni (glucosa, glicerina, metanol o barreja d'aquests dos últims, segons el cultiu), i 0.1 ml d'antiescumant DF7960 (Mazu, Dow Chemicals). Els components de la YNB s'esterilitzen separatament per microfiltració abans de ser afegits al bioreactor. En el reactor no cal antibiòtic ja que el gen està integrat a un cromosoma de l'hoste.

Els experiments en *batch* i continus es van dur a terme en un bioreactor *New Brunswick Bioflo III* amb cuba de 1.5 litres de capacitat. El volum de cultiu és de 0.8 litres.

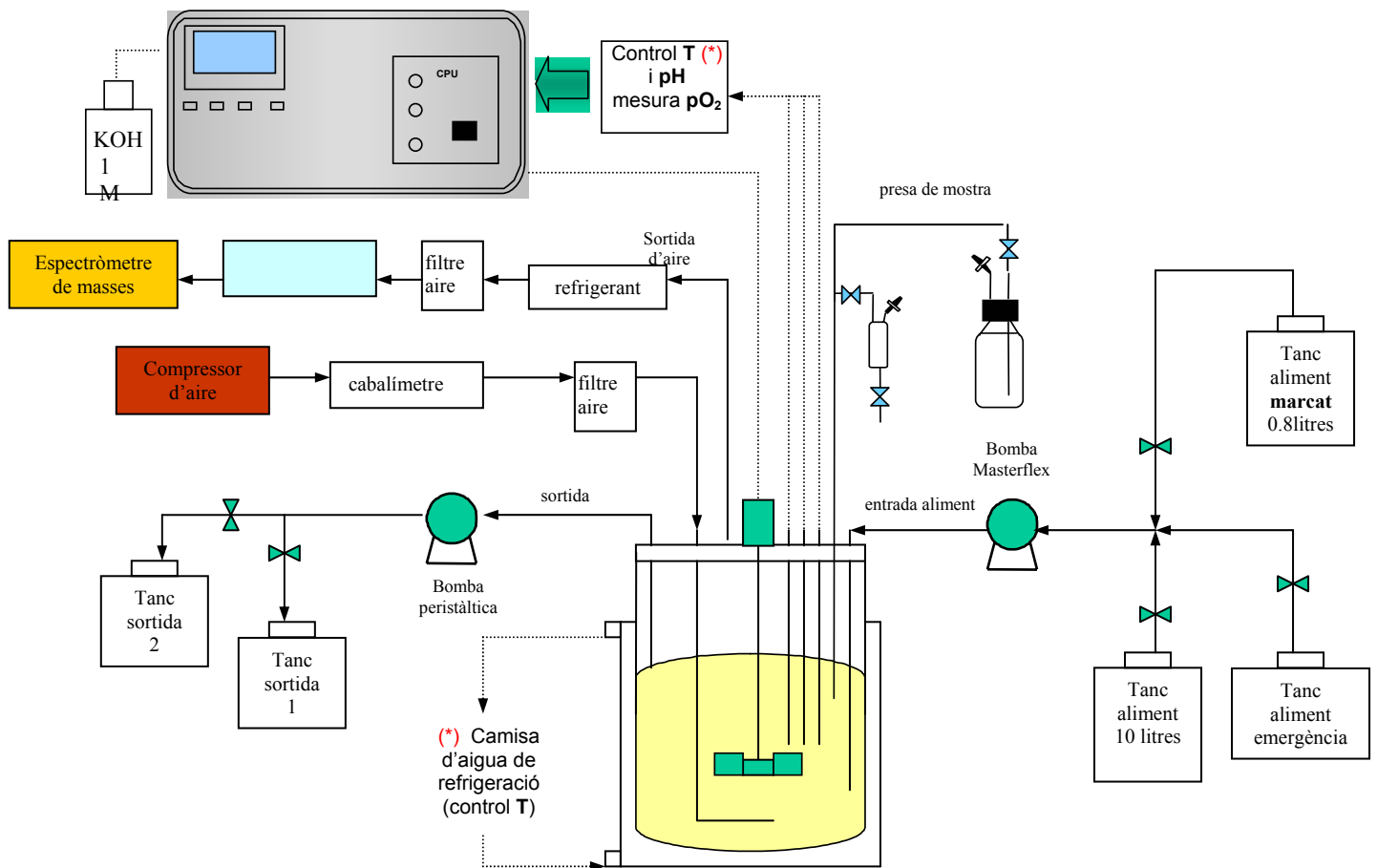
L'esterilització del medi de cultiu i del bioreactor es du a terme en un autoclau a 121°C durant 30 minuts. La solució de vitamines s'esterilitza per filtració (filtres *Millipore-GV PVDF* de 0.22 μ m de porus) i s'afegeix al fermentador una vegada aquest ha assolit la temperatura de treball (30°C).

Les condicions d'operació en el bioreactor són de 30°C de temperatura, 500 rpm d'agitació, i pH 5.5 mantingut per addició automàtica de KOH 1 M. Així mateix, la concentració d'oxigen dissolt es manté per sobre del 20% de saturació amb un cabal constant d'aire, esterilitzat per filtració, d'1 litre/min (cabalímetre màssic *Brooks Instruments B.V.*, Veenendaal, The Netherlands).

Els cultius continus es realitzen a dues velocitats de dilució diferents, D , definida com cabal volumètric/volum de treball de 0.05h^{-1} i 0.16h^{-1} , respectivament. Això significa que les velocitats d'alimentació són de 0.04 l/h i 0.128 l/h , respectivament.

L'alimentació del medi es controla per una bomba Masterflex (Cole-Parmer). El volum de treball es manté constant per sobreexidor i utilitzant una bomba peristàtica (B.Braun Biotech Int.).

El muntatge experimental era el següent:





3.3. Mètodes analítics

3.3.1. Anàlisi de substrats

Mesura de glicerina

L'anàlisi de la concentració de glicerina es realitza per HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (*Hewlett Packard* 1050), usant una columna d'intercanvi iònic *Aminex HPX-87H* (*Bio Rad*). La fase mòbil utilitzada és àcid sulfúric 15 mM i un volum d'injecció de 20 µl. La quantificació de les dades es realitza amb el software *Milenium 2.15.10* (*Waters*). Abans de realitzar l'anàlisi de glicerina es centrifuga la mostra i es filtra a través de filtres *Millipore-MF* d'èsters mesclats amb cel·lulosa de mida de porus 0.45 µm, per acabar d'eliminar tota la biomassa.

Mesura de metanol

L'anàlisi de metanol es realitza per cromatografia de gasos (*Hewlett Packard* 5890) usant una columna capil·lar (*Tracsil TR-FFAP* 25m x 0.53mm x 1µm, de *Tracer-Teknokroma*), un injector automàtic model 7673 (*Hewlett Packard*) i un detector FID. Les temperatures del detector i injector són de 280°C i 200°C, respectivament. La temperatura del forn es manté a 40°C durant 2 minuts i, posteriorment, es realitza una rampa d'augment de la temperatura de 20°C per minut fins assolir els 200°C, els quals es mantenen durant un període de 5 minuts més. S'utilitza heli com a gas transportador a un cabal de 9 ml per minut i hidrogen gas com a combustible. La integració i quantificació dels pics es realitza mitjançant el software *Milenium 32* (*Waters*). Com a patró intern s'usen mostres d'isopropanol a una concentració de 4 g/l.

Mesura de glucosa

L'anàlisi de la glucosa, en el *batch* de l'apartat 4.2 dels resultats, es va realitzar amb un analitzador bioquímic *Yellow Springs Instruments* (*2700D Select*). Per al cultiu continu de l'apartat 4.4 dels resultats l'anàlisi de glucosa es va realitzar per HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (*Hewlett Packard* 1050), usant una columna d'intercanvi iònic *Aminex HPX-87H* (*Bio Rad*). La fase mòbil utilitzada és àcid sulfúric 15 mM i un volum d'injecció de 20 µl. La quantificació de les dades es realitza amb el software *Milenium 2.15.10* (*Waters*). Abans de realitzar l'anàlisi de glucosa, es centrifuga la mostra i es filtra a través de filtres *Millipore-MF* d'èsters mesclats amb cel·lulosa de mida de porus 0.45 µm, per acabar d'eliminar tota la biomassa. Amb aquesta columna es mesuren, també, àcids orgànics com ara succinat, piruvat, acètic, i etanol, els quals són productes potencials del metabolisme de llevats.

Mesura de NH₄[±]

Per a la determinació de l'amoni es va utilitzar el mètode colorimètric del Dr. Lange (Düsseldorf, Alemanya). El kit LCK 305 serveix per a un rang de concentracions d'amoni entre 1.3 i 15 mg/l, mentre que el kit LCK 305 serveix per a un rang de concentracions d'amoni entre 60 i 167 mg/l. Aquest assaig es du a terme en un aparell LANGE, ION-500, per a un volum de mostra de 0.2 ml, de manera que els ions amoni reaccionen, a un pH de 12.6, amb ions hipoclorit i ions salicilat, en presència de nitroprusiat sòdic com a catalitzador, per formar blau d'indofenol. Aquest es determina

per absorbància a 695 nm (el valor de l'absorbància constant final es pot mesurar després de 15 minuts de reacció i es manté a aquest valor constant durant 15 minuts més).

3.3.2 Anàlisi de productes

Mesura de l'activitat lipolítica extracel·lular

La mesura de l'activitat lipolítica es du a terme amb un assaig colorimètric (kit 1821792 de *Roche diagnostics*) en el qual es mesclen 0.3 ml de substrat (1,2-*O*-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric-(methylresorufin)-ester) amb 0.5 ml de tampó Tris·HCl (400 mM, pH 7.25) i 0.5 ml de mostra en una cubeta a 30°C. El seguiment de l'increment de l'absorbància a 580 nm durant 7 minuts es realitza amb un espectròmetre UV-VIS Varian Cary 3. L'increment d'absorbància per segon es calcula a partir del pendent de la corba, el qual es relaciona amb l'assaig d'activitat lipolítica realitzat amb pH-stat i descrit per Minning S. *et al.* (2001). Una unitat d'activitat lipolítica es defineix com a la quantitat de lipasa necessària per hidrolitzar 1 µmol d'enllaç éster per minut sota les condicions d'assaig.

Anàlisi de proteïnes

L'anàlisi de la proteïna total es realitza pel protocol de Bradford, utilitzant el kit de PIERCE (Coomasie ® Protein Assay Reagent Kit, n° catàleg 1856209). Es mesclen 100 µl de mostra amb 900 µl del reactiu Coomasie i es mesura l'absorbància a 595 nm. La recta patró del calibrat es realitza tal i com indiquen les instruccions del kit.

Anàlisi dels gasos

El gas de sortida del bioreactor (exhaust gas) es refreda en un condensador fins a 2-4°C (*Frigomix R*, B. Braun Biotech Int) i s'asseca a través d'una columna de gel de sílica. Les concentracions d'oxigen i CO₂ del gas de sortida del cultiu del bioreactor es determinen en línia amb un espectròmetre de masses (*Omnistar*, Balzers Instruments).

3.3.3. Anàlisi de la biomassa

Mesura de biomassa

La biomassa cel·lular es monitoritza amb la determinació del pes sec cel·lular. Es filtra un volum conegut de brou de cultiu (entre 5 i 10 ml de mostra) utilitzant filtres (*Millipore-MF* d'ésters mesclats amb cel·lulosa de mida de porus 0.45 µm) prèviament tarats; aquests es renten amb dos volums d'aigua destil·lada i s'assequen a 100°C fins a pes constant.

L'evolució del creixement cel·lular també es du a terme de forma qualitativa amb el seguiment de l'augment de la DO₆₀₀. Una unitat de DO₆₀₀ equival aproximadament a 5·10⁷ cèl·lules de *Pichia pastoris* (Higgins D.R. & Cregg J.M., 1998). A l'apèndix (apartat 6.3) es mostra la correlació OD₆₀₀/pes sec que permet transformar les dades en un sentit i l'altre.

Anàlisi elemental de les cèl·lules

Es mesura un volum de mostra d'entre 3 i 6 ml i es centrifuga durant 10 minuts a 4000xg i 4°C. Es redisol el pellet en el mateix volum de mostra amb Tris-HCl 20 mM, pH 7.6 per obtenir una mostra neta de restes de substrat i d'altres components del brou. Es centrifuga una altra vegada en les mateixes condicions anteriors i es liofilitza la mostra per dur-la al *Servei d'Anàlisi Química de la UAB*, on es realitza la combustió per determinar la composició percentual en C, H, N i S.

Cendres

Les cèl·lules es recuperen per centrifugació a 4000 xg durant 10 minuts. El sediment cel·lular es resuspèn en 20 mM Tris·HCl, pH 7.6, i es tornen a centrifugar a les mateixes condicions. Els sediments cel·lulars rentats es liofilitzen (Benchtop 5L, Virtis Sentry) durant una nit fins a pes constant. Després, es pesa una quantitat entre 200 i 400 mg d'aquestes cèl·lules liofilitzades en un crisol de ceràmica tarat prèviament i s'introdueix en una muffla a 550°C tota una nit (aproximadament 18 hores). Es treu, es deixa refredar al dessecador i, finalment, es pesa. A partir del pes inicial i el pes final es pot calcular el percentatge en pes que representen les cendres,

Contingut d'oxigen

Una vegada coneguts els percentatge en pes del carboni, l'hidrogen, el nitrogen, el sofre i les cendres, de la composició cel·lular, es pot considerar que l'oxigen correspon a la diferència que resta per completar el 100% de la composició.

Anàlisi de l'activitat Isocitrat liasa intracel·lular

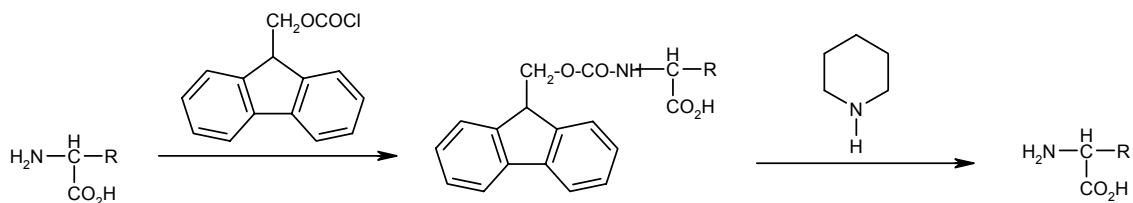
Aquest anàlisi es va realitzar segons el mètode de Dixon G.H. & Kornberg H.L (1959), on l'increment de l'absorbància és deguda al complex format a partir del glioxilat i la fenilhidracina afegida a 324 nm ($\epsilon_{\text{complex}} = 17000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), la qual es va seguir espectrofotomètricament a 37°C. Una unitat d'activitat enzimàtica es requereix per generar 1 μmol de complex per minut. Per preparar la mostra a analitzar, es resuspèn la mostra cel·lular en 1.5ml de tampó (0.1M fosfat de potassi pH 7.0, 5mM MgCl_2 , 1mM EDTA) i s'afegeixen 25 μl d'1M DTT i boles de vidre de 0.75-1mm de diàmetre i s'agiten a 4°C en 7 cicles d'1 minut d'agitació amb vòrtex i 2 minuts de refredament en gel. Finalment es centrifuga la mostra i es recupera el sobrenedant per ser analitzat.

3.4. Derivatització i separació dels aminoàcids

La separació dels aminoàcids es va dur a terme per derivatització (FMOc) i subsegüent cromatografia HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) als laboratoris del VTT Biotechnology (Helsinki). El mètode emprat fou el descrit per Einarsson S. *et al.* (1983).

El pas previ a la separació cromatogràfica consisteix en la derivatització de la mescla dels aminoàcids en solució aquosa, per a la qual cosa s'afegeix el reactiu cloroformat de 9-fluorenylmetil (FMOc-Cl) a la mostra tamponada d'aminoàcids per convertir els aminoàcids lliures en els corresponents FMOc-derivats, productes que són adequats per a la separació i detecció per HPLC (amb el grup amino protegit). L'excés d'aquest

reactiu s'elimina després per extracció amb dietil éter abans de dur a terme la cromatografia HPLC. Un cop separats els FMOC-derivats, els aminoàcids individuals es recuperen per tractament dels FMOC-derivats amb excés de piperidina, la qual es troba després com un contaminant abundant als espectres RMN.



El reactiu FMOC-Cl és fluorescent, i també ho són els FMOC derivats dels aminoàcids, que a més són estables, la qual cosa facilita la quantificació i automatització del mètode analític.

Per a la derivatització dels aminoàcids es prenen 0.4 ml de mostra aquosa d'aminoàcids i s'afegeix 0.1 ml de solució tampó 1M borat (pH 7.7) i 0.5 ml del reactiu FMOC-Cl (15 mM en acetona). Després d'uns 40 segons, la barreja s'extreu amb 2 ml de dietil éter. Aquesta extracció es repeteix dues vegades. La solució aquosa amb els derivats dels aminoàcids està llesta per a ser injectada a la columna cromatogràfica.

Pel que fa a l'estabilitat dels aminoàcids després de la derivatització, cal comentar que l'únic aminoàcid que mostra un trencament important és la histidina.

La separació dels derivats dels aminoàcids es du a terme amb un gradient d'elució, emprant mescles d'acetonitril i tampó d'àcid acètic com a fase mòbil. L'eluent es varia linealment des d'acetonitril-metanol-tampó d'àcid acètic (10:40:50) fins a acetonitril-tampó d'àcid acètic (50:50). Els aminoàcids es detecten i es quantifiquen a partir de la localització i alçada dels pics.

3.5. Metodologia NMR i anàlisi METAFoR del metabolisme central del carboni

3.5.1. Marcatge ^{13}C fraccional biosintèticament dirigit (preparació de les mostres de cultiu per a l'anàlisi per NMR)

Realització dels cultius de cèl·lules (en quemostats)

En la primera etapa dels cultius continus, les cèl·lules s'alimenten amb 10g/l de font de carboni (glucosa, glicerina, metanol o barreja d'aquests dos últims, segons el cultiu) en medi mínim MM durant cinc temps de residència per tal de permetre al sistema assolir a l'estat estacionari. Aquesta font de carboni contindrà ^{13}C a l'abundància natural (1.1%).

Al cap de cinc temps de residència, doncs, s'haurà assolit l'estat estacionari (vegeu l'apartat 1.1.1 de la introducció); és a dir, s'haurà estabilitzat el nombre de cèl·lules dins del cultiu, així com les concentracions de substrat i d'oxigen, i la producció de CO_2 (indicat per l'estabilitat en la densitat òptica i la lectura constant en el gas de sortida del bioreactor com a mínim per dos canvis de volum).

Aleshores, per assolir el marcatge fraccional dels aminoàcids, es canvia l'anterior medi (a abundància ^{13}C natural) per un medi on entre el 10 i el 15% de molècules de la font de carboni estan marcades uniformement amb ^{13}C i la resta, entre el 85 i 90% de les molècules de la font de carboni, contenen ^{13}C a l'abundància natural.

Això significa, que, en el cas de cultius amb glicerina com a única font de carboni, entre el 10 i el 15% de les molècules seran [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina. En el cas de cultius amb glucosa com a única font de carboni, entre el 10 i el 15% de les molècules seran [$^{13}\text{C}_6$]-glucosa. En el cas de cultius amb metanol com a única font de carboni, entre el 10 i el 15% de les molècules seran [$^{13}\text{C}_1$]-metanol. I, finalment, en el cas de cultius amb barreja de glicerina i metanol com a fonts de carboni hi haurà dues possibilitats: (1) en els cultius amb marcatge únic de glicerina, entre el 10 i el 15% de les molècules de font de carboni (glicerina i metanol) seran [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina; (2) mentre que en el segon cas, entre el 10 i el 15% de les molècules (glicerina i metanol) seran [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina + [$^{13}\text{C}_1$]-metanol, en diferents proporcions segons el cultiu continu de què es tracti.

La [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina (amb un enriquiment isotòpic >98%) es va comprar a Martek Biosciences Co. (Columbia, MD, U.S.A.). El metanol marcat es va comprar a Euroisotope (Yf-Sur-Lavette, França). La [$^{13}\text{C}_6$]-glucosa es va comprar a Spectra Stable Isotopes (Columbia, MD, USA).

Es considera que en el moment en què s'assoleix l'estat metabòlic estacionari s'assoleix, també, a la vegada, l'estat isotòpic estacionari, encara que el marcatge isotòpic es realitzi només durant un sol estat estacionari, ja que els *pools* de metabolits de la cèl·lula s'equilibren molt més ràpidament, tal com explica Wouter van Winden (2002): Els experiments de marcatge comencen, generalment, assumint o establint l'estat metabòlic estacionari en un cultiu continu creixent sobre substrat no marcat. A continuació, el medi és substituït per medi que conté el substrat marcat amb ^{13}C . Ambdós medis han de ser idèntics exceptuant la composició isotòpica del substrat font de carboni per no pertorbar l'estat metabòlic estacionari. En cultius continus on el substrat marcat és limitant, la concentració de substrat al fermentador és tan baixa que el canvi al substrat marcat condueix a un esglaió d'arrencada de l'import del substrat marcat dins de les cèl·lules. És a dir, que es considera que el *pool* de metabolits intracel·lulars passen de "no-marcats" a "marcats" tan ràpidament que es pot considerar una incorporació tipus esglaió en lloc de gradient. Degut a què els nivells intracel·lulars de metabolits són generalment baixos, es pot assumir que els metabolits assoleixen l'estat isotòpic estacionari de manera immediata. Això significa que es produeix un esglaió d'arrencada de l'acumulació de marcatge en la biomassa. Aquesta hipòtesi ha estat comprovada amb dades de la literatura de concentracions de metabolits i fluxos en la glicòlisi i en la ruta de la pentosa fosfat i la concentració i flux a través del *pool* combinat de l' α -cetoglutarat/glutamat que pot ésser considerat en equilibri isotòpic. Amb aquestes dades, s'ha calculat que de lluny, el rentat més lent del marcatge en els *pools* d'intermediats metabòlics és aproximadament $0.63 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ per al *pool* de l' α -cetoglutarat/glutamat. Aquesta velocitat és 22 vegades major que la velocitat específica de creixement de la biomassa ($0.1 \text{ h}^{-1} = 0.028 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) (en el nostre cas, $0.16 \text{ h}^{-1} = 4.44 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ i $0.05 \text{ h}^{-1} = 1.39 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), cosa que permet concloure que la hipòtesi d'un esglaió d'arrencada de l'acumulació del marcatge en la biomassa és vàlida.

Sota aquestes condicions, el marcatge de la biomassa segueix una cinètica de rentat de primer ordre. Després d'uns determinats temps de residència de creixement de la

biomassa sota el medi marcat, aquesta és recuperada per determinar la distribució del marcatge en la biomassa.

Teòricament, l'estat isotòpic estacionari s'assoleix només després d'infinits temps de residència. De manera que les dades experimentals de marcatge s'han de corregir per tenir en compte la desviació corresponent de l'estat isotòpic estacionari en el moment de recuperació de la biomassa, cosa que depèn de la velocitat de dilució, és a dir dels volums de reactor transcorreguts. Segons Sauer U. *et al.* (1997), el grau de marcatge fraccional de la biomassa (F_m) es calcula d'acord a una cinètica de rentat de primer ordre $F_m=1-e^{-Dt}$, on D és la velocitat de dilució i t el temps transcorregut des de l'inici del marcatge i la presa de mostra (vegeu apartat 6.1.2 de l'apèndix).

Presa de mostra per als anàlisis d'RMN

La mostra per analitzar es pren al cap d'un canvi de volum al reactor (un temps de residència). Això significa que no s'ha assolit l'estat estacionari, a diferència de la primera etapa amb l'aliment a abundància natural. En aquest cas, es calcula que només un 60% de les cèl·lules existents en el moment de prendre la mostra han pogut incorporar en el seu metabolisme la nova barreja de substrats marcat (vegeu apartat 6.1.2 de l'apèndix). El volum de mostra ha de ser suficient per garantir com a mínim 100 mg de pes sec de biomassa.

Les cèl·lules es van recuperar per centrifugació a 4000 xg durant 10 minuts. El sediment cel·lular es van resuspendre en 20 mM Tris·HCl, pH 7.6, i es van tornar a centrifugar a les mateixes condicions. El sediment cel·lular rentat es va liofilitzar (Benchtop 5L, Virtis Sentry) durant una nit fins a pes constant. Després, una quantitat d'entre 100 i 200 mg d'aquestes cèl·lules liofilitzades es va resuspendre en 3 ml de 20 mM Tris·HCl, pH 7.6. La hidròlisi total de la biomassa es va dur a terme amb la posterior addició de 6 M HCl a 110°C durant 24 h, en tubs de vidre segellats (tancats hermèticament), després de la qual les solucions es van filtrar a través de filtres de 0.22 µm (Millex-GP, Millipore). Els filtres es van rentar amb 0.1 M HCl i l'hidrolitzat es va liofilitzar. Després es va mesurar el pes sec resultant.

El patró de marcatge resultant dels aminoàcids s'analitza després a partir de les proteïnes cel·lulars hidrolitzades espectroscòpia RMN bidimensional de correlació protó-carboni amb detecció inversa (2D [^1H - ^{13}C]-COSY), mitjançant HSQC, i així quantificant les abundàncies relatives dels enllaços de carboni intactes procedents de les molècules de la font de carboni uniformement marcades isotòpicament (Szyperski T., 1995).

3.5.2. Espectroscòpia RNM i anàlisi de dades

Una quantitat de 100-200 mg d'hidrolitzats liofilitzats es dissolen en 600 µl de 0.1 M DCl en D_2O per després recollir els espectres 2D [^{13}C , ^1H]-COSY tant per a les ressonàncies alifàtiques com aromàtiques, a 40°C, tal i com es descriu a (Szyperski T., 1995) amb un espectròmetre Varian Inova operant a una freqüència de ressonància del ^1H de 600MHz. El temps de mesura és d'aproximadament 8 hores per cada espectre 2D, i els espectres es processen amb el programa PROSA (Güntert, P. *et al.*, 1992), així com el programari estàndard de l'espectrofotòmetre Varian (versió 6.1, rev. C).

Durant la hidròlisi de la mostra cel·lular, els aminoàcids cisteïna (Cys) i triptòfan (Trp) s'oxiden, de manera que ja no es poden avaluar. L'asparagina (Asn) i la glutamina (Gln) s'hidrolitzen fins a aspartat (Asp) i glutamat (Glu).

Així doncs, a l'espectre de la regió alifàtica es troben les ressonàncies de 50 carbonis ^{13}C alifàtics d'aquests 16 aminoàcids restants. Tots ells poden ser analitzats en un únic espectre 2D, excepte els carbonis α de la lisina (Lys) i l'arginina (Arg), els quals apareixen solapats a l'espectre. No obstant, en alguns espectres el carboni α de la lisina sí que es pot analitzar, tot i que havent de prescindir de la part del senyal que queda solapada. Els carbonis del grup ϵ -metil de la metionina (Met), així com el carboni aromàtic C2' ($\epsilon 1$) de la histidina (His), no estan units a cap altre carboni i, per tant, no poden aportar informació derivada de $^1\text{J}_{\text{CC}}$ sobre el metabolisme de la cèl·lula. Les seves estructures fines a l'espectre no es consideraran, doncs. També s'exclouen de l'anàlisi els carbonis β i γ de la Met, els quals estan fortament acoblats, així com els carbonis alifàtics β de la valina (β -Val) i l'isoleucina (β -Ile) i el carboni γ de la leucina (γ -Leu) que són punts de ramificació del fragment C4 de l'esquelet carbonat de l'aminoàcid i per tant no se'ls pot aplicar les equacions de probabilitat (vegeu apartat 6.1.3 de l'apèndix). Queden finalment, 42 ressonàncies ^{13}C alifàtiques per a dur a terme la investigació sobre el metabolisme cel·lular (Szyperski T., 1995).

Pel que fa a l'espectre de la regió aromàtica, es troben les ressonàncies dels carbonis 2' i 3' de l'anell benzènic (carbonis δ i ϵ de la tirosina, Tyr- δ_x i Tyr- ϵ_x) i el C5' de l'anell d'imidazole (carboni δ) de l'Histidina (His- δ). Els carbonis aromàtics de l'anell de carboni de la Phe no es consideren degut als forts efectes d'acoblament escalar ^{13}C - ^{13}C (Szyperski T., 1995). Aquestes ressonàncies s'analitzen en un espectre 2D [^{13}C , ^1H]-COSY diferent, optimitzat per a l'estudi d'aquestes ressonàncies.

Les figures 1.8.5-1 i 1.8.5-2 (apartat 1.8.5 de la introducció) mostren dos exemples de les regions alifàtica i aromàtica de l'espectre 2D [^{13}C , ^1H]-COSY que corresponen a la mostra del cultiu continu crescut en glicerina com a única font de carboni i a una velocitat de dilució de 0.05 h^{-1} (apartat 4.3 dels resultats).

En les regions aromàtiques d'aquests espectres 2D [^{13}C , ^1H]-COSY el senyal del carboni His- δ s'observa per duplicat. Aquest fet s'analitza a l'apartat 4.8 dels resultats d'aquest treball.

3.5.3. Equacions de probabilitat per al càlcul de les abundàncies relatives de les *f*-values (o fragmentòmers)

Anàlisi dels espectres

Hi ha vuit intermediaris diferents que uneixen el metabolisme central del carboni amb la biosíntesi dels aminoàcids: 3P glicerat (3PG), oxaloacetat (OAA), piruvat (Pyr), 2-oxoglutarat (OxGlu), ribosa 5P (R5P), Acetil CoA (AcCoA), fosfoenolpiruvat (PEP) i eritrosa 4P (E4P).

El processament de la font de carboni marcada a través de dues o vàries rutes fins al mateix metabòlit, sovint implica diferents seqüències de trencament i construcció d'enllaços de carboni, fent que el patró de marcatge d'aquell metabòlit sigui sovint

diferent, depenent de la ruta que ha efectuat. És a dir, que depenent de la ruta metabòlica seguida, es produirà un mateix metabòlit però diferenciat isotòpicament. Aquesta informació és molt útil i pot contribuir molt significativament a l'anàlisi dels fluxos metabòlics, ja que l'existència d'un determinat patró de marcatge, pot indicar, per exemple, la presència d'una ruta metabòlica no reconeguda originalment com a part de la xarxa metabòlica.

La figura 3.5.3-1 (així com la figura 4.3.3-1 de l'apartat 4.3.3 dels resultats) mostra els fragments de carbonis intactes que s'originen a partir d'una sola molècula d'intermediaris per als 20 aminoàcids proteics.

En Ralf Glaser va crear el programa FCAL (flux-ratios from correlated amino acid ^{13}C -labelling patterns, Szyperski, T. *et al.*, 1999) per a la integració de les estructures escalars fines ^{13}C - ^{13}C obtingudes a partir del 2D [^{13}C , ^1H]-COSY de cada mostra fraccionalment ^{13}C -marcada biosintèticament (BDF), així com per calcular les abundàncies relatives dels diferents fragments de carboni que, provenint d'una mateixa molècula de font de carboni alimentada, han romàs intactes, els denominats valors *f* o fragmentòmers (Szyperski, T., 1995), les quals es defineixen en detall més endavant. Els quocients de fluxos a través de les rutes claus del metabolisme central del llevat es poden calcular a partir de les abundàncies relatives de fragments de carbonis intactes presents en els vuit intermediaris principals que uneixen el metabolisme central del carboni i la biosíntesi dels aminoàcids (Szyperski, T., 1995; Sauer, U. *et al.*, 1997; Sauer, U. *et al.*, 1999; Maaheimo, H. *et al.*, 2001).

Així doncs, s'utilitza el programa FCAL, creat pel Ralf W. Glaser (FCAL 2.3.1) (Szyperski, T. *et al.*, 1999), creat per treballar amb sistemes procariotes, i una versió ampliada del mateix per Hannu Maaheimo (VTT Biotechnology, Helsinki), adaptada als sistemes eucariotes, per analitzar els espectres realitzats seguint el següent procediment:

El programa identifica dins dels espectres 2D els diferents carbonis dels aminoàcids presents (figura 3.5.3-2). L'anàlisi de cada un d'aquests carbonis es realitza per trobar el percentatge d'ocasions en què els enllaços amb els carbonis veïns han estat tallats o conservats.

Com ja s'ha explicat a l'apartat 3.5.2, només es poden analitzar 16 dels 20 aminoàcids. La pèrdua de la Cys i el Trp no limita l'anàlisi que es realitza, ja que els fragments C α -C β -C d'ambdós residus es deriven directament de la Ser. Així mateix, la informació que es podria obtenir a partir de les estructures ^{13}C fines esperades per al fragment indòlic del Trp i per als carbonis aromàtics de la Phe també es pot assolir a partir dels carbonis aromàtics de la Tyr i la His (figura 3.5.3-1). A la vegada, la informació que es podria deduir dels àtoms de carboni ramificats coincideix amb la que es pot obtenir de l'anàlisi dels grups metils als quals estan units. Les estructures fines dels carbonis β i γ fortament acoblats de la Met són redundants respecte l'anàlisi de l'Asp o la Thr (figures 4.3.3-1 i 4.3.3-2). A més, les estructures ^{13}C fines de la Gln i l'Asn serien les mateixes que les del Glu i l'Asp, respectivament. D'altra banda, les estructures fines de l' α -Arg, la qual es solapa amb el senyal de l' α -Lys, és idèntica a aquella dels carbonis α del Glu i la Pro. No obstant, en alguns espectres el senyal de l' α -Lys sí que es pot analitzar emprant un mètode adequat que no tingui en compte la part del senyal que apareix solapat amb l' α -Arg. Finalment, no hi ha cap cas entre els aminoàcids presents en l'hidrolitzat en

què dos carbonis no units a cap protó estiguin units entre ells (ja que, com s'ha explicat, el Trp no és present a l'hidrolitzat).

L'espectre proporciona, doncs, les intensitats relatives de cada isotòpomer per a cada carboni (figura 3.5.3-3).

Per determinar el flux de carboni des de la font de carboni fins als precursors metabòlics dels aminoàcids, cal que l'anàlisi quantitativa de les estructures fines del ^{13}C determinin fins quin punt un determinat àtom de carboni posseeix carbonis veïns que provenen de la mateixa molècula de font de carboni. Per a analitzar aquestes estructures fines ^{13}C serà necessari prendre talls monodimensionals al llarg de l'eix ω_1 (^{13}C), com ja s'ha explicat. Els àtoms de carboni estaran centrats en fragments C_3 o C_4 o bé estaran localitzats als extrems de la cadena, en fragments C_2 .

Per a un carboni perifèric (situat a un extrem de la cadena), només es poden observar dos patrons de marcatge isotopomèrics, un que donarà lloc a l'aparició d'un doblet (d) escindit per una constant d'acoblament J_{CC} , i un altre que donarà lloc a l'estructura fina corresponent a un singlet (s) (figura 3.5.3-3).

Com explica Szyperski T. (1995), en una superposició ponderada del singlet i del doblet, I_s i I_d (amb $I_s+I_d=1$) denoten les corresponents intensitats relatives observades al llarg de ω_1 en un espectre 2D [$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$]-COSY, de manera que es pot definir el vector $\mathbf{I}_{\text{term}} = (I_s, I_d)$. Si s'exclouen els carbonis β -Val, β -Ile i γ -Leu (els quals estan centrats enmig de fragments C_4), els àtoms de carboni no perifèrics estaran ubicats en el centre de subestructures C_3 , de manera que s'observaran quatre patrons isotopomèrics. Si les dues constants d'acoblament amb el carboni de la posició central són diferents (J_{CC} and J_{CC}^*), els quatre isotòpomers donaran lloc a diferents estructures escalars fines (figura 3.5.3-3). Així, es podran esperar fins a un màxim de nou línies de ressonància en una superposició ponderada de tots els possibles multiplets. Aquestes provindran del singlet (s), del doblet separat per la constant d'acoblament menor (d_a), el doblet separat per la constant d'acoblament major (d_b), i del doblet de doblets (dd). Les intensitats relatives corresponents seran I_s , I_{da} , I_{db} , i I_{dd} , les quals sumaran la unitat i definiran el vector $\mathbf{I}_{\text{central-1}} = (I_s, I_{da}, I_{db}, I_{dd})$. Aquesta situació, per exemple, és la que trobem en el cas dels carbonis α , ja que les constants d'acoblament $J_{\text{C}\alpha\text{Ccarboxil}}$ (≈ 60 Hz a $\text{pH}=1$) són significativament majors que les constants d'acoblament $J_{\text{C}\alpha\text{C}\beta}$ entre carbonis alifàtics (≈ 35 Hz). Si les dues constants d'acoblament són idèntiques dins de la resolució de l'espectre per a l'àtom de carboni central en el fragment C_3 , aleshores es poden esperar fins a cinc línies de ressonància (figura 3.5.3-3). Això és, per a una superposició ponderada, el resultat de la contribució d'un singlet (s), un doblet (d) i un triplet (t), amb les intensitats relatives I_s , I_d , i I_t , que sumaran 1, i que defineixen el vector $\mathbf{I}_{\text{central-2}} = (I_s, I_d, I_t)$.

Cada un dels multiplets individuals que componen les estructures fines dels acoblaments escalars ^{13}C - ^{13}C es poden integrar amb el programa FCAL. Per integració s'entén la determinació del percentatge (o tant per u) de la intensitat que correspon a cada multiplet respecte el total del senyal que es recull, per a un determinat carboni. És a dir, la determinació de les intensitats relatives de cada multiplet, o de cada isotòpomer.

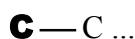
Mitjançant equacions de probabilitat, s'obtenen els fragmentòmers corresponents (mateixes molècules o parts d'aquestes que al llarg de la seva síntesi, han experimentat

talls dels enllaços C-C diferent) a partir de les intensitats relatives obtingudes de l'espectre. Caldrà tenir en compte el percentatge de la font de carboni marcada, el percentatge de carboni ^{13}C en abundància natural (1.1%) i el percentatge d'assoliment de l'estat metabòlic estacionari.

Equacions de probabilitat per al càlcul de les abundàncies relatives de les f -values

Definició dels fragmentòmers (que s'han de relacionar amb el percentatge trobat de les intensitats anteriors per a cada àtom de cada aminoàcid analitzat):

1) Àtom de carboni terminal



$f^{(1)}$ Fracció de molècules on els dos àtoms de carboni provenen de molècules de font de carboni diferents.

$f^{(2)}$ Fracció de molècules on els dos àtoms de carboni provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

2) Àtom de carboni central en un fragment C_3 on tots dos carbonis veïns tenen la mateixa constant d'acoblament (això provoca que l'espectre sigui simètric, de manera que, en el cas que es trobi que un dels enllaços del C d'interès ha estat conservat, no es pot identificar amb quin dels 2 carbonis del costat).



$f^{(1)}$ Fracció de molècules on els tres àtoms de carboni provenen de molècules de font de carboni diferents.

$f^{(2)}$ Fracció de molècules on l'àtom de carboni observat i només un dels veïns provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

$f^{(3)}$ Fracció de molècules on tots tres àtoms de carboni provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

3) Àtom de carboni central en un fragment C_3 on els dos carbonis veïns tenen DIFERENT constant d'acoblament.



$f^{(1)}$ Fracció de molècules on els tres àtoms de carboni provenen de molècules de font de carboni diferents.

$f^{(2)}$ Fracció de molècules on l'àtom de carboni observat i només el carboni veí que presenta la constant d'acoblament menor provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

$f^{(2*)}$ Fracció de molècules on l'àtom de carboni observat i només el carboni veí que presenta la constant d'acoblament major provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

$f^{(3)}$ Fracció de molècules on tots tres àtoms de carboni provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

Càlcul dels fragmentòmers a partir de les intensitats relatives

1) Definició de les constants de probabilitat:

Per a un carboni terminal:

$K^{(1)}_s$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç trencat, és a dir que provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K^{(2)}_s$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç intacte, és a dir que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K^{(1)}_d$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç trencat, és a dir que provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.

$K^{(2)}_d$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç intacte, és a dir que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.

Per a un carboni central en un fragment C3 amb igual constant d'acoblament:

$K^{(1)}_s$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carboni trencats, és a dir que els tres carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K^{(2)}_s$ és la fracció de molècules que tenen només un dels dos enllaços intacte, és a dir que dos carbonis procedeixen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K^{(3)}_s$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K_d^{(1)}$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carbonis trencats, és a dir que tots els carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.

$K_d^{(2)}$ és la fracció de molècules que tenen només un dels dos enllaços intacte, és a dir que dos carbonis procedeixen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.

$K_d^{(3)}$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.

$K_t^{(1)}$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carbonis trencats, és a dir que tots els carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del triplet.

$K_t^{(2)}$ és la fracció de molècules que tenen només un dels dos enllaços intacte, és a dir que dos carbonis procedeixen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del triplet.

$K_t^{(3)}$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni, i contribueixen a la intensitat del senyal del triplet.

Per a un carboni central en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament:

$K_s^{(1)}$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carbonis trencats, és a dir que tots els carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K_s^{(2a)}$ és la fracció de molècules que només tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb menor constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K_s^{(2b)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **major constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb major constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K_s^{(3)}$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir conserven intactes els dos enllaços de carboni, i contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.

$K_{da}^{(1)}$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carbonis trencats, és a dir que tots els carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de menor constant d'acoblament.

$K_{da}^{(2a)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb menor constant d'acoblament

provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de menor constant d'acoblament.

$K_{da}^{(2b)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **major constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb major constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de menor constant d'acoblament.

$K_{da}^{(3)}$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir conserven intactes els dos enllaços de carboni, i contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de menor constant d'acoblament.

$K_{db}^{(1)}$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carbonis trencats, és a dir que els tres carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de major constant d'acoblament.

$K_{db}^{(2a)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb menor constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de major constant d'acoblament.

$K_{db}^{(2b)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **major constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb major constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de major constant d'acoblament.

$K_{db}^{(3)}$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir conserven intactes els dos enllaços de carboni, i contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de major constant d'acoblament.

$K_{dd}^{(1)}$ és la fracció de molècules que tenen els dos enllaços de carbonis trencats, és a dir que tots els carbonis provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblets.

$K_{dd}^{(2a)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb menor constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblets.

$K_{dd}^{(2b)}$ és la fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **major constant d'acoblament** intacte, és a dir que el carboni observat i el carboni amb major constant d'acoblament provenen d'una mateixa molècula de font de carboni mentre que el tercer d'una altra, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblets.

$K_{dd}^{(3)}$ és la fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir conserven intactes els dos enllaços de carboni, i contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblets.

2) Relació entre les intensitats i els fragmentòmers a partir de les constants de probabilitat:

Els vectors I definits anteriorment i que descriuen les estructures escalars fines ^{13}C s'han de relacionar després amb les abundàncies relatives dels fragments que han romàs intactes. Emprant unes equacions de probabilitat desenvolupades per Szyperski, 1995, les estructures escalars fines poden relacionar-se amb les abundàncies relatives dels fragments de carbonis contigus de la cadena de carbonis dels aminoàcids que s'originen directament a partir de les molècules font, de manera que després aquesta anàlisi permeti determinar els quocients de fluxos metabòlics.

Hi ha tres probabilitats bàsiques que cal introduir: el grau de marcatge en ^{13}C a l'abundància natural (P_n), el grau de marcatge total en ^{13}C (P_1), i la fracció de font de carboni marcada ($[^{13}\text{C}_6]$ -glucosa, $[^{13}\text{C}_3]$ -glicerina, $[^{13}\text{C}_1]$ -metanol, o barreja d'aquests dos últims) relativa a la quantitat total de font de carboni introduïda en el medi mínim de fermentació (P_f) (definides més acuradament a l'apartat 6.1.1 de l'apèndix). A més, cal tenir en compte, també, el percentatge (o tant per u) de la biomassa marcada fraccionalment (F_m), el qual es calcula a partir de la consideració d'una cinètica de rentat de primer ordre ($F_m = 1 - e^{-Dt}$) (la deducció de la qual es realitza en l'apartat 6.1.2 de l'apèndix).

Per a un **carboni perifèric**, només cal considerar dues situacions:

- La primera, que el carboni perifèric estigui unit a un altre carboni que prové de la mateixa molècula de font de carboni. La fracció de molècules que es troben en aquesta situació es denominarà $f^{(2)}$, on el superíndex indica que el carboni perifèric es troba localitzat en un fragment C_2 intacte, és a dir, que prové de la mateixa molècula font.
- La segona, que el carboni veí provingui d'una molècula de font de carboni diferent. Aleshores, la fracció corresponent de molècules es denotarà per $f^{(1)}$.

Considerant que hi ha un fragment C_2 intacte quan s'observa un carboni terminal (aquest carboni que s'està observant haurà de ser ^{13}C), això pot ser degut a dues situacions diferents:

- El fragment intacte C_2 pot estar totalment marcat amb ^{13}C i donar lloc a un doblet. En aquest cas, els dos carbonis poden provenir d'una mateixa molècula de font de carboni marcada, o bé d'una mateixa molècula de font de carboni no marcada (amb ^{13}C a l'abundància natural). Cal pensar, però, que la probabilitat de tenir dos ^{13}C consecutius en una mateixa molècula de font de carboni a abundància natural serà molt baixa. Les equacions matemàtiques de probabilitat, en tot cas, han de considerar aquesta possibilitat.
- El segon carboni del fragment intacte C_2 pot no estar marcat (^{12}C) i donar lloc a un singlet. En aquest últim cas el fragment només pot provenir d'una mateixa molècula de font de carboni no marcada (amb ^{13}C a l'abundància natural).

Es pot comprovar a l'inrevés. Per exemple, a l'observar un àtom de carboni terminal on el carboni veí no està marcat amb ^{13}C (és a dir que és ^{12}C i el senyal és un singlet). Això

pot significar que els dos àtoms de carboni es deriven de dues molècules de font de carboni diferents (el carboni observat, ^{13}C , procedent d'una molècula de font de carboni marcada o a l'abundància natural, i l'altre carboni procedent d'una altra molècula de font de carboni a abundància natural). Però també podria ser que tots dos carbonis vinguessin d'una mateixa molècula font de glicerina no marcada, és a dir, marcada amb ^{13}C a l'abundància natural.

Les equacions de probabilitat tenen en compte totes aquestes possibilitats a l'hora de calcular els fragmentòmers corresponents ($f^{(i)}$). En ambdós casos anteriors, el que s'observaria a la secció unidimensional ω_1 corresponent de l'espectre de ressonància magnètica nuclear seria un singlet, ja que únicament està marcat amb ^{13}C l'àtom de carboni que s'està observant. Així doncs, les intensitats dels multiplets no es corresponen directament a uns determinats fragmentòmers. Les relacions entre les intensitats relatives dels multiplets i els fragmentòmers es calculen mitjançant aquestes equacions probabilístiques que es dedueixen a l'apèndix 6.1.3 i es mostren a la taula 3.5.3-1.

Per exemple, per a un carboni terminal, $K^{(1)}_s$ representa la fracció de molècules que tenen un enllaç trencat (i que provenen de molècules diferents de font de carboni) i que contribueixen al singlet, mentre que $K^{(2)}_s$ representa la fracció de molècules que tenen un enllaç intacte i que també contribueixen al senyal del singlet. De la mateixa manera, $K^{(1)}_d$ indica la fracció de molècules que, procedents de diferents molècules de font de carboni, contribueixen al senyal del doblet, i $K^{(2)}_d$ representa la fracció de molècules que contribueixen a aquest mateix senyal de doblet però provenen de la mateixa molècula de font de carboni.

Així doncs, per al senyal del singlet d'un àtom de carboni terminal:

$$I_s = f^{(1)} K^{(1)}_s + f^{(2)} K^{(2)}_s$$

Per al senyal del doblet:

$$I_d = f^{(1)} K^{(1)}_d + f^{(2)} K^{(2)}_d$$

Els valors de les probabilitats K són coneguts, ja que depenen de paràmetres coneguts (P_1 , P_n , P_f i F_m) (apèndix 6.1.3) i les intensitats relatives del singlet i del doblet poden calcular-se a partir de l'espectre de ressonància magnètica nuclear, com s'ha explicat anteriorment. Hi ha diverses maneres de fer-ho: es pot integrar l'espectre unidimensional (el tall) paral·lel a ω_1 , o també es pot integrar els volums d'una secció bidimensional adequadament selectiva de l'espectre 2D. Ambdós mètodes s'han emprat en el present treball (indicats en el seu cas als diferents apartats dels resultats). Ens trobem, doncs, amb dos equacions amb dues incògnites (els dos fragmentòmers) i el sistema es pot resoldre fàcilment.

Aquest raonament es pot dur a terme també per als àtoms de carboni localitzats al centre de fragments C_3 (apèndix 6.1.3). El fragmentòmer $f^{(1)}$ representa la fracció de molècules que provenen de tres molècules de font de carboni diferent i $f^{(3)}$ la fracció que prové de la mateixa molècula de font de carboni. Per a $f^{(2)}$, ens podem trobar amb dues situacions diferents. Si les constants d'acoblament per al carboni central i els seus veïns són diferents, hi haurà la possibilitat de diferenciar entre els dos fragments C_2 intactes,

generant els fragmentòmers $f^{(2)}$ (en el cas en que el carboni central i el carboni que té una constant d'acoblament menor provenen de la mateixa molècula font, mentre que no ho fa l'altre carboni) i $f^{(2*)}$ (en el cas en què el carboni central i el carboni que té una major constant d'acoblament provenen de la mateixa molècula font mentre que no ho fa l'altre carboni veí). En el cas on el carboni central està localitzat en mig d'un fragment C_3 en el qual les constants escalars d'acoblament són idèntiques sota les condicions de resolució de l'espectre, s'observarà un triplet enlloc del doblet de doblets (figura 3.5.3-3). Com a conseqüència, els doblets d_a i d_b esdevindran indistingibles i hi haurà un únic fragmentòmer $f^{(2)}$ el qual serà $f^{(2)} = f^{(2)} + f^{(2*)}$.

Resumint, per a la intensitat del senyal del singlet d'un àtom terminal:

$$I_s = f^{(1)} K^{(1)}_s + f^{(2)} K^{(2)}_s$$

Per al senyal del doblet:

$$I_d = f^{(1)} K^{(1)}_d + f^{(2)} K^{(2)}_d$$

Això és, un sistema d'equacions lineals, amb dues equacions i dos incògnites (els fragmentòmers). Si es resol aquest sistema, s'obtenen els valors dels fragmentòmers, $f^{(1)}$ i $f^{(2)}$.

Equacions de probabilitat usades per calcular les intensitats relatives dels multiplets de l'espectre.

Les definicions d' F_m i de les diferents probabilitats es presenten als apartats 6.1.2 i 6.1.1 de l'apèndix i la deducció de les equacions de probabilitat (K) a l'apartat 6.1.3. Així, P_n és el grau de marcatge amb ^{13}C a abundància natural (1.1%), P_1 , és el grau de marcatge total amb ^{13}C , P_f , la fracció de font de carboni marcada ($[^{13}C_6]$ -glucosa, $[^{13}C_3]$ -glicerina, $[^{13}C_1]$ -metanol, o barreja d'aquests dos últims) relativa a la quantitat total de font de carboni introduïda en el medi mínim de fermentació, i F_m , el percentatge (o tant per u) de la biomassa marcada fraccionalment.

àtom de carboni	K	Equacions	
terminal	$K^{(1)}$	$K^{(1)}_s = P_1 (1-P_1)$	$K^{(1)}_d = P_1 P_1$
	$K^{(2)}$	$K^{(2)}_s = (1-F_m) P_n (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) P_n (1-P_n)$	$K^{(2)}_d = F_m P_f + (1-F_m) P_n^2 + F_m (1-P_f) P_n^2$
central en un fragment C_3 (amb diferent constant d'acoblament)	$K^{(1)}$	$K^{(1)}_s = P_1 (1-P_1)^2$	$K^{(1)}_{da} = P_1 P_1 (1-P_1)$
		$K^{(1)}_{db} = K^{(1)}_{da}$	$K^{(1)}_{dd} = P_1^3$
	$K^{(2a)}$	$K^{(2a)}_s = (1-P_1)[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$	$K^{(2a)}_{da} = (1-P_1)[F_m P_f + (1-F_m) P_n^2 + F_m(1-P_f) P_n^2]$
		$K^{(2a)}_{db} = P_1[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$	$K^{(2a)}_{dd} = P_1[F_m P_f + (1-F_m)P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2]$
$K^{(2b)}$	$K^{(2b)}_s = K^{(2a)}_s$	$K^{(2b)}_{da} = K^{(2a)}_{db}$	

		$K_{db}^{(2b)} = K_{da}^{(2a)}$ $K_S^{(3)} = (1-F_m)P_n(1-P_n)^2 + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)^2$ $K_{db}^{(3)} = K_{da}^{(3)}$	$K_{dd}^{(2b)} = K_{dd}^{(2a)}$ $K_{da}^{(3)} = (1-F_m)P_n^2(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n^2(1-P_n)$ $K_{dd}^{(3)} = F_mP_f + (1-F_m)P_n^3 + F_m(1-P_f)P_n^3$
central en un fragment C₃ (amb igual constant d'acoblament)	K⁽¹⁾	$K_S^{(1)} = P_1(1-P_1)^2$ $K_t^{(1)} = P_1^3$	$K_d^{(1)} = P_1P_1(1-P_1)$
	K⁽²⁾	$K_S^{(2)} = (1-P_1)[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$	$K_d^{(2)} = (1-P_1)[F_mP_f + (1-F_m)P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2] + P_1[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$
	K⁽³⁾	$K_t^{(2)} = P_1[F_mP_f + (1-F_m)P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2]$ $K_S^{(3)} = (1-F_m)P_n(1-P_n)(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)(1-P_n)$ $K_t^{(3)} = F_mP_f + (1-F_m)P_n^3 + F_m(1-P_f)P_n^3$	$K_d^{(3)} = (1-F_m)P_n^2(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n^2(1-P_n)$

Taula 3.5.3-1: Equacions de probabilitat usades per calcular les intensitats relatives dels multiplets de l'espectre

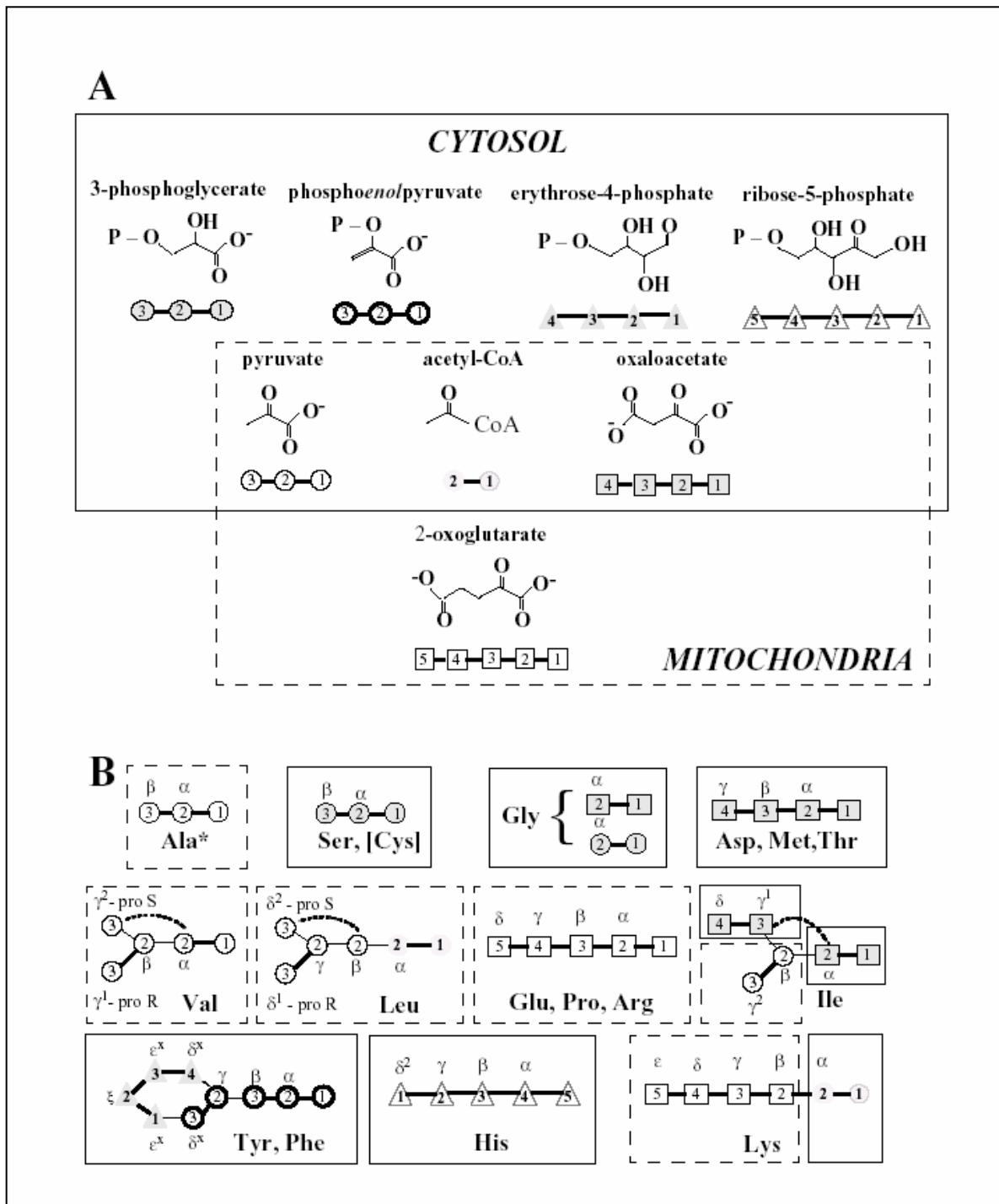


Figura 3.5.3-1 Origen dels esquelets de carboni dels diferents aminoàcids a partir dels seus precursors biosintètics (Maaheimo H. *et al.*, 2001)

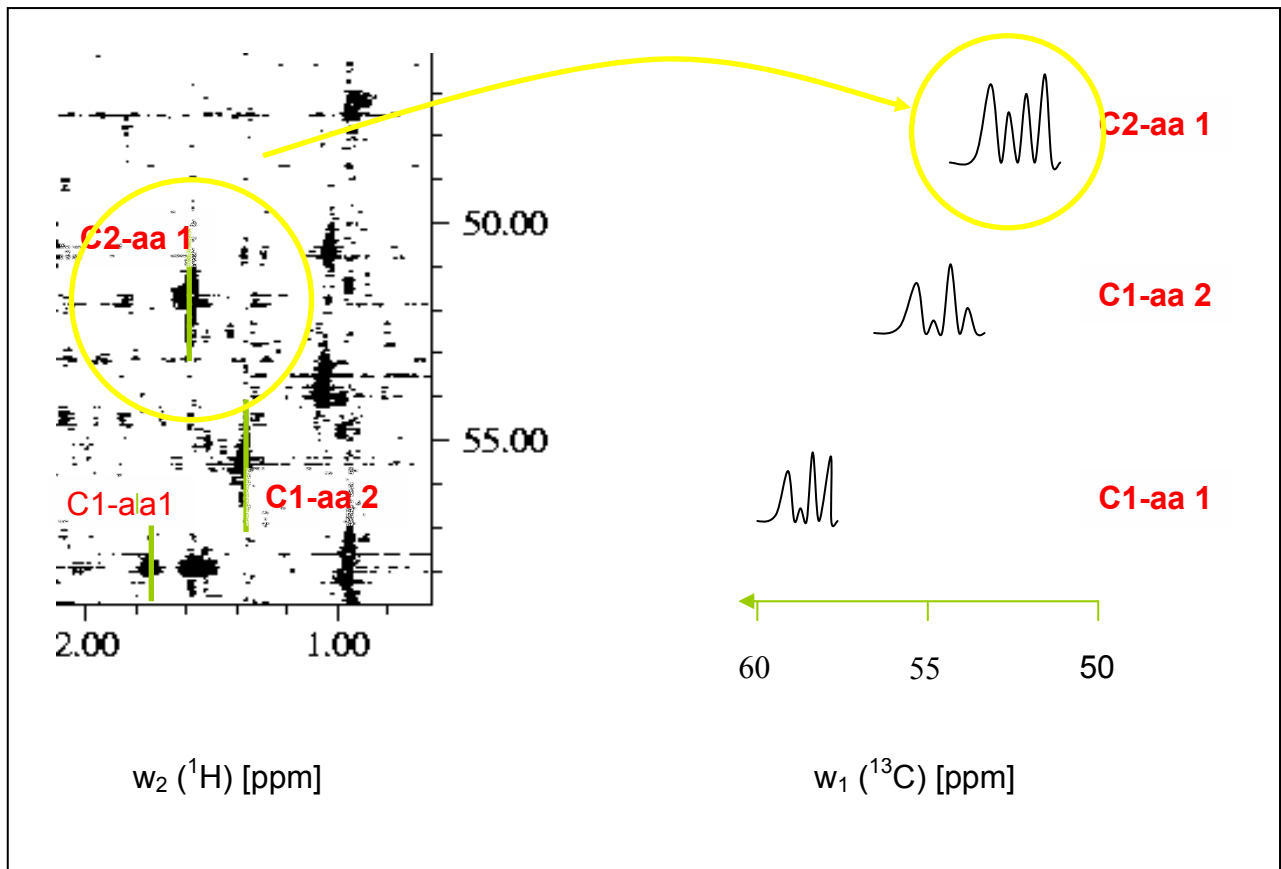


Figura 3.5.3-2: identificació dels diferents carbonis dins d'un dels espectres 2D

Part d'un espectre 2D $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -COSY que conté els senyals de diversos carbonis corresponents a aminoàcids d'un hidrolitzat de proteïna cel·lular (esquerra). A la dreta, es representen unes seccions imaginàries al llarg de l'eix ω_1 (^{13}C) fetes a les línies verdes verticals de l'espectre de l'esquerra. En la integració dels talls al llarg de l'eix ω_1 es té en compte la contribució del senyal d'aquest carboni en tot l'eix ω_2 , és a dir, que s'integra una superposició ponderada de la intensitat del senyal al llarg de l'eix ω_1 . Aquesta identificació de la localització dels carbonis dels diferents aminoàcids la du a terme automàticament el programa FCAL.

A) Àtom de carboni terminal:

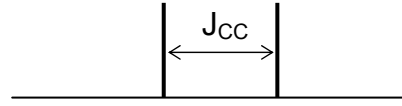
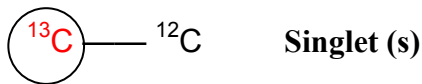
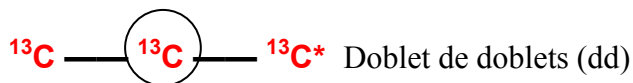
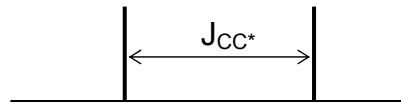
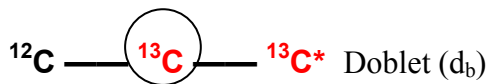
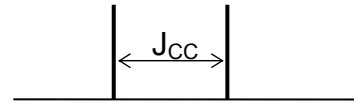
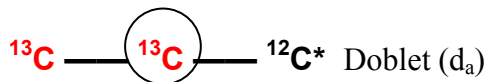
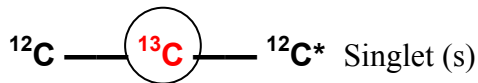
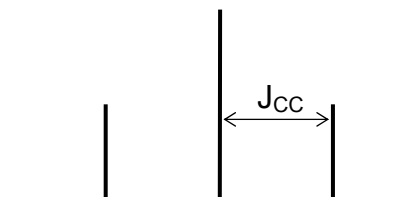
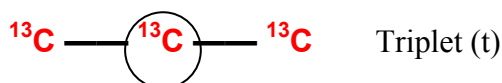
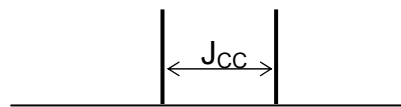
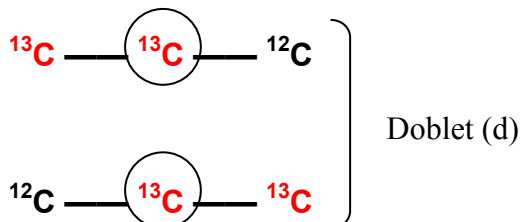
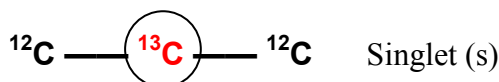
B) Àtom de carboni dins d'un fragment C₃ amb diferent constant d'acoblament (es pot diferenciar els carbonis veïns de l'àtom d'interès).C) Àtom de carboni dins d'un fragment C₃ amb iguals constants d'acoblament.

Figura 3.5.3-3: Intensitats relatives de cada una de les possibilitats que es contemplaran en les diferents molècules dels aminoàcids

Anàlisi de la validesa dels fragmentòmers obtinguts amb el programa FCAL

La següent funció que ofereix el programa FCAL, una vegada han estat calculats els fragmentòmers, és la comprovació de la consistència dels resultats, per exemple, si els aminoàcids que provenen d'un mateix precursor tenen el mateix patró de marcatge o si els valors corresponents dels fragmentòmers són equivalents.

També caldrà comprovar si aquests patrons de marcatge dels aminoàcids són consistents amb les rutes metabòliques conegudes. Aquestes comprovacions les realitza automàticament el programa FCAL. El desenvolupament del programa FCAL per Ralf W. Glaser es va realitzar per a *Escherichia coli*, però la modificació posterior a càrrec de Hannu Maaheimo contempla el model metabòlic de *Saccharomyces cerevisiae*.

Càlcul dels quocients de fluxos metabòlics

Finalment, una vegada s'han obtingut els valors dels diferents fragmentòmers, i s'ha comprovat la consistència dels resultats i la validesa de les rutes de síntesi, cal interpretar el significat d'aquests i calcular el quocient dels fluxos metabòlics.

La versió del programa FCAL inicialment disponible en la tesi, desenvolupada per Ralf W. Glaser, calcula els quocients de fluxos metabòlics per a procariotes (*Escherichia coli*), on el metabolisme no està compartimentat. La modificació més recent del programa, duta a terme per Hannu Maaheimo contempla el model metabòlic de *Saccharomyces cerevisiae*, és a dir, que inclou la compartimentalització subcel·lular de les cèl·lules eucariotes tipus llevat.

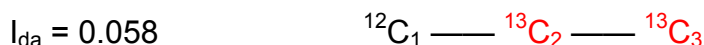
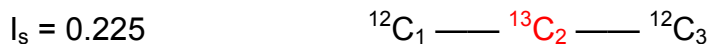
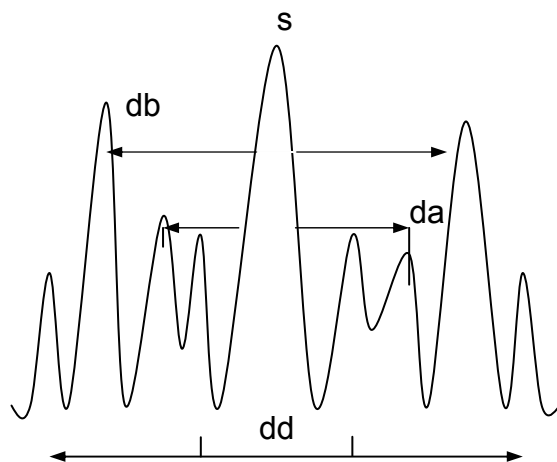
El programa FCAL en la segona versió adequada a cèl·lules eucariotes (Maaheimo H., VTT Biotechnology, Helsinki) només es va poder emprar en el present treball, en l'apartat de resultats 4.6.2 (cultius continus amb barreja de glicerina i metanol, amb marcatge d'ambdós fonts de carboni). Tot i així, en el present treball no s'ha utilitzat les possibilitats que ofereix el programa FCAL per calcular els quocients de fluxos metabòlics sinó que s'ha treballat directament a partir del valor dels fragmentòmers per interpretar l'estat del metabolisme cel·lular. Això ha permès, també, comprovar si les modificacions efectuades per Hannu Maaheimo són vàlides per al cas del present treball, així com desenvolupar els algorismes particulars que siguin necessaris (apartat 4.3.3 dels resultats).

Un exemple del procés des de l'anàlisi de l'espectre 2D fins a l'obtenció de la informació sobre les rutes metabòliques podria ser el següent:

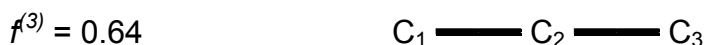
Procés de determinació de les abundàncies relatives de les connexions C-C a partir de l'estructura fina de l'acoblament escalar ^{13}C - ^{13}C . Exemple per a l'aminoàcid aspàrtic.

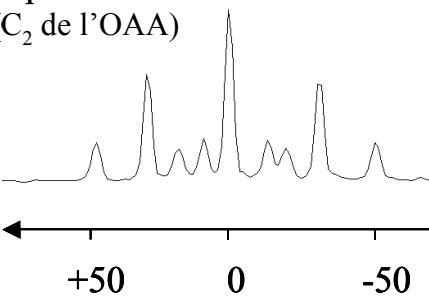
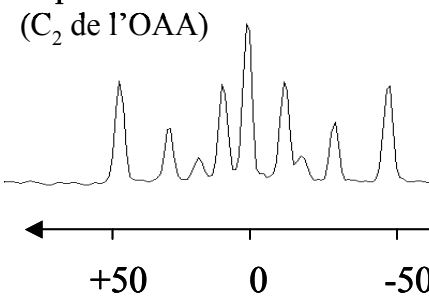
1) La integració de l'estructura fina del carboni C_2 de l'aspartat (en el cultiu amb glicerina com a única font de carboni i a $D=0.16\text{h}^{-1}$) emprant el programa FCAL proporciona els valors relatius de les intensitats dels diferents multiplets, és a dir, l'abundància relativa dels diferents isotopòmers. I_s , I_{da} , I_{db} , I_{dd} indiquen les intensitats

relatives obtingudes per al singlet (s), el doblet amb l'acoblament $^1J_{CC}$ menor (da), el doblet amb l'acoblament $^1J_{CC}$ major (db) i el doblet de doblets (dd) (apèndix 6.5.2).



2) Les abundàncies relatives dels fragments de carbonis enllaçats intactes que provenen d'una sola molècula font de glicerina es calculen emprant el sistema d'equacions de probabilitat presentat anteriorment (Szyperski T., 1995). Aquestes connexions que provenen d'una sola molècula font de glicerina estan marcades en negreta. Els valors de $f^{(1)}$, $f^{(2)}$, $f^{(2*)}$ i $f^{(3)}$ designen les fraccions de les molècules d'aminoàcids que tenen el carboni C_2 envoltat de carbonis que provenen d'altres molècules font de glicerina ($f^{(1)}$), que tenen el fragment $\text{C}_2\text{-C}_3$ procedent de la mateixa molècula font de glicerina ($f^{(2)}$) o bé el fragment $\text{C}_1\text{-C}_2$, o finalment, que els tres carbonis $\text{C}_1\text{-C}_2\text{-C}_3$ provenen de la mateixa i única molècula font de glicerina ($f^{(3)}$).



Vel. dilució 0.05 h ⁻¹		Vel. dilució 0.16 h ⁻¹	
Asp α (C ₂ de l'OAA) 		Asp α (C ₂ de l'OAA) 	
w_2 (¹³ C) [Hz]		w_2 (¹³ C) [Hz]	
$C_1 \times C_2 \times C_3 \cdots C_4$ 26%	$C_1 \times C_2 - C_3 \cdots C_4$ 9%	$C_1 \times C_2 \times C_3 \cdots C_4$ 14%	$C_1 \times C_2 - C_3 \cdots C_4$ 4%
$C_1 - C_2 \times C_3 \cdots C_4$ 42%	$C_1 - C_2 - C_3 \cdots C_4$ 23%	$C_1 - C_2 \times C_3 \cdots C_4$ 18%	$C_1 - C_2 - C_3 \cdots C_4$ 64%

3) Si es consideren les abundàncies dels fragmentòmers derivades de la integració i anàlisi del C₃ de l'aspartat, que són les següents:

$$f^{(1)} = 0.14 \quad C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4$$

$$f^{(2)} = 0.65 \quad C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4$$

$$f^{(2^*)} = 0.17 \quad C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4$$

$$f^{(3)} = 0.04 \quad C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4$$

4) I tenint en compte que s'han d'obtenir els mateixos valors de percentatges d'enllaços tallats i conservats quan s'observen les connexions dels carbonis C₂-C₃ des de les dues bandes, es poden reconstruir les abundàncies relatives dels fragments d'enllaços de carbonis intactes per a tota la molècula d'aspartat. Cal remarcar, però, que l'anàlisi del metabolisme central del carboni i dels quocients de fluxos es realitza, també, a partir de l'anàlisi dels valors dels mateixos fragmentòmers i de les relacions que entre ells es troben, tal i com es veurà més endavant en els resultats d'aquest treball.

$$C_1 \text{ — } C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4 \quad 0\%$$

$$C_1 \text{ — } C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4 \quad 65\%$$

$$C_1 \text{ — } C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4 \quad 4\%$$

$$C_1 \text{ — } C_2 \text{ — } C_3 \text{ — } C_4 \quad 18\%$$

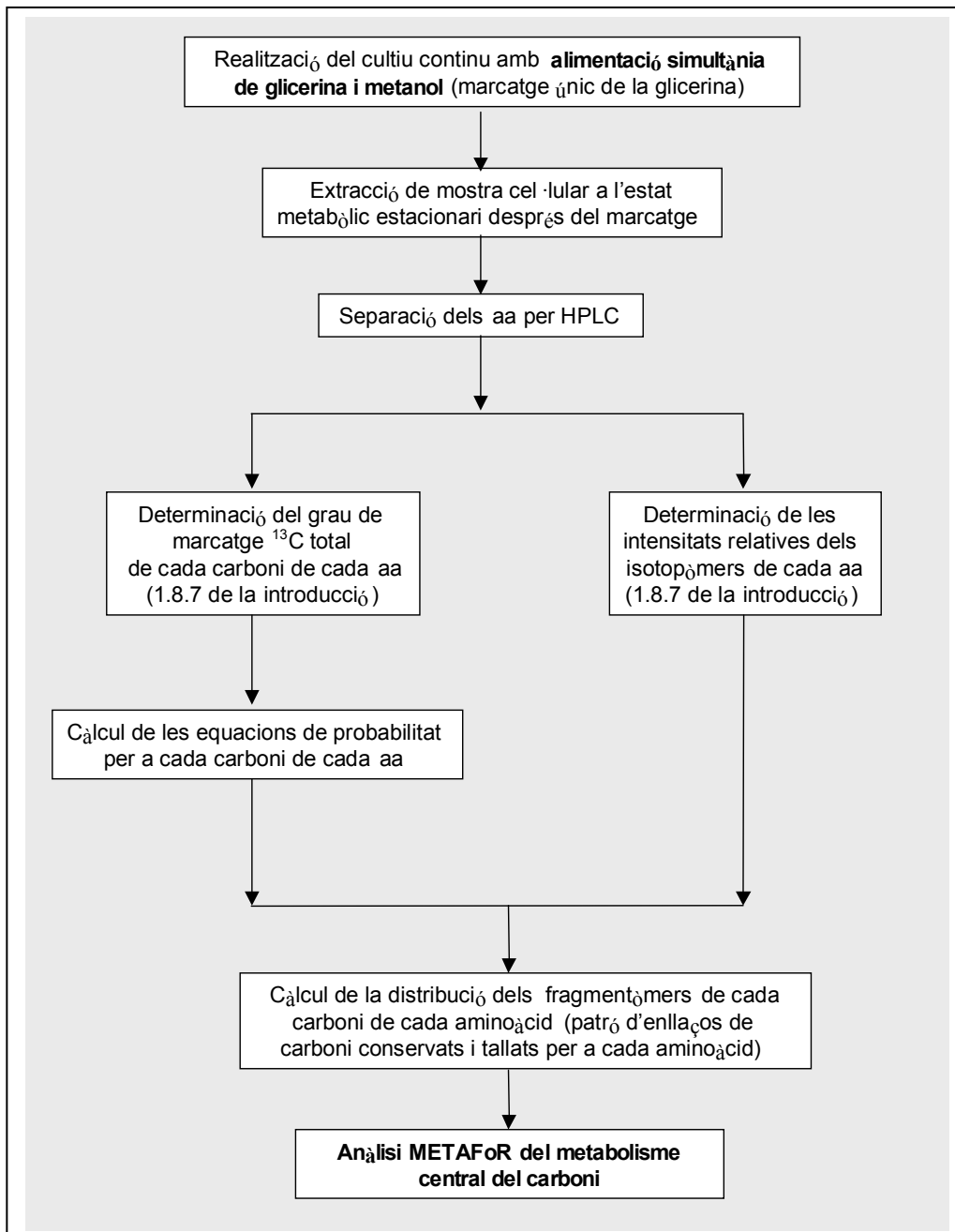
C₁ — C₂ — C₃ — C₄ 13%

C₁ — C₂ — C₃ — C₄ 0%

5) A partir de les abundàncies relatives dels fragmentòmers anteriors, es pot extreure informació sobre les rutes metabòliques. Els enllaços de carboni tallats o conservats dependran de les rutes metabòliques que les molècules de glicerina hagin seguit abans de convertir-se en aspartat.

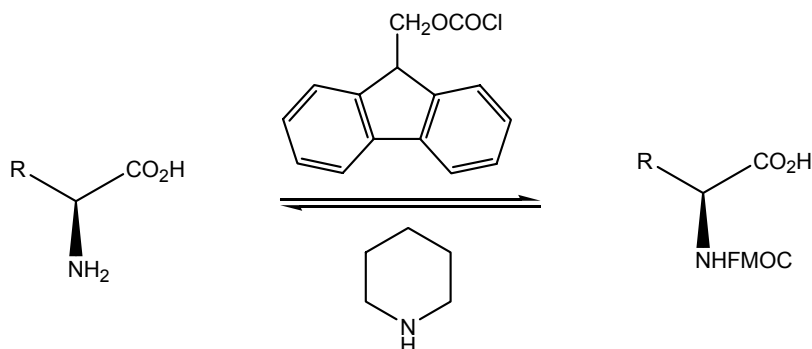
3.5.4. Adaptació del mètode METAFoR (Metabolic Flux Ratio Analysis) als cultius amb alimentació simultània de glicerina i metanol amb marcatge únic de la glicerina

L'esquema de l'adaptació d'aquest mètode és el següent:



Separació dels aminoàcids i quantificació de la incorporació de ^{13}C : metodologia emprada en el present treball a l'apartat 4.5.1. dels resultats

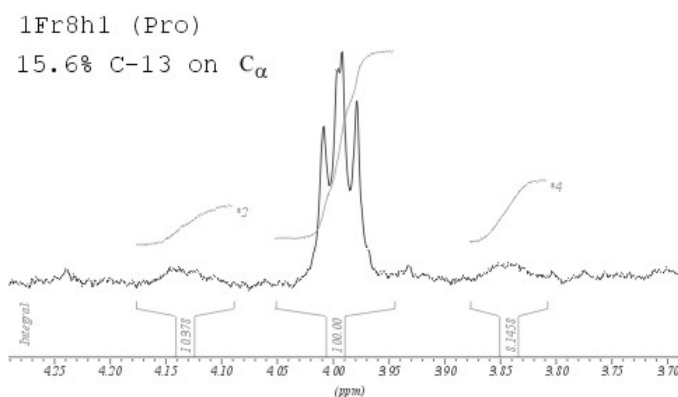
En el present treball la separació quantitativa dels aminoàcids s'ha efectuat mitjançant derivatització (Fmoc), cromatografia HPLC i eliminació del grup protector de cada Fmoc-aminoàcid per tractament amb piperidina (apartat 3.4), mètode descrit fa molts anys (Einarsson S. *et al.*, 1983) i que dona bons resultats.



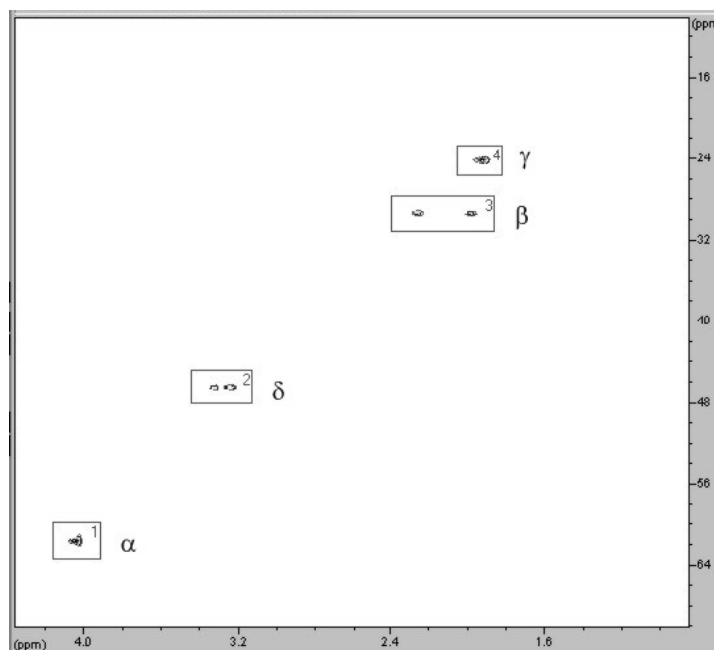
Com a precursor marcat i única font de carboni dels cultius s'han emprat mesclades en percentatges diversos de glicerina normal i [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina.

La determinació quantitativa del grau de marcatge amb ^{13}C de cada un dels carbonis dels diversos aminoàcids per RMN (en D_2O , a 500 MHz per ^1H) s'ha efectuat en quatre etapes:

- Obtenció d'un bon espectre monodimensional de ^1H , en el qual el senyal del protó α presenta generalment molt bona resolució, i integració acurada del senyal del protó α i dels seus satèl·lits ^{13}C . La relació d'intensitats integrades d'aquests dos tipus de senyals permet obtenir el grau de marcatge (expressat en percentatge) del carboni α . Exemple (Pro):

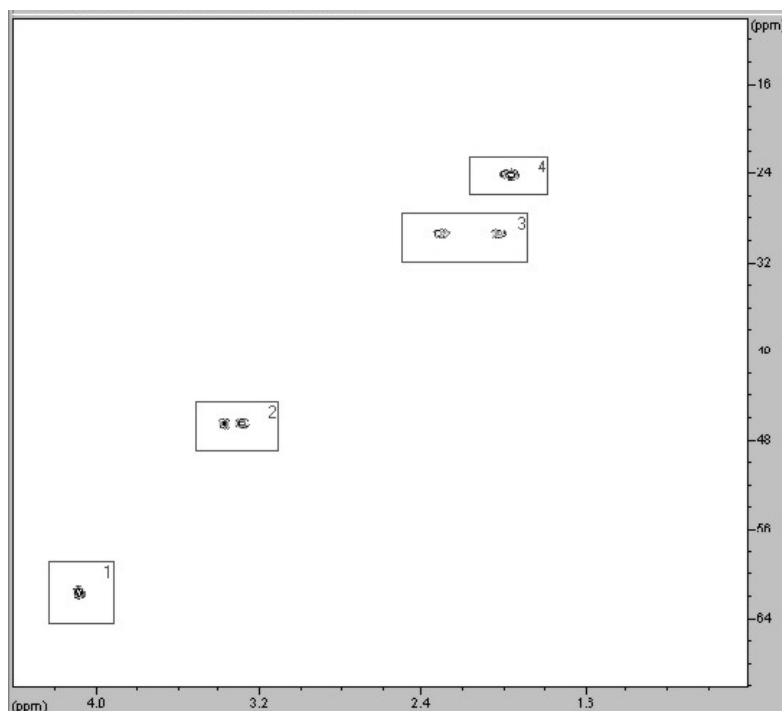


- Obtenció d'un bon espectre bidimensional HSQC de l'aminoàcid en qüestió a abundància natural (és a dir, l'aminoàcid comercial normal) i integració bidimensional acurada de tots els pics de correlació protó-carboni. Atès que el contingut en ^{13}C de cada posició és de l'1,1%, els valors obtinguts de la integració bidimensional es poden utilitzar per normalitzar les integracions de cada posició. Exemple (Pro):



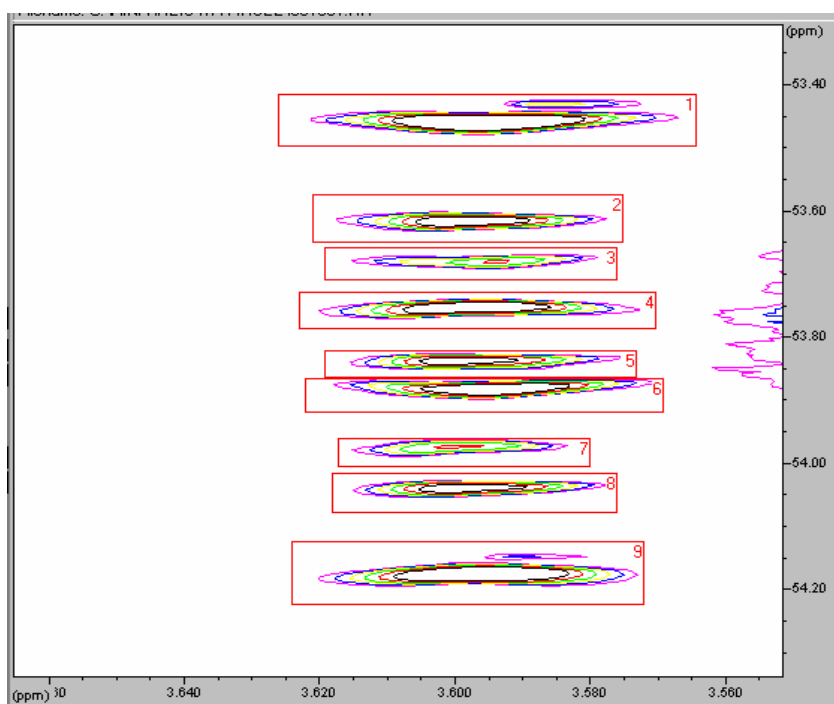
No.	SI_F1 SI_F2	row1 col1	row2 col2	row1(ppm) col1(ppm)	row2(ppm) col2(ppm)	Integral	Norm.Int.	mode
1	17	28	44	63.44		59.69	11897387725	1.000
	+							
	73	56	128	4.16	3.91			
2	15	94	108	47.97		44.69	12808872872	1.077
	+							
	93	265	357	3.44	3.13			
3	16	166	181	31.09		27.58	14682244121	1.234
	+							
	157	572	728	2.39	1.86			
4	14	189	202	25.70		22.66	12151095617	1.021
	+							
	69	672	740	2.05	1.82			

- c) Exactament en les mateixes condicions experimentals de l'apartat b), obtenció d'un espectre bidimensional HSQC de l'aminoàcid biosintetitzat i integració bidimensional acurada de tots els pics de correlació protó-carboni. Per normalització d'aquestes integracions respecte de les obtingudes a l'apartat b), i emprant el valor del grau de marcatge del carboni α obtingut a l'apartat a), finalment s'obté el grau de marcatge (en percentatge) amb ^{13}C de cada un dels carbonis no quaternaris de l'aminoàcid. Exemple (Pro):



No.	SI_F1	row1	row2	row1(ppm)	row2(ppm)	Integral	Norm.Int.	mode
	SI_F2	col1	col2	col1(ppm)	col2(ppm)			
1	25	24	48	64.38		58.75	20797715466	1.000
	+							
	91	48	138	4.23	3.91			
2	20	90	109	48.91		44.45	26459344211	1.272
	+							
	117	251	367	3.52	3.11			
3	19	163	181	31.80		27.58	30932412988	1.487
	+							
	175	542	716	2.49	1.88			
4	16	188	203	25.94		22.42	25054263557	1.205
	+							
	109	636	744	2.17	1.79			

- d) Obtenció d'un espectre HSQC-PEP doblement selectiu, amb molt alta resolució en la dimensió indirecta F1 (^{13}C), corresponent únicament al pic creuat entre el protó α i el carboni α , que permet resoldre els senyals dels diversos isotopòmers: i) el singlet degut a l'isotopòmer monomarcant al carboni α (requadre 5); ii) el doblet ($^1J_{\text{CC}} = 50\text{-}60\text{ Hz}$) degut a l'isotopòmer doblement marcat al carboni α i al carboni carboxílic (requadres 2 i 8); iii) el doblet ($^1J_{\text{CC}} = 30\text{-}40\text{ Hz}$) degut a l'isotopòmer doblement marcat als carbonis α i β (requadres 3 i 7); i iv) el doble doblet (amb tots dos valors de $^1J_{\text{CC}}$ anteriors) degut a l'isotopòmer triplement marcat als carbonis carboxílic, α i β (requadres 1, 4, 6 i 9). Exemple (Threonina):

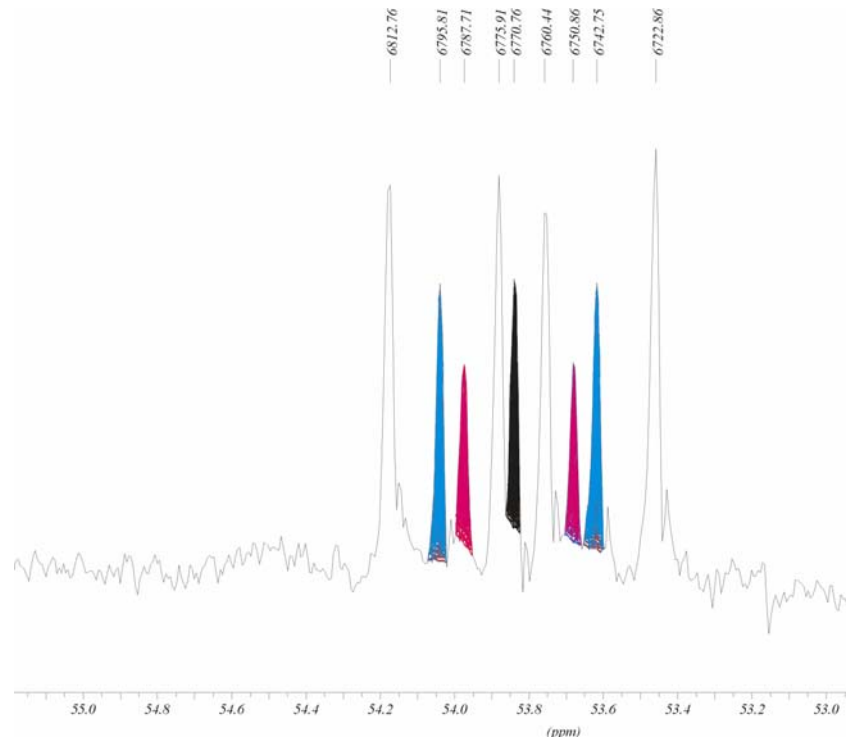


No.	SI_F1	row1	row2	row1(ppm)	row2(ppm)	Integral	Norm.Int.	mode
SI_F2	col1	col2	col1(ppm)	col2(ppm)				
1	29	585	613	53.49	53.41	12959650091	2.786	+
64	321	384	3.63	3.56				
2	27	533	559	53.64	53.57	5572370002	1.198	+
48	326	373	3.62	3.58				
3	18	513	530	53.70	53.65	2703418233	0.581	+
45	328	372	3.62	3.58				
4	21	486	506	53.78	53.72	6991572241	1.503	+
55	324	378	3.62	3.57				
5	15	460	474	53.86	53.82	4651295871	1.000	+
48	328	375	3.62	3.57				
6	19	441	459	53.91	53.86	6591286274	1.417	+
55	325	379	3.62	3.57				
7	16	412	427	54.00	53.95	2714803018	0.584	+
39	330	368	3.62	3.58				
8	22	387	408	54.07	54.01	4350017295	0.935	+
44	329	372	3.62	3.58				
9	35	337	371	54.22	54.12	10628860249	2.285	+
54	323	376	3.62	3.57				

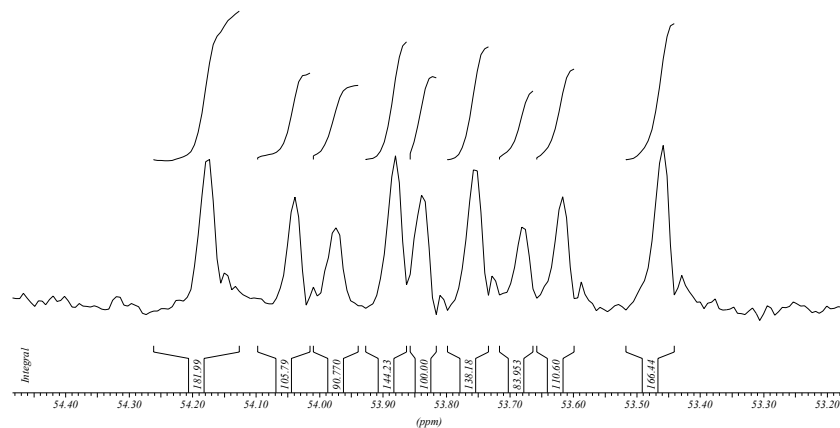
La integració bidimensional acurada dels senyals d'aquests quatre isotopòmers en dona les seves proporcions relatives, que juntament amb la seva suma determinada a l'apartat a) permeten obtenir els percentatges de cada isotopòmer. La suma dels percentatges corresponents als isotopòmers descrits als apartats ii) i iv) d'aquest paràgraf (requadres 1, 2, 4, 6, 8 i 9) és el percentatge global de marcatge del carboni carboxílic.

Un altre procediment per integrar aquests espectres bidimensionals de molt alta resolució consisteix en sumar totes les seccions en F1 (dimensió del ^{13}C) que contribueixen als pics significatius de l'espectre. Així s'obté un únic espectre monodimensional de ^{13}C , en el qual es poden identificar amb facilitat els multiplets dels diversos isotopòmers, i la seva integració permet determinar les proporcions de cada un

dels isotopòmers. L'exemple és també de la Threonina. El pic ressaltat en color negre correspon a $[2-^{13}\text{C}_1]\text{-Thr}$. El doblet ressaltat en blau correspon a $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{-Thr}$. El doblet ressaltat en vermell correspon a $[2,3-^{13}\text{C}_2]\text{-Thr}$. I el doblet sense ressaltar correspon a $[1,2,3-^{13}\text{C}_3]\text{-Thr}$.



La integració d'aquest mateix espectre es dona a continuació:



Cal esmentar aquí que el mètode descrit per de Graaf *et al.* (2000) i Wendisch V.F. *et al.* (1997) també permet obtenir el grau de marcatge del carboni carboxílic, però no permet obtenir informació sobre els percentatges de cada un dels diversos isotopòmers, ja que únicament dona resultats globals. En aquest treball s'ha comprovat que el mètode descrit a l'apartat d) dona el mateix valor de grau de marcatge del carboni carboxílic que l'obtingut pel mètode de de Graaf *et al.* (2000), però donat que el mètode descrit a l'apartat d) permet obtenir més informació sobre la distribució dels diversos isotopòmers i és més fàcil d'implementar, s'ha preferit emprar aquest mètode de manera generalitzada en aquest treball. Finalment, cal indicar que tant la integració de l'espectre

monodimensional suma de seccions F1 (tal com el presentat a la figura anterior) com la integració de la més intensa d'aquestes seccions F1 donen resultats equivalents a la integració bidimensional directa que es presenta a la figura de la Thr, raó per la qual sempre s'ha optat per aquesta integració bidimensional directa.

3.6. Determinació dels paràmetres cinètics dels cultius

Rendiments

(Gòdia Casablanca, F., López Santí, J., i col·laboradors, 1998)

El concepte de substrat limitant permet definir rendiments del procés. A partir de les dades experimentals de la quantitat de substrat consumit i de la biomassa obtinguda, pot observar-se que hi ha una relació entre ells que, en molts casos, és una proporcionalitat directa.

Es defineix el rendiment biomassa-substrat com el quocient entre l'increment de massa cel·lular obtinguda i el consum de substrat (normalment font de carboni):

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S$$

El rendiment té unitats derivades de les utilitzades per a la mesura de la biomassa i el substrat (per exemple grams de biomassa/ grams de substrat o grams de biomassa /grams de substrat, etc.). Els rendiments globals, calculats a partir de les dades experimentals de creixement, depenen de la font de carboni utilitzada i, a més, de les condicions d'operació, i poden variar al llarg del procés, ja que dins d'aquests valors s'engloben utilitzacions del substrat que no estan directament associades a la producció de biomassa.

De la mateixa manera que es defineix el rendiment biomassa-substrat, es poden definir altres rendiments per a altres parelles de paràmetres del procés:

definicions de rendiments	
símbol	definició
$Y_{X/S}$	unitat de biomassa produïda per unitat de substrat consumit (p.ex. gram de biomassa seca per gram de substrat consumit o taxa de creixement molar, és a dir, grams de biomassa seca per mols de substrat consumit)
$Y_{X/O}$	unitat de biomassa produïda per unitat d'oxigen consumit (p.ex. gram de biomassa seca per gram d'oxigen consumit o per mols d'oxigen consumit)
$Y_{P/S}$	unitat de producte produït per unitat de substrat consumit (p.ex. gram o mols de producte per gram o mol de substrat consumit)
$Y_{C/S}$	mol de CO ₂ produït per mol de substrat consumit

A partir de la definició dels rendiments anteriors, es poden definir els seus respectius rendiments inversos. Per exemple, es pot definir el rendiment substrat-biomassa, $Y_{S/X}$, com a unitat de substrat consumit per unitat de biomassa produïda. Així, $Y_{S/X} = (Y_{X/S})^{-1}$.

Per als cultius continus, el càlcul dels rendiments a partir de les dades experimentals es realitza de la següent manera:

Una vegada assolit l'estat estacionari,

$$Y_{X/S} = \frac{X_{sortida} - X_{entrada}}{S_{entrada} - S_{sortida}}$$

on, X_{entrada} serà zero ja que l'alimentació és estèril.

Per als cultius discontinus o *batch*, en canvi,

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\text{final}} - X_{\text{inicial}}}{S_{\text{inicial}} - S_{\text{final}}}$$

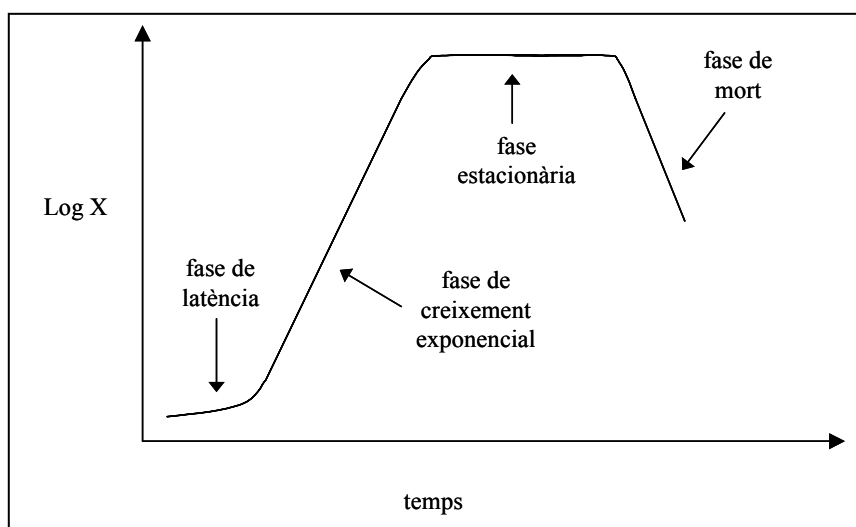
Velocitat màxima específica o $\mu_{\text{màx}}$

(Gòdia Casablancas, F., López Santí, J., i col·laboradors, 1998)

Com s'ha explicat a la introducció, el procés de creixement cel·lular, que es produeix a partir del consum d'uns determinats substrats i que condueix a la formació d'una sèrie de productes, és molt complex, donat que és el resultat de la interacció entre una població cel·lular i el medi ambient en què es troba. Un model cinètic de creixement que intenti contemplar tots aquests aspectes és impossible de formular i, en qualsevol cas, la seva aplicació seria molt poc pràctica donada la gran quantitat d'informació que requeriria. Per tant, caldrà efectuar una sèrie de suposicions que permetin una simplificació del problema però que, al mateix temps, permetin obtenir una representació útil de la cinètica de creixement d'una població cel·lular. En funció del grau d'aproximació adoptat, s'obtidran models més complexos o més simples.

L'aproximació que s'anomena *creixement balancejat* es basa en definir tot el procés de creixement cel·lular en funció d'un component individual, que controla la seva velocitat, donat que és el substrat limitant, mentre que la resta de components es troben en concentracions adequades i no limitants per al creixement. L'aproximació que es denomina com *cèl·lula promig*, consisteix en considerar que totes les cèl·lules d'una població són iguals i es comporten de la mateixa manera.

Les dades cinètiques d'una població cel·lular es poden obtenir bàsicament utilitzant dos sistemes de reacció, el reactor continu de tanc agitat i el reactor discontinu de tanc agitat. En el cas del reactor discontinu, el creixement de les cèl·lules té lloc dins del reactor i, al no haver una regeneració del medi de cultiu, el creixement es deté quan s'arriba a algun tipus de limitació (els més freqüents són el consum d'un nutrient essencial, l'acumulació d'un producte tòxic del metabolisme i la limitació per oxigen). Les fases típiques d'un creixement cel·lular en discontinu es mostren a la següent figura:



En primer lloc existeix una fase de latència, en la qual no es produeix un augment substancial del nombre de cèl·lules, que es requereix per a l'adaptació d'aquestes al medi i a les condicions de cultiu. A continuació s'inicia la fase de creixement exponencial, en la qual el creixement s'efectua a la velocitat específica de creixement constant, $\mu_{m\grave{a}x}$. En aquesta fase es pot considerar que el creixement està balancejat, en el sentit que no existeixen limitacions i el comportament metabòlic i fisiològic de les cèl·lules és bàsicament constant. De vegades també es defineix el comportament de les cèl·lules en aquesta fase com d'estat pseudo-estacionari. L'equació que descriu l'augment de la concentració cel·lular en aquest cas és:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\grave{a}x} X$$

amb una determinada concentració de cèl·lules al final de la fase de latència (t_{lag}) que dependrà de l'inòcul utilitzat (X_0). Així, per a $t = t_{lag}$, es tindrà que $X = X_0$, de manera que es pot integrar l'equació de la següent manera:

$$\int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu_{m\grave{a}x} \int_{t_{lag}}^t dt$$

La forma integrada de l'equació serà, doncs:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{m\grave{a}x} (t - t_{lag})$$

També,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{m\grave{a}x} (t - t_{lag})$$

De manera que,

$$X = X_0 \exp [\mu_{m\grave{a}x} (t - t_{lag})]$$

La forma habitual de determinar el valor de $\mu_{m\grave{a}x}$ a partir de les dades experimentals d'un creixement en discontinu és una representació semilogarítmica d' X front al temps. A partir de la pendent d'aquesta recta representada s'obté directament el valor de $\mu_{m\grave{a}x}$.

Les unitats de la velocitat específica de creixement de biomassa seran temps^{-1} , per exemple, h^{-1} :

$$\mu = r_X/X \quad (\text{g}_{\text{bio}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) \cdot (\text{g}_{\text{bio}} \cdot \text{l}^{-1})^{-1}$$

Cal tenir en compte que els estudis cinètics s'han de realitzar en condicions constants de temperatura i pH, i a més, que les concentracions d'oxigen no assoleixen nivells limitants per al creixement.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. Estudi de les diferents soques i vectors d'expressió emprats

Un dels objectius principals d'aquest treball és la caracterització del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* creixent en diferents condicions ambientals, concretament amb diferents fonts de carboni i diferents velocitats de creixement. Aquests estudis pretenen proporcionar una base de coneixement que faciliti el disseny racional d'estratègies de cultiu per a aquest sistema, particularment d'aquelles que permetin minimitzar l'ús de metanol com a font de carboni i substrat inductor de l'expressió heteròloga de proteïnes, i maximitzar la productivitat del sistema. Així mateix, la caracterització del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* permetrà també la seva modelització i futur disseny d'estratègies d'enginyeria metabòlica.

Així, inicialment, es realitzaren una sèrie d'experiments encaminats a comprovar o establir (segons el cas) el grau de repressió que presenten diferents fonts de carboni sobre el promotor *AOXI* (P_{AOXI}). Tal i com s'ha explicat a la Introducció d'aquest treball, el mecanisme de regulació de la transcripció del gen *AOXI* està sotmès a dos tipus de mecanismes, un sistema de repressió/derepressió per catabolít i un d'inducció específica per substrat, que en aquest cas concret és el metanol. En *Pichia pastoris* les condicions de derepressió no són suficients perquè es doni una transcripció del gen *AOXI*, sinó que es requereix la presència d'un substrat inductor.

És conegut que fonts de carboni com la glucosa, la glicerina i l'etanol reprimeixen la transcripció a partir del P_{AOXI} en presència de metanol, mentre que fonts de carboni com el sorbitol no reprimeixen la inducció del P_{AOXI} per part del metanol (Thorpe, E.D. *et al.*, 1999) (vegeu també l'apartat 1.4.3 de la Introducció d'aquest treball). No obstant, també s'ha descrit que el P_{AOXI} de *Pichia pastoris* pot ser induït per metanol en presència de glicerina, quan la concentració residual d'aquesta en el medi és limitant (zero o propera a zero) (Brierley R.A. *et al.*, 1990; Chiruvolu V. *et al.*, 1997).

Per tal d'establir de manera senzilla i ràpida si una font de carboni donada reprimeix o no la inducció del P_{AOXI} per part del metanol, s'ha construït una soca Mut^- que expressa la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) sota el control transcripcional del P_{AOXI} . Tot i que aquesta soca no pot metabolitzar el metanol, sí que permet induir l'expressió de ROL amb aquest substrat d'una manera senzilla, ja que minimitza la necessitat de controlar la seva concentració en el medi de cultiu per tal de mantenir-la constant al llarg del temps de cultiu (només caldrà afegir metanol per compensar les pèrdues per evaporació). Aquest sistema també permet observar per separat els efectes d'una font de carboni sobre el creixement de *Pichia pastoris* i la inducció del P_{AOXI} . D'altra banda, l'obtenció d'una soca Mut^- productora de ROL completarà la bateria de soques de *Pichia pastoris* disponibles al nostre laboratori, disposant així de soques productores de ROL amb els tres fenotips Mut^- possibles, és a dir, amb diferents capacitats d'assimilació de metanol, fet que pot ser potencialment d'utilitat per als estudis metabòlics que es volen portar a terme al llarg del treball.

Així doncs, en el present treball, les soques que s'han fet servir i els seus corresponents fenotips són els següents:

Soca de <i>Pichia pastoris</i>	Fenotip
X-33	Mut ⁺
KM7121	Mut ⁻

Els dos plàsmids que s'han fet servir són el pPICZ α (Invitrogen) i el seu derivat pPICZ α -ROL (Minning S. *et al.*, 1998; Serrano A., 2002), el qual conté el gen *ROL* fusionat a una regió codificadora del senyal de secreció del factor d'aparellament α (α mating factor de *Saccharomyces cerevisiae*), sota el control transcripcional del P_{AOX1} (vegeu la secció 3.1.1 de Materials i Mètodes per a més detalls).

La combinació de les soques i els plàsmids descrits anteriorment en el present treball va servir per construir les següents soques:

Soca original <i>Pichia pastoris</i>	Plàsmid incorporat	Soca resultant	Fenotip
X-33	pPICZ α	X-33 control	Mut ⁺
	pPICZ α -ROL	X-33/ROL	Mut ⁺ , expressió regulada de ROL
KM7121	pPICZ α	KM7121 control	Mut ⁻
	pPICZ α -ROL	KM7121/ROL	Mut ⁻ , expressió regulada de ROL

Les soques X-33/control i X33-ROL les va construir l'Alicia Serrano (Minning S. *et al.*, 2001; Serrano A., 2002) mentre que les soques KM7121/control i KM7121-ROL es van construir en el present treball tal i com es descriu a la secció 3.1.3 de Materials i Mètodes.

4.1.1. Interès de cada una de les soques

Les soques X33/control i X33-ROL obtingudes tenen totes un fenotip Mut⁺ (*Methanol utilisation plus*). Això significa que la recombinació i inserció del casset d'expressió no ha implicat la interrupció del gen *AOX1*, i que, per tant, la síntesi d'alcohol oxidasa (*AOX1*) no es veu afectada. La soca X-33 ha estat escollida inicialment per a portar a terme els estudis de caracterització del metabolisme de *Pichia pastoris*, donat que és una soca prototròfica (permet el seu cultiu en medi mínim sense suplementació de cap amino àcid), de fenotip essencialment salvatge, comercialment disponible i àmpliament utilitzada (juntament amb la soca GS115, isogènica a X-33, excepte que la GS115 és auxotròfica per histidina), tant comercialment com en recerca bàsica per a la producció de proteïnes heteròlogues.

Les soques KM7121/control i KM7121-ROL, en canvi, tenen un fenotip Mut⁻. La soca KM7121 no està disponible comercialment i ha estat cedida pel Prof. James M. Cregg (Kecks Graduate Institute, CA, USA). Tal i com s'ha explicat, aquestes soques es van construir amb l'objectiu d'establir un sistema senzill de selecció de fonts de carboni repressores/no repressores de l'assimilació de metanol en *Pichia pastoris*. D'altra banda, la disponibilitat de soques Mut⁺ i Mut^s (construïdes per Alicia Serrano, Serrano A., 2002) i Mut⁻ (construïda en aquest treball) que expressin extracel·lularment la ROL està permetent al nostre Grup de recerca estudiar de manera sistemàtica l'efecte del fenotip sobre la productivitat del sistema de producció, així com dissenyar i optimitzar

estratègies de cultiu a elevades densitats cel·lulars per a aquests diferents tipus de soques, i en particular, dissenyar estratègies de control de la concentració residual de metanol en el medi de cultiu i del creixement cel·lular. L'ús de soques Mut^s i Mut⁻ presenta, potencialment, interessants avantatges pel que fa a la simplificació d'estratègies de control de la concentració residual de metanol en el cultiu, al mateix temps, minimitzar-ne el seu ús. Per exemple, l'ús d'una soca Mut⁻, que no és capaç de metabolitzar el metanol, evitaria la necessitat d'haver de controlar en línia la concentració de metanol al medi i només caldria fer addicions puntuals de metanol al medi de cultiu per tal de compensar el metanol que desapareix per evaporació (*stripping*), com ja s'ha explicat més amunt. El metanol, que es mantindria constant dins del reactor, serviria únicament d'inductor de la producció de lipasa (o proteïna recombinant d'interès), mentre que es faria servir un altre substrat per al creixement cel·lular. Així, es disposaria d'una font d'inducció de l'enzim (o proteïna d'interès) independent de la font de carboni. D'altra banda, s'aconseguiria la simplificació dels protocols de control en cultius a micro i mini escala (des de cultius en microplaques ELISA fins a Erlenmeyers) o en minireactors utilitzats en sistemes de producció d'alt rendiment (*high throughput*) de proteïnes recombinants per a aplicacions de genòmica estructural (Boettner M. *et al.*, 2002).

4.1.2. Selecció de fonts de carboni

Per a la realització d'aquest estudi, es preparen un conjunt de plaques d'agar amb medi mínim que contenen *tween-80* (Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate), el qual dóna terbolesa al medi de cultiu, permetent visualitzar la producció de lipasa al ser hidrolitzat per aquest (apareix un halus transparent al voltant de la colònia de *Pichia pastoris*), i diferents combinacions de metanol (inductor de la producció de lipasa) amb els següents substrats: glicerina (C3), ribosa (C5), xilosa (C5), fructosa (C6), glucosa (C6), mannososa (C6), sorbitol (C6) i mannitol (C6).

La glucosa i glicerina (en un grau menor) són dos substrats dels quals es coneix *a priori* que presenten repressió per catabolisme en llevats i que reprimeixen la transcripció a partir del P_{AOXI} en *Pichia pastoris*. L'efecte repressor d'altres hexoses (a excepció del sorbitol) sobre els nivells de transcripció d'aquest promotor de *Pichia pastoris* no han estat documentades fins ara. D'altra banda, es creu interessant investigar l'efecte que tenen les pentoses sobre els nivells de transcripció del P_{AOXI}, ja que les pentoses estan involucrades en la via metabòlica d'assimilació del metanol (vegeu l'apartat 1.7.1 de la Introducció).

Així doncs, es cultiva la soca Mut⁻ que expressa la ROL en el conjunt de plaques següent (la composició de les quals es detalla a l'apartat 3.1.2 dels Materials i Mètodes):

Plaques amb <i>tween</i> i metanol (0.3 g/l)	
SUBSTRAT (20g/l)	Glicerina
	Ribosa
	Xilosa
	Fructosa
	Glucosa
	Mannosa
	Sorbitol
	Mannitol

Els resultats obtinguts pel que fa a l'observació de producció de lipasa en cada una de les plaques per a les diferents soques va ser la següent:

Soca KM7121-ROL		Creixement	Producció lipasa
substrat (20 g/l)	Glicerina	++	–
	Ribosa	+	+
	Xilosa	++	–
	Fructosa	+ ++	–
metanol (0.3 g/l)	Glucosa	+ ++	–
	Mannosa	++	–
	Sorbitol	+	+
	Mannitol	+	+

A partir d'aquests resultats es va concloure que les fonts de carboni més interessants a usar per a la realització d'estudis sobre la regulació del metabolisme del metanol serien la ribosa, el sorbitol i el manitol com a substrats no repressors de l'assimilació de metanol. D'aquests tres, es va escollir inicialment el sorbitol com a substrat C6 no repressor model, perquè ja s'havia emprat prèviament en algun estudi de cultius en bioreactor (vegeu la Introducció d'aquest treball) així com pel seu preu més barat. D'altra banda, la glucosa i glicerina es varen seleccionar inicialment com a substrats repressors model, la glucosa com a substrat de referència per a la validació de la metodologia METAFoR a *Pichia pastoris* i comparació amb altres estudis semblants publicats, i la glicerina com a substrat àmpliament utilitzat en processos de cultiu amb *Pichia pastoris* i per tant per a adaptar la metodologia METAFoR al cas de co-assimilació amb metanol.

En resum, aquest senzill sistema experimental petri ha permès seleccionar fàcilment substrats repressors i no repressors del P_{AOXI} d'una manera qualitativa, i fins i tot poder detectar diferents graus de repressió. Els substrats seleccionats seran utilitzats en estudis de caracterització del metabolisme central del carboni mitjançant tècniques de marcatge isotòpic.

Igualment, el fet de disposar de dues soques que expressen la ROL sota el control del P_{AOXI} però amb diferents fenotips Mut constitueix una altra eina valuosa pels estudis metabòlics centrats en la regulació del metabolisme de *Pichia pastoris* creixent en barreges de metanol amb altres substrats.

4. 2. Estudi del creixement i producció de lipasa en cultius en *batch* de *Pichia pastoris* creixent sobre diferents fonts de carboni úniques

Com s'ha explicat en el punt 4.1 anterior, es disposa de diferents soques de *Pichia pastoris*, de les quals es va escollir la soca X33 (Mut⁺) per a la realització de l'estudi sobre el seu metabolisme. Una vegada feta la primera selecció de fonts de carboni d'interès amb el mètode basat amb la soca Mut⁻, el següent pas és l'estudi del creixement cel·lular i producció de lipasa de les soques Mut⁺ creixent en medi mínim en presència de les diferents fonts de carboni seleccionades.

4.2.1. Estudi del creixement de *Pichia pastoris* X-33 sobre els substrats seleccionats

L'estudi de l'efecte dels diferents substrats escollits sobre el creixement de les soques d'interès, es centrarà en la determinació de les velocitats específiques màximes de creixement i els rendiments biomassa/substrat amb cada una de les soques i substrats seleccionats.

Inicialment, els substrats seleccionats de treball seran la glicerina, la glucosa i el metanol, per als quals caldrà fer quatre cultius *batch* en bioreactor amb cada una de les dues soques, X33-ROL i X33/control. Els experiments ens mostraran les diferències entre velocitats màximes de creixement ($\mu_{\text{màx}}$) de la soca X-33-ROL quan s'està expressant la ROL (creixement sobre metanol) i quan no (creixement sobre glicerina o glucosa). També es realitzaran cultius-rèplica amb la soca control per a determinar si l'expressió de ROL suposa una càrrega metabòlica significativa o no per a l'organisme sota les condicions de cultiu seleccionades.

Cultius amb la soca X33-ROL

A la figura 4.2.1-1 es mostren les evolucions dels cultius *batch* en medi mínim de *Pichia pastoris* X33-ROL amb 10 g/l de glicerina, 10g/l de glucosa i 10g/l de metanol, com a úniques fonts de carboni.

A partir de les dades de l'evolució de la biomassa (pes sec en grams de biomassa/litre), es pot calcular la velocitat específica màxima de creixement tenint en compte que, tal com s'explica a l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes, per a l'etapa del creixement exponencial,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\text{màx}} \cdot t$$

Així doncs, a partir de la gràfica semilogarítmica de la biomassa front al temps, es pot realitzar la regressió lineal, el pendent de la qual serà $\mu_{\text{màx}}$.

A la figura 4.2.1-2 es pot observar la gràfica semilogarítmica de la biomassa front al temps per al cultiu de la soca X33-ROL amb glicerina com a única font de carboni. El pendent de la recta de regressió és 0.17 h^{-1} i, per tant, **la velocitat específica màxima de creixement de la soca X33-ROL sobre glicerina és aproximadament 0.17 h^{-1} .**

A la figura 4.2.1-2 es pot observar la gràfica semilogarítmica de la biomassa front al temps per al cultiu de la soca X33-ROL amb glucosa com a única font de carboni. El

pendent de la recta de regressió és 0.18 h^{-1} i, per tant, **la velocitat específica màxima de creixement de la soca X33-ROL sobre glucosa és aproximadament 0.18 h^{-1} .**

A la figura 4.2.1-2 es pot observar la gràfica semilogarítmica de la biomassa front al temps per al cultiu de la soca X33-ROL amb metanol com a única font de carboni. El pendent de la recta de regressió és 0.06 h^{-1} i, per tant, **la velocitat específica màxima de creixement de la soca X33-ROL sobre metanol és aproximadament 0.06 h^{-1} .**

Cultius amb la soca X33/control

A la figura 4.2.1-1 es mostra l'evolució del cultiu *batch* en medi mínim de *Pichia pastoris* X33/control amb 10 g/l de metanol com a única font de carboni.

A la figura 4.2.1-2 es pot observar la gràfica semilogarítmica de la biomassa front al temps per al cultiu de la soca X33/control amb metanol com a única font de carboni. El pendent de la recta de regressió és 0.073 h^{-1} i, per tant, **la velocitat específica màxima de creixement de la soca X33/control sobre metanol és aproximadament 0.073 h^{-1} .**

Com es pot observar, hi ha una petita diferència entre la velocitat específica de creixement màxima entre les soques X33/control i X33-ROL sobre metanol (menor en aquest últim cas). Malgrat que es pot considerar gairebé menyspreable, Serrano A. (2002) ha vist com l'expressió de múltiples còpies de ROL sí que tenen un clar efecte sobre la velocitat específica de creixement màxima, i per tant aquesta petita diferència podria ser significativa.

A la figura 4.2.1-3 es poden observar els cultius *batch* amb metanol per a l'estudi comparatiu de les soques de *Pichia pastoris* X33-ROL i X33/control.

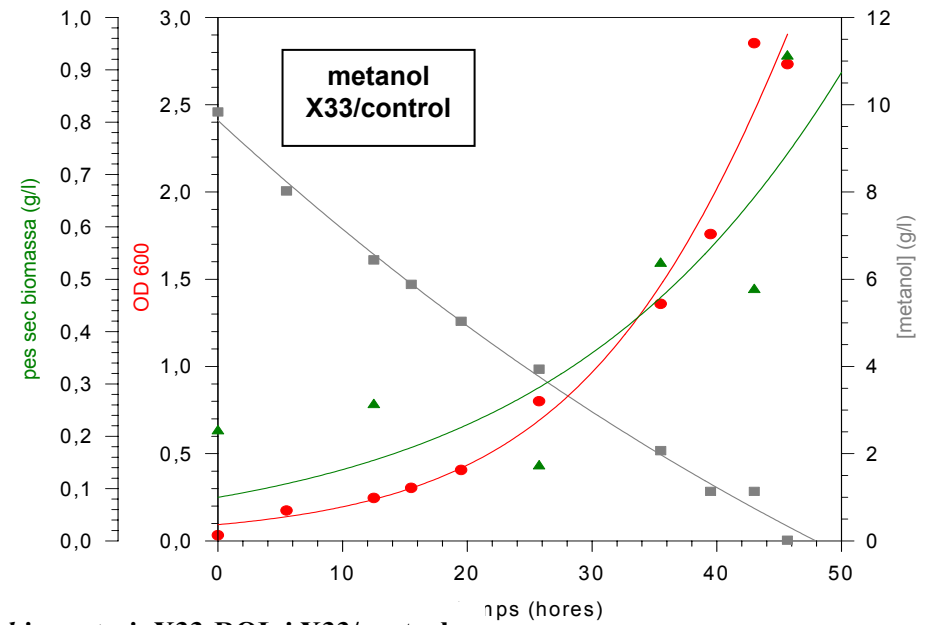
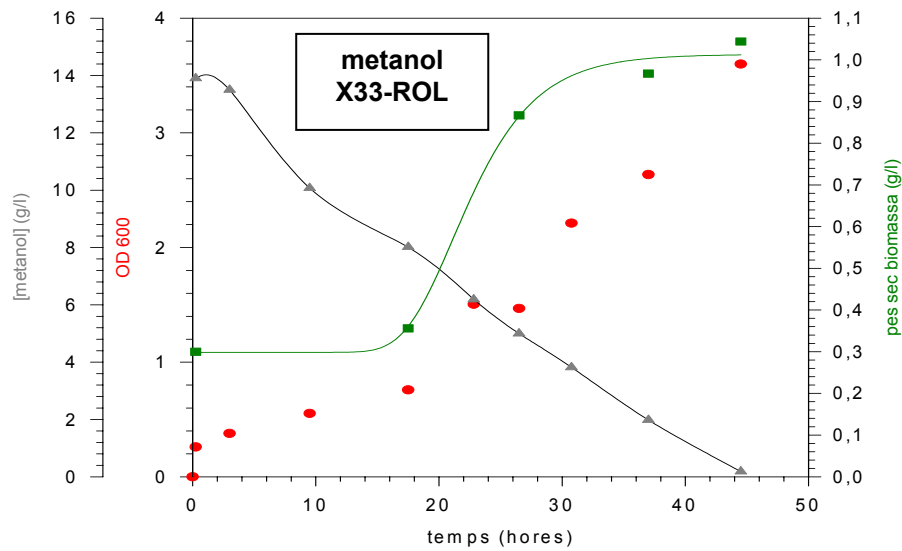
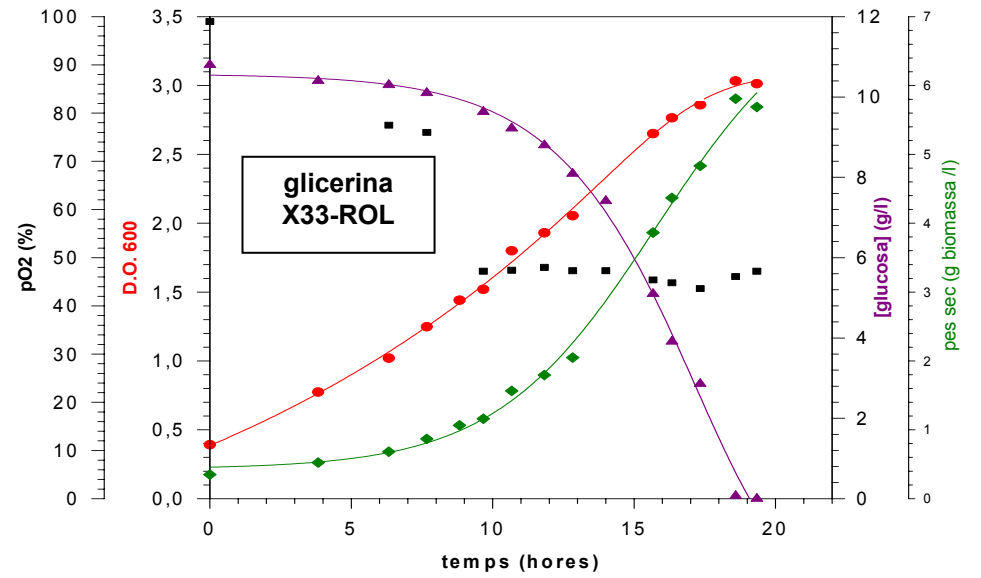
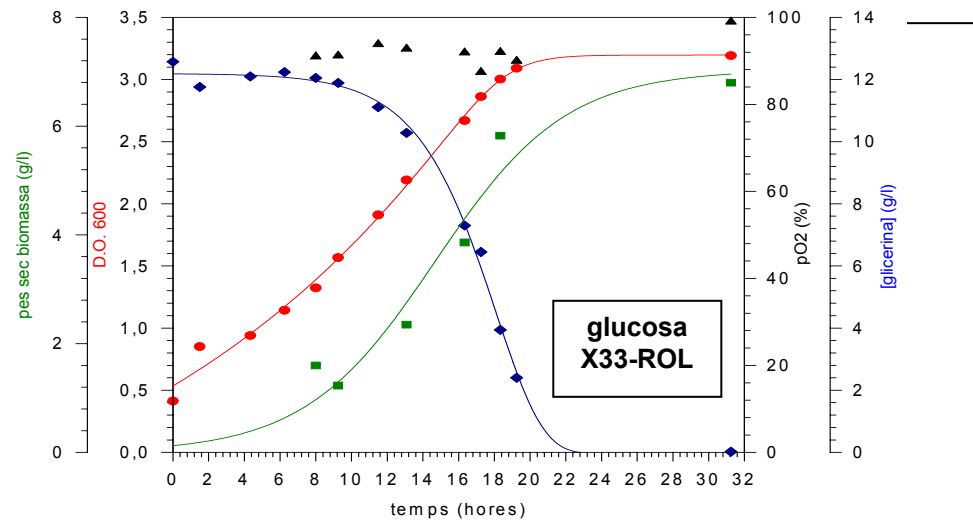


Figura 4.2.1-1: evolucions dels cultius *batch* en medi mínim de *Pichia pastoris* X33-ROL i X33/control

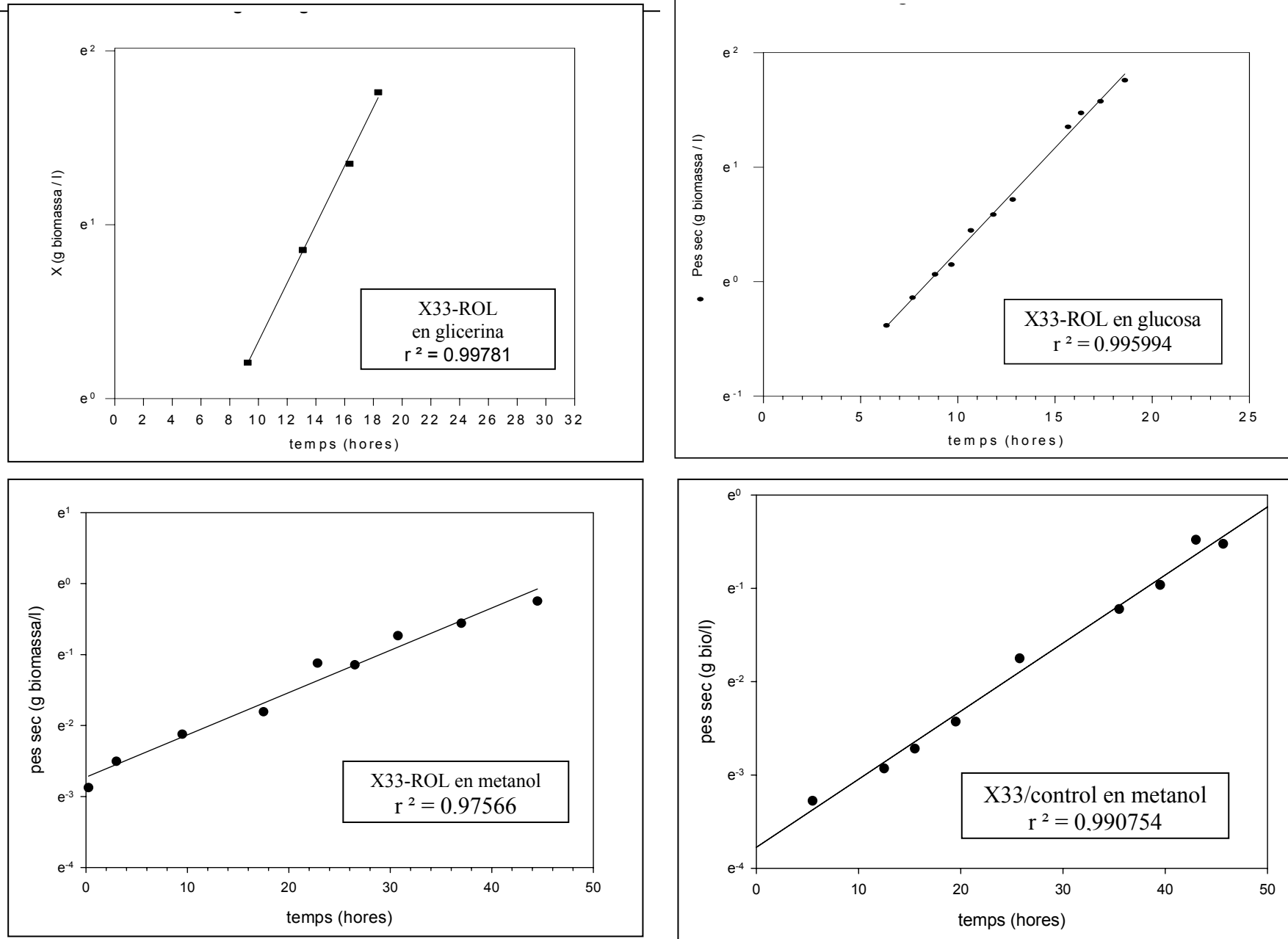


Figura 4.2.1-2: gràfics semilogarítmiques de la biomassa front al temps per als cultius de les soques X33-ROL i X33/control

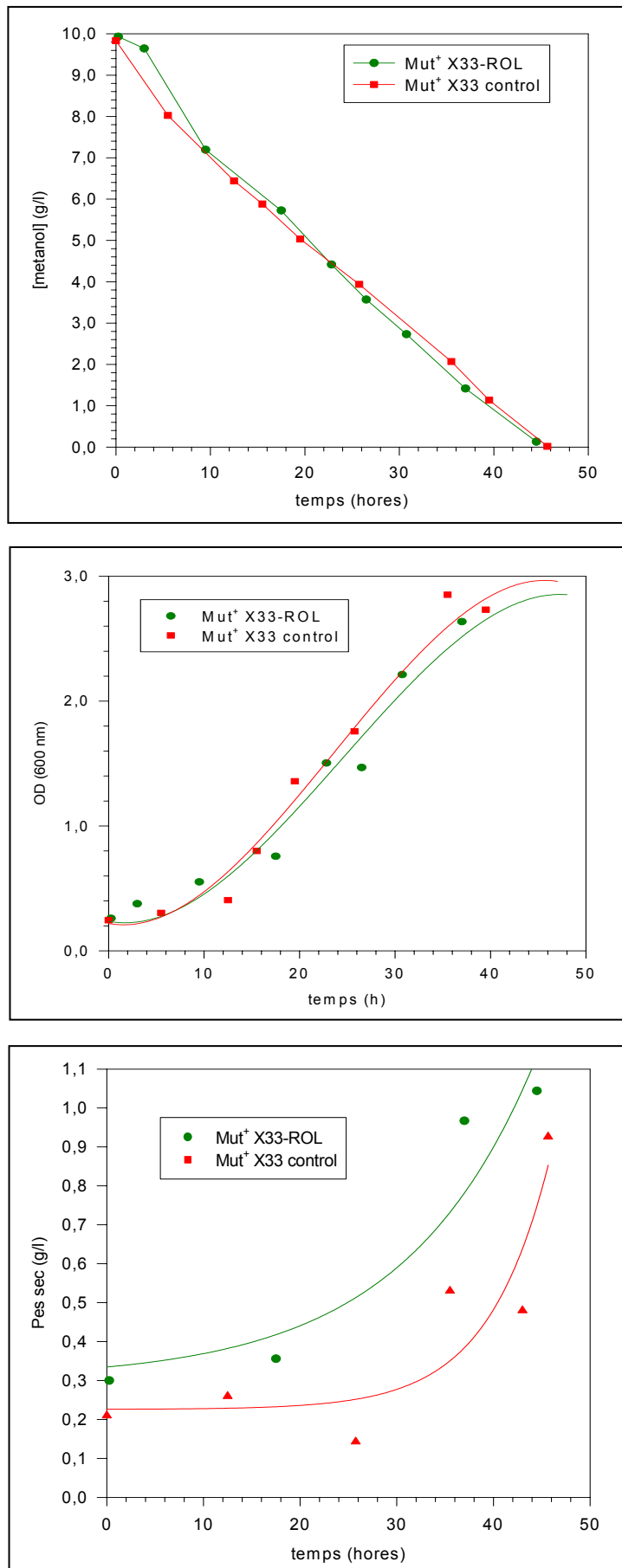


Figura 4.2.1-3: cultius *batch* amb metanol per a l'estudi comparatiu de les soques de *Pichia pastoris* X33-ROL i X33/control

A partir de la primera de les gràfiques de la figura 4.2.1-3, es pot calcular la velocitat de consum de metanol de cada una de les soques (a partir del càlcul del pendent de la gràfica de concentració de metanol vers temps). Pel que fa a la soca X33-ROL, la velocitat de consum de metanol és 0.23 g/(l·h), mentre que per a la soca X33/control, la velocitat de consum de metanol és 0.21 g/(l·h).

4.2.2. Càlcul dels rendiments de *Pichia pastoris* X-33 sobre els diferents substrats

El càlcul dels rendiments per a les diferents soques amb els diferents substrats s'ha dut a terme a partir dels valors experimentals inicials i finals de substrat i biomassa, segons el cas, tal i com s'explica a l'apartat 3.6 dels Materials i Mètodes.

La següent taula resumeix els càlculs realitzats en aquest apartat dels resultats:

		[substrat] ₀ (g/l)	Biomassa* (g/l)	Y _{s/x} (gX/gS)	μ (h ⁻¹)
Mut⁺ X33-ROL	GLUCOSA	10.8	5.70	0.53	0.180
	GLICERINA	10.5	6.80	0.55	0.168
	METANOL	10.0	1.05	0.08	0.060
Mut⁺ X33/control	METANOL	9.83	0.93	0.07	0.073

* Biomassa final

4.3 ESTUDI DEL METABOLISME CENTRAL DEL CARBONI DE *Pichia pastoris* AMB GLICERINA COM A ÚNICA FONT DE CARBONI

4.3.1. Cultius continus de *Pichia pastoris* X33-ROL creixent amb glicerina com a única font de carboni

Els cultius continus amb la soca X33-ROL (Mut⁺) es van dur a terme com ja s'ha especificat a l'apartat 3.2.2 dels Materials i Mètodes.

Els cultius es van realitzar a dues velocitats de dilució diferents, D (definida com cabal volumètric/volum de treball), és a dir, a dues velocitats específiques de creixement, de 0.05h⁻¹ i 0.16h⁻¹, respectivament. Això significa les velocitats d'alimentació van ser de 0.04 l/h i 0.128 l/h, respectivament.

La dilució 0.05h⁻¹ està lleugerament per sota de la velocitat específica màxima observada en un cultiu en *batch* de metanol de *Pichia pastoris* (0.06h⁻¹, resultats a l'apartat 4.2). La dilució 0.16h⁻¹, en canvi, està lleugerament per sota de la velocitat específica màxima de creixement observada en un cultiu en *batch* de glicerina de *Pichia pastoris* (0.017h⁻¹, resultats a l'apartat 4.2).

Resum de les dades del cultiu continu (D=0.05h⁻¹ i D=0.16h⁻¹)

Els detalls de la composició dels medis d'alimentació s'especifiquen a l'apartat 3.2.2 dels Materials i Mètodes. La concentració de glicerina al medi d'aliment va ser de 10g/l, i el percentatge de glicerina marcada durant l'últim temps de residència va ser del 12% (és a dir, 88% glicerina a abundància natural + 12% ¹³C₃-glicerina).

Els valors dels paràmetres més importants a l'estat estacionari són els següents:

Estat estacionari	Biomassa (g/l)	[glicerina]_{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
μ = 0.05 h⁻¹	5.6	0	0	CH _{1.83} N _{0.111} S _{0.002} O _{0.654} (7.61% cendres)
μ = 0.16 h⁻¹	3.6	3.75	0.006	CH _{1.76} N _{0.144} S _{0.002} O _{0.616} (9.01% cendres)

Es pot observar que el cultiu continu a baixa velocitat de dilució és limitant respecte la font de carboni. Cal afegir que no es va detectar ni etanol ni acètic en cap dels dos cultius continus. Així mateix, es va mesurar la concentració d'amoni al medi i es va poder comprovar que aquest no va ser limitant.

4.3.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats

Per a ambdós cultius a diferent velocitat de dilució, les cèl·lules biosintèticament marcades fraccionalment amb ¹³C (BDF ¹³C-marcades), es van centrifugar i després es van sotmetre a hidròlisi. Els aminoàcids de l'hidrolitzat es van analitzar emprant els experiments d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear 2D [¹³C,¹H]-COSY amb detecció al ¹H per obtenir, finalment, els corresponents valors dels fragmentòmers, *f* (tal i com s'explica a l'apartat 3.5 dels Materials i Mètodes).

La taula de dades que permeten al programa FCAL calcular el valor dels fragmentòmers a partir de les intensitats dels multiplets és la següent:

	P_n (%)	P_f (%)	F_m (%)	P_1 (%)
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	1.1	12.0	69.9	9.10
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	1.1	12.0	67.4	9.40

La definició exacta de cadascun d'aquests paràmetres es troba a l'apartat 6.1.1 de l'Apèndix, concretament, P_n és el grau de marcatge en ^{13}C a l'abundància natural, P_f és la fracció de font de carboni uniformement marcada amb ^{13}C relativa a la quantitat total de font de carboni introduïda en el medi mínim de cultiu, F_m representa la fracció de medi marcat (barreja de glicerina marcada i no marcada) respecte del volum total de medi dins del bioreactor en un moment determinat i, finalment, P_1 és el grau de marcatge total en ^{13}C .

Per al càlcul de P_1 s'ha utilitzat la fórmula següent, deduïda a l'apartat 6.1.1 de l'Apèndix (valors en tant per 1):

$$P_1 = (1-F_m) \cdot P_n + F_m \cdot P_f \cdot 1 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n$$

Els valors trobats dels fragmentòmers per a les diferents velocitats de dilució són els que es mostren a la següent taula (4.3.2-1):

Taula 4.3.2-1. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics.

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes							
	$\mu 0.05 \text{ h}^{-1}$				$\mu 0.16 \text{ h}^{-1}$			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.02	0.06	0	0.92	0.01	0.07	0	0.92
Ala- β	0.05	0.95	-	-	0.02	0.98	-	-
Arg- β	0.71	0.29	-	0	0.56	0.43	-	0.01
Arg- δ	0.08	0.92	-	-	0.10	0.90	-	-
Asp- α	0.26	0.09	0.42	0.23	0.14	0.04	0.18	0.64
Asp- β	0.26	0.23	0.42	0.09	0.14	0.65	0.17	0.04
Glu- α	0.24	0.21	0.45	0.10	0.15	0.32	0.39	0.14
Glu- β	0.68	0.32	-	0	0.50	0.50	-	0
Glu- γ	0	0	1	0	0	0	1	0
Gly- α	0.06	0.94	-	-	0.08	0.92	-	-
His- α	0.04	0	0	0.96	0.06	0	0	0.94
His- β	0.06	0.92	0.02	0	0.06	0.94	0	0
His- $\delta 2$	0.55	0.45	-	-	0.55	0.45	-	-
Ile- α	0.38	0	0.62	0	0.21	0	0.79	0
Ile- $\gamma 1$	0.46	0.51	-	0.03	0.76	0.21	-	0.03
Ile- $\gamma 2$	0.07	0.93	-	-	0.06	0.94	-	-
Ile- δ	0.52	0.48	-	-	0.79	0.21	-	-
Leu- α	0.06	0	0.94	0	0.05	0	0.95	0
Leu- β	0.93	0.02	-	0.05	0.95	0	-	0.05
Leu- $\delta 1$	0.07	0.93	-	-	0.07	0.93	-	-
Leu- $\delta 2$	0.99	0.01	-	-	1	0	-	-

Lys- α	0.03	0.07	0.87	0.03	0.03	0.1	0.81	0.06
Lys- β	0.76	0.24	-	0	0.56	0.42	-	0.02
Lys- γ	0.68	0.29	-	0.03	0.56	0.44	-	0
Lys- δ	0.05	0.95	-	0	0.07	0.93	-	0
Lys- ϵ	0.02	0.98	-	-	0.04	0.96	-	-
Met- α	0.23	0.13	0.39	0.25	0.12	0.08	0.22	0.58
Phe- α	0.04	0	0	0.96	0.03	0	0	0.97
Phe- β	0.03	0.97	0	0	0.03	0.97	0	0
Pro- α	0.29	0.15	0.42	0.14	0.27	0.29	0.27	0.17
Pro- β	0.72	0.28	-	0	0.57	0.43	-	0
Pro- γ	0.06	0.90	-	0.04	0.13	0.85	-	0.02
Pro- δ	0.15	0.85	-	-	0.15	0.85	-	-
Ser- α	0.01	0	0.42	0.57	0.03	0	0.40	0.57
Ser- β	0.46	0.54	-	-	0.45	0.55	-	-
Thr- α	0.27	0.09	0.40	0.24	0.13	0.05	0.17	0.65
Thr- β	0.24	0.66	-	0.10	0.12	0.84	-	0.04
Thr- γ 2	0.49	0.51	-	-	0.76	0.24	-	-
Tyr- α	0.06	0	0.01	0.93	0.06	0	0.01	0.93
Tyr- β	0.02	0.98	0	0	0.04	0.96	0	0
Tyr- δ_x	0.03	0.97	-	0	0.05	0.95	-	0
Tyr- ϵ_x	0.56	0	-	0.44	0.54	0	-	0.46
Val- α	0.04	0	0.96	0	0.05	0	0.95	0
Val- γ 1	0.04	0.96	-	-	0.04	0.96	-	-
Val- γ 2	0.96	0.04	-	-	0.99	0.01	-	-

Les taules ampliades amb les intensitats dels multiplets i els fragmentòmers anteriors corresponents a cada carboni es troben als apartats 6.5.1 i 6.5.2 de l'Apèndix. La mostra d'algunes de les seccions transversals preses al llarg de l'eix $\omega_1(^{13}\text{C})$ de l'espectre 2D es troben a l'apartat 6.6 de l'Apèndix.

4.3.3. Anàlisi METAFoR dels resultats

Com s'ha explicat a la Introducció, el mètode METAFoR va ser elaborat per a l'estudi de microorganismes procariotes (apartat 3.5 de Materials i Mètodes) (Szyperski T., 1995; Szyperski T. *et al.*, 1998; Sauer U. *et al.*, 1997; Hochuli M. *et al.*, 1999; Fiaux J. *et al.*, 1999; Sauer U. *et al.*, 1999). En el cas de *Saccharomyces cerevisiae* o de *Pichia pastoris* cal adaptar aquest formalisme al cas de les cèl·lules eucariotes, les quals tenen el metabolisme distribuït en diferents compartiments (figura 4.3.3-1 de la Introducció). Maaheimo H. *et al.* (2001) va realitzar aquesta adaptació per al cas de *Saccharomyces cerevisiae* creixent en glucosa en cultius *batch*.

Una de les suposicions més importants que s'haurà de fer és que la xarxa de reaccions bioquímiques actives es troba en un estat fisiològic quasi estacionari (vegeu l'apartat 3.5.1 dels Materials i Mètodes). A més, els fluxos metabòlics a través de les rutes de la glicòlisi i de la ruta de ruta de la pentosa fosfat, ambdues localitzades al citosol, podran tractar-se amb el mètode descrit per a les cèl·lules procariotes (Szyperski T., 1995; Sauer U. *et al.*, 1997; Hochuli M. *et al.*, 1999; Fiaux J. *et al.*, 1999; Sauer U. *et al.*, 1999; Szyperski T., 1998).

Com s'ha dit a la Introducció d'aquest treball, s'ha considerat que la xarxa metabòlica del llevat *Pichia pastoris* es correspon amb la definida per al llevat *Saccharomyces cerevisiae* (apartat 1.7 de la Introducció). Cal tenir en compte, però, que *Pichia pastoris* és un llevat no fermentatiu i que, a més, poden haver altres diferències bioquímiques (com la regulació d'algun enzim concret o l'existència de diferents isoenzims per una mateixa reacció), les quals es poden consultar en el recull sobre llevats no convencionals (Flores C.L. *et al.*, 2000; Zimmermann, F.K. & Entian, K.D., 1997).

Tot i que les rutes clau del metabolisme central de carboni segueix el mateix esquema en tots els llevats, existeixen importants variacions bioquímiques (Gancedo, C. & Serrano, R., 1989; Szyperski T., 1998). Durant el creixement aeròbic de *Saccharomyces cerevisiae*, per exemple, el catabolisme de la glucosa i dels sucres relacionats causen un important deteriorament en la capacitat respiratòria d'aquest llevat, mentre que en la majoria de llevats, altres que *Saccharomyces cerevisiae*, creixent en condicions aeròbiques, el piruvat és majoritàriament oxidat a CO₂ a través del cicle del TCA. A més, un coneixement comprensiu de la majoria dels elements i de la regulació de les rutes del metabolisme central de carboni en gèneres de llevats diferents de *Saccharomyces cerevisiae*, es troben encara a faltar.

La xarxa metabòlica que s'estudiarà, doncs, és la que s'ha descrit a l'apartat 1.7 de la introducció i que es representa esquemàticament a la figura 4.3.3-1.

Els valors dels fragmentòmers a partir dels quals es treuran les conclusions sobre el metabolisme es poden consultar a la taula 4.3.2-1.

Biosíntesi dels aminoàcids proteics en *Pichia pastoris* durant el creixement sobre glicerina

El primer que cal fer en aquest apartat és dur a terme la comprovació de les rutes de síntesi dels aminoàcids suposades *a priori* (a l'apartat 1.7 de la Introducció, Apèndix 6.8.4), és a dir aquelles descrites per al llevat model *Saccharomyces cerevisiae*. Així doncs, la comprovació de les hipòtesis sobre les rutes de síntesi dels aminoàcids es durà a terme a partir de les dades dels fragmentòmers que es troben a l'apartat anterior de resultats (taula 4.3.2-1).

Exceptuant la Lys i la Gly, els aminoàcids estan sintetitzats, en *Saccharomyces cerevisiae*, a partir dels mateixos precursors que en *Escherichia coli* (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1). Així doncs, es parteix de la hipòtesi segons la qual els aminoàcids proteics en *Pichia pastoris* estan sintetitzats d'acord amb les rutes biosintètiques conegudes per llevats (Jones, E.W. & Fink, G.R., 1982; Voet, D. & Voet, J.G., 1995; Michal, G., 1998).

Les figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1 resumeixen aquestes dades bioquímiques apuntades en aquest apartat i representen la procedència dels esquelets de carboni dels diferents aminoàcids proteics a partir dels intermedis del metabolisme central del carboni que serveixen com a precursors, per a la seva biosíntesi. Aquesta figura, doncs, també assigna l'estructura fina ¹³C observada per a un determinat carboni d'un determinat aminoàcid, al seu corresponent àtom de carboni en el seu precursor.

A partir de les rutes de biosíntesi considerades per als aminoàcids (figura 4.3.3-1 i Apèndix 6.8.4), es pot conèixer el valor d'alguns dels fragmentòmers i també es poden establir unes relacions entre els fragmentòmers dels diferents carbonis, és a dir, unes relacions entre els enllaços de carboni dels diferents aminoàcids. El programa FCAL realitza aquestes comprovacions de manera automàtica, però aquí es mostren explícitament per entendre què fa el programa i comprovar, efectivament, la correcció de les comprovacions.

De les rutes de síntesi de l'Ala, la Leu i la Val, així com de l'Ile (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1) es poden deduir les següents relacions entre fragmentòmers i els següents valors de fragmentòmers:

$$\begin{aligned} f^{(1)} \{Ile-\gamma 2\} &= f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Leu-\delta 1\} = f^{(1)} \{Val-\gamma 1\} \\ f^{(2)} \{Ile-\gamma 2\} &= f^{(2)} \{Ala-\beta\} = f^{(2)} \{Leu-\delta 1\} = f^{(2)} \{Val-\gamma 1\} \\ f^{(3)} \{Ile-\alpha\} &= f^{(2)} \{Ile-\alpha\} = 0 \\ f^{(3)} \{Ile-\gamma 1\} &= 0 \end{aligned}$$

No es pot afirmar res sobre els fragmentòmers $f^{(2)}$ i $f^{(2*)}$ ja que per a l'Ile- $\gamma 1$, $J_{\gamma 1\beta} \approx J_{\gamma 1\delta 1}$ a la resolució de l'espectre.

$$\begin{aligned} f^{(3)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2*)} \{Ala-\alpha\} &= f^{(2*)} \{Val-\alpha\} \quad \text{ja que } f^{(2)} \{Val-\alpha\} = 0 \\ f^{(1)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2)} \{Ala-\alpha\} &= f^{(1)} \{Val-\alpha\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} f^{(3)} \{Leu-\beta\} &= f^{(2)} \{Leu-\beta\} = f^{(2*)} \{Leu-\beta\} = 0 \quad \text{ja que } f^{(1)} \{Leu-\beta\} = 1 \\ f^{(3)} \{Leu-\alpha\} &= f^{(2)} \{Leu-\alpha\} = 0 \\ f^{(1)} \{Leu-\delta 2\} &= 1 \quad \text{i per tant } f^{(2)} \{Leu-\delta 2\} = 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} f^{(2)} \{Val-\gamma 2\} &= 0 \quad \text{i per tant } f^{(1)} \{Val-\gamma 2\} = 1 \\ f^{(3)} \{Val-\alpha\} &= f^{(2)} \{Val-\alpha\} = 0 \\ f^{(2)} \{Val-\gamma 2\} &= 0 \end{aligned}$$

De les rutes de síntesi de l'Asp, la Met, la Thr i l'Ile (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1) es poden deduir les següents relacions entre fragmentòmers i els següents valors de fragmentòmers:

$$\begin{aligned} f^{(i)} \{Asp-\alpha\} &= f^{(i)} \{Met-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\} \\ f^{(i)} \{Asp-\beta\} &= f^{(i)} \{Thr-\beta\} \quad (\text{ja que els carbonis } \beta, \gamma \text{ i } \delta \text{ de la metionina no s'analitzen}) \\ f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} &= f^{(2*)} \{Met-\alpha\} + f^{(3)} \{Met-\alpha\} = f^{(2*)} \{Thr-\alpha\} + f^{(3)} \{Thr-\alpha\} \\ &= f^{(2*)} \{Ile-\alpha\} \\ f^{(2*)} \{Asp-\beta\} + f^{(3)} \{Asp-\beta\} &= f^{(2)} \{Ile-\delta 1\} \quad (\text{ja que per a la Thr-}\beta \text{ no es pot diferenciar} \\ &\text{entre } f^{(2)} \text{ i } f^{(2*)} \text{ degut a la degeneració de les seves constants d'acoblament, } J_{\beta\gamma} \approx J_{\beta\alpha} \text{ a la} \\ &\text{resolució de l'espectre i el mateix ocorre per a l'Ile-}\gamma 1 \text{ per a la qual } J_{\gamma 1\beta} \approx J_{\gamma 1\delta 1} \text{ a la} \\ &\text{resolució de l'espectre}) \\ f^{(1)} \{Thr-\gamma\} &= f^{(1)} \{Ile-\delta 1\} \\ f^{(2)} \{Thr-\gamma\} &= f^{(2)} \{Ile-\delta 1\} \end{aligned}$$

De les rutes de síntesi de la Glu, la Pro, la Lys i l'Arg (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1) es poden deduir les següents relacions entre fragmentòmers i els següents valors de fragmentòmers:

$$\begin{aligned}
f^{(i)} \{Glu-\alpha\} &= f^{(i)} \{Arg-\alpha\} = f^{(i)} \{Pro-\alpha\} \\
f^{(i)} \{Glu-\beta\} &= f^{(i)} \{Pro-\beta\} = f^{(i)} \{Lys-\gamma\} \text{ (no es té en compte el carboni Arg-}\beta \text{ ja que no} \\
&\text{s'analitza perquè apareix solapat amb un altre senyal a l'espectre)} \\
f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} &= f^{(1)} \{Pro-\alpha\} + f^{(2*)} \{Pro-\alpha\} = f^{(1)} \{Lys-\beta\} \\
f^{(i)} \{Lys-\delta\} &= f^{(i)} \{Glu-\gamma\} \text{ tenint en compte que } f^{(2)} \{Lys-\delta\} = [f^{(2)} + f^{(2*)}] \{Glu-\gamma\} \\
f^{(3)} \{Lys-\beta\} &= f^{(3)} \{Lys-\alpha\} = 0 \\
f^{(2)} \{Lys-\alpha\} &= 0
\end{aligned}$$

De les rutes de síntesi de la Glu, la Pro, la Lys, l'Arg i l'Acetil CoA (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1), així com de l'Ala, la Leu i la Val (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1) es poden deduir les següents relacions entre fragmentòmers i els següents valors de fragmentòmers:

$$\begin{aligned}
f^{(i)} \{Glu-\gamma\} &= f^{(i)} \{Pro-\gamma\} = f^{(i)} \{Leu-\alpha\} \\
f^{(i)} \{Pro-\delta\} &= f^{(i)} \{Lys-\epsilon\} \\
f^{(1)} \{Leu-\alpha\} &= f^{(1)} \{Lys-\alpha\} \\
f^{(2*)} \{Leu-\alpha\} &= f^{(2*)} \{Lys-\alpha\}
\end{aligned}$$

De les rutes de síntesi de la Phe i la Tyr (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1) es poden deduir les següents relacions entre fragmentòmers i els següents valors de fragmentòmers:

$$\begin{aligned}
f^{(i)} \{Phe-\alpha\} &= f^{(i)} \{Tyr-\alpha\} \\
f^{(i)} \{Phe-\beta\} &= f^{(i)} \{Tyr-\beta\} \\
f^{(3)} \{Tyr-\beta\} &= f^{(3)} \{Phe-\beta\} = 0 \\
f^{(2*)} \{Tyr-\beta\} &= f^{(2*)} \{Phe-\beta\} = 0 \\
f^{(3)} \{Tyr-\delta_x\} &= 0
\end{aligned}$$

Comprovació dels valors de fragmentòmers coneguts *a priori*

Recollint de les deduccions anteriors el llistat de valors coneguts dels fragmentòmers, els valors dels fragmentòmers que cal comprovar són els següents:

$$\begin{aligned}
f^{(2)} \{Ile-\alpha\} &= f^{(3)} \{Ile-\alpha\} = 0 \\
f^{(3)} \{Ile-\gamma_1\} &= 0 \\
f^{(2)} \{Leu-\alpha\} &= f^{(3)} \{Leu-\alpha\} = 0 \\
f^{(1)} \{Leu-\beta\} &= 1 \text{ i per tant } f^{(2)} \{Leu-\beta\} = f^{(3)} \{Leu-\beta\} = 0 \\
f^{(1)} \{Leu-\delta_2\} &= 1 \text{ i per tant } f^{(2)} \{Leu-\delta_2\} = 0 \\
f^{(2)} \{Lys-\alpha\} &= f^{(3)} \{Lys-\alpha\} = 0 \\
f^{(3)} \{Lys-\beta\} &= 0 \\
f^{(2*)} \{Phe-\beta\} &= f^{(3)} \{Phe-\beta\} = 0 \\
f^{(2*)} \{Tyr-\beta\} &= f^{(3)} \{Tyr-\beta\} = 0 \\
f^{(3)} \{Tyr-\delta_x\} &= 0 \\
f^{(2)} \{Val-\alpha\} &= f^{(3)} \{Val-\alpha\} = 0 \\
f^{(2)} \{Val-\gamma_2\} &= 0 \text{ i per tant } f^{(1)} \{Val-\gamma_2\} = 1
\end{aligned}$$

Àtom de carboni	Continu 100% glicerina							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ile- α	0.38	0	0.62	0	0.21	0	0.79	0
Ile- γ 1	0.46	0.51	-	0.03	0.76	0.21	-	0.03
Leu- α	0.06	0	0.94	0	0.05	0	0.95	0
Leu- β	0.93	0.02	-	0.05	0.95	0	-	0.05
Leu- δ 2	0.99	0.01	-	-	1	0	-	-
Lys- α	0.03	0.07	0.87	0.03	0.03	0.10	0.81	0.06
Lys- β	0.76	0.24	-	0	0.56	0.42	-	0.02
Phe- β	0.03	0.97	0	0	0.03	0.97	0	0
Tyr- β	0.02	0.98	0	0	0.04	0.96	0	0
Tyr- δ_x	0.03	0.97	-	0	0.05	0.95	-	0
Val- α	0.04	0	0.96	0	0.05	0	0.95	0
Val- γ 2	0.96	0.04	-	-	0.99	0.01	-	-

Es pot observar que els valors dels fragmentòmers són correctes i les desviacions existents es poden considerar dins de l'error experimental del mètode. El carboni que potser presenta una desviació major del valor esperat és el de la Leu- β , i segurament és degut a problemes d'integració del senyal.

D'altra banda, en les dades per a Lys obtingudes en aquests cultius amb glicerina com a única font de carboni, s'observa que les $f^{(2)}$ {Lys- α } no són zero, cosa que no concorda amb la ruta de l' α -aminoàcid. Podria ser que hi hagués, doncs, una ruta alternativa de biosíntesi de la lisina, ja que s'ha observat en alguns llevats que existeix aquesta possibilitat, com s'ha vist, per exemple, també en l'arqueobacteri *Haloarcula hispanica* (Hochuli M. *et al.*, 1999). Malgrat tot, el comportament de *Pichia pastoris* creixent sobre glicerina, majoritàriament seria el mateix que l'observat en *Saccharomyces cerevisiae*. Cal tenir en compte, però, que aquest aminoàcid apareix solapat a l'espectre amb el senyal de l'Arg- α i presenta una integració difícil, i per tant, la conclusió sobre aquesta observació queda pendent per a futurs estudis sobre el metabolisme i les rutes de síntesi d'aminoàcids en el llevat *Pichia pastoris*. D'altra banda, aquest fenomen no s'observa en els cultius amb glucosa ni en els cultius amb barreja de glicerina i metanol, exceptuant el cultiu continu a baixa velocitat de dilució al 40% glicerina i 60% metanol.

Comprovació de les relacions entre fragmentòmers conegudes a priori

Recollint de les deduccions anteriors el llistat de relacions conegudes de fragmentòmers, les igualtats que cal comprovar són les següents:

$$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Val-\gamma 1\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma 2\} = f^{(1)} \{Leu-\delta 1\}$$

$$f^{(2)} \{Ala-\beta\} = f^{(2)} \{Val-\gamma 1\} = f^{(2)} \{Ile-\gamma 2\} = f^{(2)} \{Leu-\delta 1\}$$

Aquestes últimes igualtats no cal comprovar-les ja que són equivalents a les anteriors.

$$f^{(3)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2*)} \{Ala-\alpha\} = f^{(2*)} \{Val-\alpha\} \quad \text{ja que } f^{(2)} \{Val-\alpha\} = 0$$

$$f^{(1)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2)} \{Ala-\alpha\} = f^{(1)} \{Val-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Met-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Asp-\beta\} = f^{(i)} \{Thr-\beta\}$$

$$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Thr-\alpha\} + f^{(3)} \{Thr-\alpha\}$$

$$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Met-\alpha\} + f^{(3)} \{Met-\alpha\}$$

$$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Ile-\alpha\}$$

$$f^{(2*)} \{Asp-\beta\} + f^{(3)} \{Asp-\beta\} = f^{(2)} \{Ile-\delta 1\}$$

$$f^{(i)} \{Glu-\alpha\} = f^{(i)} \{Pro-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Glu-\beta\} = f^{(i)} \{Pro-\beta\}$$

$$f^{(i)} \{Glu-\gamma\} = f^{(i)} \{Pro-\gamma\} = f^{(i)} \{Leu-\alpha\}$$

$$f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} = f^{(1)} \{Pro-\alpha\} + f^{(2*)} \{Pro-\alpha\}$$

$$f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} = f^{(1)} \{Lys-\beta\}$$

$$f^{(i)} \{Glu-\beta\} = f^{(i)} \{Lys-\gamma\}$$

$$f^{(i)} \{Lys-\delta\} = f^{(i)} \{Glu-\gamma\} \text{ tenint en compte que } f^{(2)} \{Lys-\delta\} = [f^{(2)} + f^{(2*)}] \{Glu-\gamma\}$$

$$f^{(1)} \{Leu-\alpha\} = f^{(1)} \{Lys-\alpha\}$$

$$f^{(2*)} \{Leu-\alpha\} = f^{(2*)} \{Lys-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Phe-\alpha\} = f^{(i)} \{Tyr-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Phe-\beta\} = f^{(i)} \{Tyr-\beta\}$$

$$f^{(i)} \{Pro-\delta\} = f^{(i)} \{Lys-\epsilon\}$$

$$f^{(1)} \{Thr-\gamma\} = f^{(1)} \{Ile-\delta 1\}$$

$$f^{(2)} \{Thr-\gamma\} = f^{(2)} \{Ile-\delta 1\}$$

No es té en compte el carboni Arg-β, ja que no s'analitza perquè apareix solapat amb un altre senyal a l'espectre.

Cultiu continu 100% glicerina						
IGUALTAT	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$			$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		
	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Val-\gamma 1\}$	0.05	0.04	1	0.02	0.04	2
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Leu-\delta 1\}$	0.05	0.07	2	0.02	0.07	5
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma 2\}$	0.05	0.07	2	0.02	0.06	4
$f^{(1)} \{Val-\gamma 1\} = f^{(1)} \{Leu-\delta 1\}$	0.04	0.07	3	0.04	0.07	3
$f^{(1)} \{Val-\gamma 1\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma 2\}$	0.04	0.07	3	0.04	0.06	2
$f^{(1)} \{Leu-\delta 1\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma 2\}$	0.07	0.07	0	0.07	0.06	1
$f^{(3)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2*)} \{Ala-\alpha\} = f^{(2*)} \{Val-\alpha\}$	0.92+0 = 0.92	0.96	4	0.92+0 = 0.92	0.95	3
$f^{(1)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2)} \{Ala-\alpha\} = f^{(1)} \{Val-\alpha\}$	0.02+0.06 = 0.08	0.04	4	0.01+0.07 = 0.08	0.05	3
$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Met-\alpha\}$	0.26	0.23	3	0.14	0.12	2
	0.09	0.13	4	0.04	0.08	4
	0.42	0.39	3	0.18	0.22	4
	0.23	0.25	2	0.64	0.58	6
$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\}$	0.26	0.27	3	0.14	0.13	1
	0.09	0.09	0	0.04	0.05	1
	0.42	0.40	2	0.18	0.17	1
	0.23	0.24	1	0.64	0.65	1

$f^{(i)}\{\text{Met-}\alpha\} = f^{(2)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.23 0.13 0.39 0.25	0.27 0.09 0.40 0.24	4 4 1 1	0.12 0.08 0.22 0.58	0.13 0.05 0.17 0.65	1 3 5 7
$f^{(1)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.26	0.24	2	0.14	0.12	2
$f^{(2)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.23+0.42 = 0.65	0.66	1	0.65+0.17 = 0.82	0.84	2
$f^{(3)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(3)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.09	0.10	1	0.04	0.04	0
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Thr-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.42+0.23 = 0.65	0.40+0.24 = 0.64	1	0.18+0.64 = 0.82	0.17+0.65 = 0.82	0
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Met-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Met-}\alpha\}$	0.42+0.23 = 0.65	0.39+0.25 = 0.64	1	0.18+0.64 = 0.82	0.22+0.58 = 0.80	2
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Ile-}\alpha\}$	0.42+0.23 = 0.65	0.62	3	0.18+0.64 = 0.82	0.79	3
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Ile-}\delta 1\}$	0.42+0.09 = 0.51	0.48	3	0.17+0.04 = 0.21	0.21	0
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.24 0.21 0.45 0.10	0.29 0.15 0.42 0.14	5 6 3 4	0.15 0.32 0.39 0.14	0.27 0.29 0.27 0.17	12 3 12 3
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\beta\}$	0.68 0.32 0	0.72 0.28 0	4 4 0	0.50 0.50 0	0.57 0.43 0	7 7 0
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Lys-}\gamma\}$	0.68 0.32 0	0.68 0.29 0.03	0 3 3	0.50 0.50 0	0.56 0.44 0	6 6 0
$f^{(1)}\{\text{Lys-}\delta\} = f^{(1)}\{\text{Glu-}\gamma\}$	0.05	0	5	0.07	0	7
$f^{(2)}\{\text{Lys-}\delta\} = f^{(2)}\{\text{Glu-}\gamma\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\gamma\}$	0.95	0+1=1	5	0.93	0+1=1	7
$f^{(3)}\{\text{Lys-}\delta\} = f^{(3)}\{\text{Glu-}\gamma\}$	0	0	0	0	0	0
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(i)}\{\text{Leu-}\alpha\}$	0 0 1 0	0.06 0 0.94 0	6 0 6 0	0 0 1 0	0.05 0 0.95 0	5 0 5 0
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0	0.06	6	0	0.13	13
$f^{(2)}\{\text{Glu-}\gamma\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(2)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0+1 = 1	0.90	10	0+1 = 1	0.85	15
$f^{(3)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(3)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0	0.04	4	0	0.02	2
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.24+0.45 = 0.69	0.29+0.42 = 0.71	2	0.15+0.39 = 0.54	0.27+0.27 = 0.54	0
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\beta\}$	0.24+0.45 = 0.69	0.76	7	0.15+0.39 = 0.54	0.56	2
$f^{(1)}\{\text{Leu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\alpha\}$	0.06	0.03	3	0.05	0.03	2
$f^{(2*)}\{\text{Leu-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Lys-}\alpha\}$	0.94	0.87	7	0.95	0.81	14
$f^{(i)}\{\text{Phe-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Tyr-}\alpha\}$	0.04 0 0 0.96	0.06 0 0.01 0.93	2 0 1 3	0.03 0 0 0.97	0.06 0 0.01 0.93	3 0 1 4
$f^{(i)}\{\text{Phe-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Tyr-}\beta\}$	0.03 0.97 0 0	0.02 0.98 0 0	1 1 0 0	0.03 0.97 0 0	0.04 0.96 0 0	1 1 0 0
$f^{(i)}\{\text{Pro-}\delta\} = f^{(i)}\{\text{Lys-}\epsilon\}$	0.15 0.85	0.09 0.91	6 6	0.15 0.85	0.11 0.89	4 4

$f^{(1)} \{Thr-\gamma\} = f^{(1)} \{Ile-\delta_1\}$	0.49	0.52	3	0.76	0.79	3
$f^{(2)} \{Thr-\gamma\} = f^{(2)} \{Ile-\delta_1\}$	0.51	0.48	3	0.24	0.21	3

El càlcul de l'error s'ha dut a terme de la següent manera:

$$\% \text{ error} = 100 \cdot |(1^{\text{er}} \text{ terme} - 2^{\text{on}} \text{ terme}) / 1|$$

Si es considera que el màxim error acceptable està al voltant del 10% (criteri arbitrari) es pot observar que els valors trobats amb aquest mètode són correctes. Només s'observen cinc igualtats que superarien l'error acceptable. Cal tenir en compte, però, que una d'elles correspon a la Lys- α , la qual, com s'ha explicat, presenta dificultats d'integració. D'altra banda, les altres igualtats dubtoses afecten als aminoàcids Glu i Pro. En aquest cas, s'han escollit els valors del Glu per a realitzar els càlculs dels següents apartats de resultats, ja que els seus senyals presentaven unes integracions més senzilles.

Estudi més detallat d'alguns trets característics de les rutes de biosíntesi dels aminoàcids en llevats

La comprovació de les igualtats anteriors demostren que es compleix la hipòtesi realitzada sobre la validesa de les rutes de síntesi dels aminoàcids en *Saccharomyces cerevisiae* per al llevat *Pichia pastoris*. Donat, però, que les rutes de síntesi en llevats presenten algunes característiques pròpies i diferenciades en comparació amb les cèl·lules procariotes, resulta interessant analitzar aquestes amb més detall. Així, com s'ha dit anteriorment, les rutes de síntesi de la Lys i la Gly, en *Saccharomyces cerevisiae* es diferencien de les d'*Escherichia coli* i, a més, aquesta última es pot sintetitzar a partir de quatre rutes diferents, cosa també important d'analitzar.

A més, la informació proporcionada pels fragmentòmers permet, també, l'estudi en detall de la ruta de síntesi de la Ser, la qual es sintetiza a partir del 3PG però que també pot provenir de la Gly, per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT).

La Ser es sintetiza a partir del 3-fosfoglicerat (3PG), el qual prové de la glicerina. Gairebé totes les molècules de 3PG tenen els enllaços de carboni conservats, és a dir, que cada una d'elles prové d'una sola molècula font de glicerina, com es pot observar a partir del patró de fragmentòmers del fosfoenolpiruvat (PEP) (observable a partir dels carbonis alifàtics de la Phe i la Tyr, vegeu l'apartat de la glicòlisi més endavant). Tot i així, ens trobem que la fracció de fragments intactes $C_{\beta}-C_{\alpha}-C'$ (és a dir, $f^{(3)} \{Ser-\alpha\}$) és 0.57 per a tots dos cultius. Així doncs, només el 57% de les molècules de Ser provenen d'una única molècula de glicerina, és a dir, que tenen els dos enllaços de carboni conservats. Aquest fet indica que la reacció des del 3PG fins a la Ser no és reversible ja que la reversibilitat d'aquesta reacció no és compatible amb els patrons de marcatge obtinguts per al 3PG i el PEP, els quals seran equivalents ja que estan units per una cadena de reaccions reversibles.

Per una altra banda, els trencaments observats en les molècules de Ser indiquen que una fracció d'aquestes molècules de Ser es sintetitzen a partir de la Gly per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). La diferència entre les fraccions

d'enllaços C_{β} - C_{α} trencats en la Ser i la Phe (és a dir, $f^{(1)}\{\text{Ser-}\beta\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\beta\}$) és 0.43 i 0.42 en els cultius a baixa i alta velocitat de dilució, respectivament. Això indica que un 43% i un 42% de les molècules de Ser són trencades reversiblement a través de la via de la SHMT per convertir-se en Gly i una unitat C_1 .

Pel que fa a la Lys, es pot confirmar que la síntesi de la Lys es deriva majoritàriament de la ruta de l' α -aminoadipat. En aquesta, el 2-oxoglutarat (OxGlu) i el mt-AcCoA generen homocitrat (mitjançant l'homocitrat sintasa, mitocondrial) a partir del qual es genera oxaloglutarat, el qual dóna lloc a l' α -aminoadipat, precursor de la Lys; aquest darrer compost surt de la mitocondria i la resta fins a lisina té lloc al citosol (apartat 6.8.4 de l'Apèndix).

Es pot comprovar si aquesta ruta de l' α -aminoadipat està activa a partir de l'observació dels patrons de marcatge de la Lys i del Glu, en les igualtats següents (ja comprovades a les taules anteriors):

$$\begin{aligned} f^{(i)}\{\text{Lys-}\delta\} &\approx f^{(i)}\{\text{Glu-}\gamma\} \quad \text{tenint en compte que } f^{(2)}\{\text{Lys-}\delta\} = [f^{(2)} + f^{(2*)}]\{\text{Glu-}\gamma\} \\ f^{(i)}\{\text{Lys-}\gamma\} &\approx f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} \\ f^{(2)}\{\text{Lys-}\alpha\} &\approx 0 \\ f^{(3)}\{\text{Lys-}\alpha\} &\approx 0 \end{aligned}$$

Aquestes observacions demostren que el patró de marcatge per a aquesta zona de la molècula de la Lys equival majoritàriament a la zona corresponent de la molècula de Glu, és a dir, que l'origen de l'esquelet de carboni és el mateix. Tot i així, com s'ha dit anteriorment, queda pendent de comprovar si les desviacions existents, sobretot pel que fa a l'última d'aquestes tres igualtats, són degudes a una possible ruta alternativa de síntesi de la Lys o bé a una integració no del tot correcta de la senyal de la Lys- α , donat que apareix solapada amb la senyal de l'Arg- α .

Pel que fa a la Gly, els llevats poden usar quatre vies de biosíntesi per generar aquest aminoàcid. Les dues primeres corresponen al trencament de la Thr per la via de la threonina aldolasa (Apèndix 6.8.4) i al trencament de la Ser per la via de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). Aquestes dues rutes són les que es presenten a la figura 3.5.3-1. És difícil elucidar quina és la contribució relativa d'aquestes dues possibles rutes, però es pot calcular quina és la fracció mínima de Gly que prové de la Ser de la següent manera:

La fracció d'enllaços C_{α} - C' intactes de la Gly (corresponents als valors de $f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\}$) és 0.94 i 0.92 per al cultiu a baixa i alta velocitat de dilució, respectivament. Aquests enllaços intactes només poden provenir d'aquestes dues primeres rutes de síntesi de la Gly, ja que les altres dues (vegeu més endavant) generen enllaços C_{α} - C' de la Gly trencats. Així, aquestes molècules de Gly que conserven els enllaços C_{α} - C' intactes, segur que provenen, o bé de la Ser, o bé de la Thr.

La fracció d'enllaços C_{α} - C' intactes per a la Ser (corresponent al valor de $[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Ser-}\alpha\}$) és 0.99 i 0.97 per als cultius a baixa i alta velocitat de dilució (D), respectivament. Aquests carbonis de la Ser es corresponen amb els carbonis C_{α} - C' de la Gly. D'altra banda, la fracció d'enllaços C_{α} - C' intactes per a la Thr (corresponent al valor de $[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}$) per als cultius a baixa i alta D és 0.64 i 0.82, respectivament

(taula 4.3.2-1). Aquests carbonis de la Thr es corresponen amb els carbonis C_{α} - C' de la Gly.

Si es comparen aquests últims valors per a la Thr amb els de la Gly, es pot comprovar que si únicament estigués activa la ruta de la threonina aldolasa, aquesta no seria suficient per generar prou enllaços C_{α} - C' intactes en la Gly. No es pot assegurar, doncs, que aquesta ruta de síntesi estigui activa, però sí que es pot afirmar, en canvi, que ho està la ruta de la SHMT (ja que $[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Ser-}\alpha\} > f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\}$ en ambdós cultius continus). Aquesta observació està d'acord amb experiments recents de marcatge ^{13}C amb *Saccharomyces cerevisiae* creixent sobre glucosa en cultius en *batch*, on s'ha vist que la threonina aldolasa només contribueix en 1/3 de la biosíntesi de la Gly, essent la SHMT la ruta principal de síntesi de Gly en aquestes cèl·lules (Woldman Y. & Appling D.R., 2002). Es pot calcular la fracció mínima de molècules de la Gly que provenen de la Ser considerant quina és la fracció d'enllaços C_{α} - C' intactes en la Gly que és major que la fracció d'enllaços C_{α} - C' intactes en la Thr (és a dir $f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\} - [f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}$). D'aquesta manera es pot afirmar que part de la Gly, com a mínim un 30% en el cultiu a baixa D, i un 10%, en el cultiu a elevada D, està originada a partir de la Ser.

La Ser constitueix un donador d'unitats C_1 quan es divideix reversiblement fins a Gly i una unitat C_1 per la serina hidroximetil transferasa (SHMT), de la qual existeixen isoenzims de la SHMT mitocondrials i citosòlics (McNeil J.B. *et al.*, 1994; McNeil J.B. *et al.*, 1996).

Al contrari que en la ruta de la SHMT, la reacció de trencament de la Thr per la via de la threonina aldolasa, en el cas que estigués present, semblaria irreversible en els dos cultius, tant a D baixa com alta, ja que els patrons de marcatge de la Thr i l'Asp són gairebé idèntics (en tots dos cultius amb glicerina) i el patró de l'Asp no pot provenir de la Thr perquè la síntesi de la Thr a partir de l'Asp és irreversible (Jones, E.W. & Fink, G.R., 1982; Michal, G., 1998).

La Gly també es pot sintetitzar a partir d'una unitat C_1 i CO_2 per la via mitocondrial de la GCV (*Glycine Cleavage*). Aquesta reacció genera un augment relatiu en la fracció d'enllaços tallats C_{α} - C' en la Gly (és a dir, valors de $f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\}$ majors) donat que la mt-Gly és transportada al citosol on la major part de la proteïna cel·lular és generada (Maaheimo, H. *et al.*, 2001). Donat que la diferència entre la fracció d'enllaços C_{α} - C' trencats en la Gly i els corresponents enllaços de la Phe (és a dir, $f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\alpha\}$) és virtualment zero tant per al cultiu a baixa (2%) com alta (5%) velocitat de dilució, es pot suposar que el flux de la mt-Gly cap al *pool* citosòlic és negligible o que l'activitat inversa de la GCV és baixa.

A més, la mt-Gly juntament amb una unitat mt- C_1 , derivada de la mt-Gly per la via mitocondrial de la GCV, podria emprar-se per sintetitzar mt-Ser per la via mitocondrial de la SHMT (aquesta activitat requereix l'acció de la ruta mitocondrial de la GCV per produir C_1 ja que aquest C_1 no pot penetrar la membrana mitocondrial (Woldman, Y. & Appling, D.R., 2002)). Aquesta reacció generaria un augment relatiu en la fracció de molècules de Ser amb tots els enllaços C_{β} - C_{α} - C' trencats ($f^{(1)}\{\text{Ser-}\alpha\}$), donat que la mt-Ser és transportada al citosol on la major part de la proteïna cel·lular és generada. Però els valors de $f^{(1)}\{\text{Ser-}\alpha\}$, els quals són 0.01 i 0.03 per a baixa i alta D, respectivament, indiquen que aquest no és el cas.

L'exportació de mt-Gly (amb els enllaços C_{α} -C' tallats) i la síntesi subsegüent de la Ser per la via de la SHMT citosòlica resultaria en el mateix patró de marcatge, és a dir, molècules de Ser amb tots els enllaços C_{β} - C_{α} -C' trencats, però els valors de $f^{(1)}\{\text{Ser-}\alpha\}$ són pràcticament zero i per tant aquesta possibilitat tampoc existeix.

Així doncs, considerant que no hi ha sortida de mt-Gly (amb els enllaços C_{α} -C' tallats) al citosol ni tampoc mt-Ser al citosol, es dedueix que el 43% i el 42% de les molècules de Ser que són trencades reversiblement a través de la via de la SHMT per convertir-se en Gly i una unitat C_1 (a baixa i alta D, respectivament) provenen únicament de l'activitat citosòlica de la SHMT. Es pot concloure, doncs, que la via mitocondrial de la SHMT no està activa en cap dels dos cultius continus.

Finalment, els llevats poden sintetitzar també la Gly a partir dels intermedis del cicle TCA a través de la via de l'isocitrat liasa i de l'alanina glioxilat aminotransferasa, on el glioxilat es produeix a partir de l'isocitrat i és transaminat per donar Gly (Takada, Y., & Noguchi, T., 1985). Tot i que el patró de marcatge del glioxilat derivat del cyt-OAA es pot observar (a través dels patrons de marcatge de l'Asp), l'estratègia de marcatge emprada en aquest estudi no permet definir la possible contribució d'aquesta ruta a la síntesi de la Gly. No obstant, les dades obtingudes suggereixen que la ruta del glioxilat és molt baixa (veure més endavant) i per tant aquesta ruta de síntesi de la Gly probablement té molt poca importància.

Resulta interessant observar que, en tots dos cultius continus amb glicerina, el valor de $[f^{(1)}+f^{(2)}]\{\text{Ala-}\alpha\}$ (corresponent als enllaços C_{α} -C' del mt-Pyr tallat) és significativament més gran que $f^{(1)}\{\text{Val-}\alpha\}$, així com que els valors dels fragmentòmers $f^{(2)}\{\text{Ile-}\gamma 2\}$ i $f^{(2)}\{\text{Leu-}\delta 1\}$ són significativament més baixos que els observats per a $f^{(2)}\{\text{Val-}\gamma 1\}$, $f^{(2)}\{\text{Ala-}\beta\}$ i $f^{(3)}\{\text{Ala-}\alpha\}+f^{(2)}\{\text{Ala-}\alpha\}$, tot i que tots aquests aminoàcids es derivin del Pyr. Aquestes observacions podrien indicar que hi ha altres possibles rutes de síntesi per a la Leu, l'Ile i la Val o bé *pools* separats de Pyr dins de la mitocondria, malgrat que la diferència podria caure dins l'error experimental, sobretot pel que fa al cultiu a baixa D.

Es pot concloure, doncs, que per als casos de la Ser i la Gly, les dades dels fragmentòmers obtingudes en l'apartat 4.3.2 dels Resultats permeten comprovar la validesa de les hipòtesis suposades pel que fa a les rutes de síntesi dels aminoàcids. Pel que fa a la Lys, les comprovacions realitzades fins ara semblen comprovar la ruta suposada de síntesi, però, com s'ha explicat i també es veurà més endavant, hi ha la possibilitat que una petita fracció d'aquest aminoàcid es sintetitzi a través d'alguna altra ruta.

Per a la resta d'aminoàcids, s'ha comprovat la validesa de les rutes de biosíntesi suposades a partir de la comprovació dels valors de fragmentòmers i les relacions entre aquests que s'han mostrat anteriorment.

Metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* durant el creixement sobre glicerina en cultius continus

Fins ara, l'ús de la tècnica METAFoR per a l'estudi del metabolisme central del carboni en llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) s'havia dut a terme amb glucosa uniformement marcada amb ^{13}C (Maaheimo, H. *et al.*, 2001; Fiaux, J. *et al.*, 2003). En el present treball, l'estudi s'ha dut a terme emprant glicerina com a única font de carboni, és a dir, una font de carboni C3, per a l'estudi dels aminoàcids proteics BDF-marcats amb ^{13}C , el que permet determinar els quocients de fluxos entre la major part dels intermedis clau del metabolisme central del carboni. Aquest canvi, però, suposa alguna limitació en comparació amb els treballs anteriors, especialment pel que fa a la quantificació dels quocients de fluxos que estan relacionats directament amb la ruta de la pentosa fosfat (PPP) i la glicòlisi. Això és degut al fet que la glicerina marcada a través de la gluconeogènesi i la branca oxidativa de la PPP no produeix patrons de marcatge suficientment diferents als generats quan la glicerina es canalitza a través de la branca no oxidativa de la PPP, tal i com s'explicarà més endavant.

Glicòlisi (de GAP/DHAP a Pyr)

Les cèl·lules estan creixent sobre glicerina. Aquesta s'incorpora a la glicòlisi a nivell del GAP i de la DHAP, els quals acaben generant PEP i d'aquest, piruvat (Gancedo, C. *et al.*, 1968; Michal, G., 1998). Les reaccions des de la glicerina fins al PEP són potencialment reversibles, mentre que la formació de piruvat a partir del PEP és una reacció irreversible. Degut a això, només els metabòlits que es troben en les reaccions entre la glicerina i el PEP es pot esperar *a priori* que tinguin el mateix patró de marcatge.

L'observació del patró de marcatge del PEP es pot realitzar a través dels carbonis alifàtics dels aminoàcids Phe i Tyr, els quals es sintetitzen a través de la ruta del corismat (apartat 1.7.8 de la Introducció i figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1).

Els valors de $f^{(3)}\{\text{Phe-}\alpha\} > 0.9$ i $f^{(3)}\{\text{Tyr-}\alpha\} > 0.9$ (taula 4.3.2-1), en ambdós cultius continus, mostren que la majoria de les molècules de PEP provenen d'una sola molècula font de glicerina.

Aquest fet es pot comprovar amb els valors f dels carbonis Phe- β i Tyr- β . Si es té en compte que $f^{(2)}\{\text{Phe-}\alpha\} = 0$ i $f^{(2)}\{\text{Tyr-}\alpha\} = 0$ per als dos cultius continus, els valors $f^{(2)}\{\text{Phe-}\beta\} > 0.9$ i $f^{(2)}\{\text{Tyr-}\beta\} > 0.9$ per ambdós cultius corresponen a $f^{(3)}\{\text{Phe-}\alpha\}$ i $f^{(3)}\{\text{Tyr-}\alpha\}$. Degut a què els patrons de marcatge dels carbonis C₁-C₂-C₃ en el 3PG no es veurien alterats per la interconversió reversible de la F6P i l'E4P fins a 3PG i S7P (reaccions de la transquetolasa i la transaldolasa), no es pot determinar la contribució dels intermedis de la ruta PPP en la generació del PEP.

És interessant mencionar que els valors de $f^{(3)}\{\text{Phe-}\alpha\}$ (0.96/0.97, per al cultiu a baixa i alta velocitat de dilució, respectivament) són lleugerament superiors als corresponents valors per a la Tyr ($f^{(3)}\{\text{Tyr-}\alpha\} = 0.93/0.93$). Això podria suggerir una ruta alternativa de biosíntesi que competís per algun d'ells.

A partir del PEP es genera cyt-Pyr, per l'acció de la piruvat quinasa i és l'última reacció de la ruta glicolítica del catabolisme dels sucres. El patró de marcatge del cyt-Pyr no es

pot observar, ja que els aminoàcids que es deriven del mt-Pyr. Així, el patró de marcatge del mt-Pyr es pot observar en els aminoàcids Ala, Val, Leu i Ile (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1). El fragmentòmer $f^{(3)}\{\text{Ala-}\alpha\}$ mostra la fracció de molècules de mt-Pyr que provenen directament d'una única molècula font de glicerina. El valor d'aquest fragmentòmer, per a ambdós cultius continus, és una mica més petit que $f^{(3)}\{\text{Phe-}\alpha\}$ (taula apartat 4.3.2-1).

Els fragmentòmers $f^{(2)}\{\text{Ala-}\alpha\}$ i $f^{(1)}\{\text{Val-}\alpha\}$ indiquen que una petita fracció (5-6%) de les molècules de mt-Pyr tenen l'enllaç C₁-C₂ trencat, mentre que l'enllaç C₂-C₃ roman intacte en ambdós cultius continus (es pot observar amb els valors de $[f^{(2)}+f^{(3)}]\{\text{Ala-}\alpha\}$, $f^{(2*)}\{\text{Ala-}\alpha\}$, $f^{(2)}\{\text{Ala-}\beta\}$, i $f^{(2)}\{\text{Val-}\gamma 1\}$). No obstant, la major part de les molècules de mt-Pyr provenen directament d'una sola molècula font de glicerina i, per tant, conserven intactes el fragment C₁-C₂-C₃.

Ruta de la Pentosa Fosfat

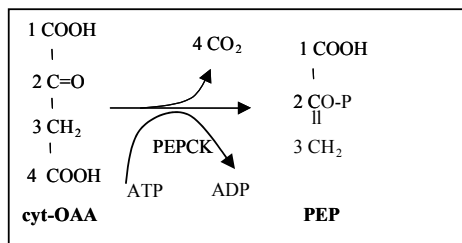
Per poder estudiar la ruta de la pentosa fosfat, cal analitzar dos metabòlits precursors, l'eritrosa 4-fosfat (E4P) i la ribosa 5-fosfat (R5P), els quals poden observar-se a través dels carbonis de l'anell aromàtic de la Tyr (com s'ha explicat a l'apartat 3.5.2 de Materials i Mètodes, els forts acoblaments C-C en els carbonis aromàtics de la Phe fan inviàble l'observació individualitzada dels multilpets d'aquests carbonis) i de la His, respectivament.

Concretament, quan es fan créixer les cèl·lules sobre glicerina, l'únic patró de marcatge possible per a l'E4P indica que aquesta conté el fragment C₂-C₃-C₄ intacte i l'enllaç C₁-C₂ sempre tallat, tant quan s'origina a través de la part oxidativa com la no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfat (figures a l'Apèndix 6.8.2). Degut a què aquest és l'únic patró de marcatge que es pot observar per a aquest metabòlit, a partir d'ell no es podrà obtenir cap informació a banda d'observar qualitativament si l'acció reversible de la tranquetolasa i la transaldolasa es manifesten.

La His tindrà sempre tallat l'enllaç C₂-C₃ quan l'aliment sigui glicerina. Els patrons de marcatge observats per a la His mostren que, efectivament, aquest enllaç està sempre trencat de manera que només resta l'enllaç C₁-C₂ per a recollir informació (els carbonis C₃-C₄-C₅ sempre vindran directament d'una única molècula de glicerina, i efectivament, aquests enllaços sempre es troben intactes en la His, com es pot comprovar a partir dels valors $f^{(3)}\{\text{His-}\alpha\} \geq 0.94$). Per als cultius a baixa D, els valors dels fragmentòmers $f^{(1)}$ i $f^{(2)}$ de la His- $\delta 2$ mostren que un 55.4% de les molècules de R5P tenen l'enllaç C₁-C₂ trencat, i la resta, el 44.6%, intacte (taula 4.3.2-1). En el cas dels cultius a elevada D s'observen uns resultats gairebé idèntics. El trencament de l'enllaç C₁-C₂ indica l'acció dels enzims tranquetolasa i transaldolasa. Podria semblar, doncs, que com a mínim una part de la branca no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfat estaria activa en ambdós cultius continus. No obstant, aquest patró de marcatge també s'obtindria en el cas en què tant la branca oxidativa de la ruta de la pentosa fosfat com les reaccions reversibles catalitzades per la tranquetolasa i la transaldolasa estiguessin actives. Aquest fet significa que, malgrat que es pot observar l'efecte combinat de la tranquetolasa i la transaldolasa, no es pot diferenciar, però, la relativa contribució de la branca oxidativa vers la no oxidativa en la ruta de biosíntesi de les pentoses 5-fosfat emprant aquest protocol de marcatge fraccional amb ¹³C.

Rutes associades a intermedis del TCA

La gluconeogènesi des del cyt-OAA (observable a partir de l'Asp) per la via de la PEP carboxiquinasa (PEPCK) es pot considerar absent, en ambdós cultius continus de glicerina.



Com es pot observar a la figura, una activitat significativa de la PEPCK generaria patrons de marcatge dels carbonis C₁-C₂-C₃ semblants entre les dues molècules.

Per al cyt-OAA, la fracció de molècules de que tenen *només* el seu enllaç C₂-C₃ trencat està al voltant de 0.40 i 0.20 per als cultius a baixa i alta velocitat de dilució, respectivament (com es pot comprovar a partir dels valors de $f^{(2*)}$ {Asp- α } i $f^{(2*)}$ {Thr- α }). No obstant, la fracció de molècules de PEP que tenen *només* el seu enllaç C₂-C₃ trencat és negligible en ambdós cultius continus, com es pot deduir a partir dels valors de $f^{(2*)}$ {Phe- α } i $f^{(2*)}$ {Tyr- α }. L'activitat de la PEPCK, si fos present, significaria unes quantitats relativament majors dels trencaments dels enllaços C₂-C₃ (i C₁-C₂) en el PEP que provindrien dels enllaços corresponents del cyt-OAA.

Es pot calcular la contribució de la PEPCK a partir de la següent equació:

$$X^{PEPCK} = f^{(2*)} \{Phe-\alpha, Tyr-\alpha\} / f^{(2*)} \{Asp-\alpha, Thr-\alpha\}$$

La qual es troba entre el 0 i el 2.5% tant per al cultiu a D baixa com a D alta. El càlcul de l'interval de valors prové de l'aplicació de la fórmula per als diferents fragmentòmers.

En general, els quocients de fluxos que s'han pogut calcular al nivell de la glicòlisi i la gluconeogènesi (PEPCK), són molt similars quan es comparen els resultats per als dos cultius continus amb glicerina, a diferents velocitats de dilució. També pel que fa a la ruta de la PPP s'ha vist que el funcionament és molt semblant en ambdós cultius continus, malgrat la informació limitada que es pot obtenir d'aquesta ruta amb l'estratègia de marcatge emprada. En canvi, sí que es pot obtenir informació valuosa per a les rutes associades als intermedis del TCA i rutes anapleròtiques. A més, es troben diferències significatives entre els dos cultius a diferent velocitat de dilució.

Les fraccions de mt-OAA que prové del PEP, per la via de l'acció conjunta de la reacció de la piruvat quinasa i la reacció anapleròtica de la piruvat carboxilasa són 32.3~33.3% i 47.4~49.5% per als cultius a baixa i alta D, respectivament (taula 4.3.4-1).

Per a poder realitzar el càlcul d'aquesta contribució de la interconversió anapleròtica del PEP citosòlic fins a mt-OAA (el qual participa en el cicle TCA) s'ha de tenir en compte que la síntesi de l'OAA des de PEP en els llevats (per l'acció conjunta de la piruvat quinasa i la piruvat carboxilasa) té lloc únicament al citosol (Rohde M. *et al.*, 1991; Van Urk H. *et al.*, 1991). Això significa que el cyt-OAA produït ha d'entrar a la mitocòndria (mt-OAA) per poder garantir l'abastiment anapleròtic. Per aquest motiu, els valors anteriors referents a la fracció de mt-OAA que prové del PEP, també indiquen el flux

relatiu del cyt-OAA cap a l'interior de la mitocondria per satisfer les demandes biosintètiques del cicle del TCA (Szyperski T. *et al.*, 1999).

Degut, però, a què a partir de l'Asp només es pot observar el cyt-OAA, si volem obtenir els valors dels fragmentòmers per al mt-OAA, caldrà fer-ho a partir de l'OxGlu, el qual observem a través del Glu (figures 4.3.3-1 i 4.3.3-2). Els valors f de la Glu- α i de la Phe/Tyr- α representen el carboni C2 de l'OxGlu i del PEP, respectivament (figures 4.3.3-1 i 4.3.3-2).

Per al creixement del llevat *Saccharomyces cerevisiae* amb glucosa com a única font de carboni es pot suposar de forma fiable que la condensació del mt-AcCoA (observable a partir de la Leu- α , com es pot comprovar en les figures 4.3.3-1 i 4.3.3-2) i del mt-OAA és irreversible (Michal G., 1998), de manera que s'assumeix el mateix per a *Pichia pastoris* creixent en glicerina. Així, la fracció de molècules amb connexions intactes C₂-C₃ en mt-OAA, provindrà del PEP. Aquesta fracció de molècules de mt-OAA es podrà relacionar amb la fracció de mt-OAA provinent de la carboxilació anapleròtica (Szyperski T., 1995). Aquesta última es denominarà $X^{ana} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP})$, i es pot calcular a partir de l'OxGlu i del PEP a partir de la següent equació 1 (Maaheimo H. *et al.*, 2001):

$$X^{ana} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP}) = \frac{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Glu-}\alpha\}}{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Phe, Tyr-}\alpha\}} \quad \text{eq. (1)}$$

La definició d' X^{ana} és la següent:

$$X^{ana} = \text{molècules de mt-OAA que provenen del PEP} / \text{molècules totals de mt-OAA}$$

Com s'ha dit, les molècules de mt-OAA amb l'enllaç C₂-C₃ conservat provenen del PEP, això ens duria a proposar que:

$$X^{ana} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP}) = \frac{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Glu-}\alpha\}}{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Glu-}\alpha\}}$$

ja que,

$$= \text{molècules de mt-OAA amb l'enllaç C}_2\text{-C}_3 \text{ conservat (provenen del PEP)} / \text{totes les molècules de mt-OAA}$$

Ara bé, no totes les molècules del PEP tenen l'enllaç C₂-C₃ intacte (el que correspondria a l'enllaç C₂-C₃ del mt-OAA). Això significa que cal tenir en compte que hi haurà una fracció major de molècules de mt-OAA que provindran del PEP que no pas únicament aquelles que tenen l'enllaç C₂-C₃ intacte. Per tenir en compte aquest factor corrector, cal saber quina és la fracció de molècules de PEP que tenen aquest enllaç intacte, la qual es correspon amb el valor de $\frac{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Phe, Tyr-}\alpha\}}{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Phe, Tyr-}\alpha\}}$.

Això fa que el càlcul exacte de X^{ana} sigui l'equació 1 i no pas l'anterior.

Es pot posar un exemple per demostrar-ho d'una manera més senzilla:

Es parteix del fet que les molècules de Phe i Tyr, que provenen del PEP, que a la vegada prové de la glicerina, tindran l'enllaç C₂-C₃ majoritàriament conservat (suposem p.ex. 95%, és a dir $\frac{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Phe, Tyr-}\alpha\}}{[f^{(2)}+f^{(3)}] \{\text{Phe, Tyr-}\alpha\}} = 0.95$).

En canvi, les molècules de Glu, que provenen del mt-OAA, tindran una fracció (en termes absoluts) d'enllaços C₂-C₃ conservats menor, ja que la fracció de molècules que han passat pel cicle TCA tindran els enllaços C₂-C₃ tallats. Així, posem que p.ex., la fracció de molècules de Glu (és a dir de mt-OAA) que tenen l'enllaç C₂-C₃ conservat és 20% (és a dir, $[f^{(2)}+f^{(3)}] \{Glu-\alpha\} = 0.20$).

Ara es vol calcular quina fracció (en percentatge, per exemple) de molècules de mt-OAA provenen del PEP. El 20% segur que provenen del PEP, ja que són les que tenen l'enllaç C₂-C₃ intacte. És a dir, l'única opció perquè una molècula de mt-OAA tingui C₂-C₃ conservat, és que provingui del PEP. Però, com s'ha suposat, aquest PEP té un 5% de molècules amb l'enllaç C₂-C₃ tallat, de manera que una part de les molècules de mt-OAA que tenen C₂-C₃ tallat també vindran del PEP.

De manera que

$$X^{ana} = 100 * 20 / 95$$

En tant per 1 seria:

$$X^{ana} = 20 / 95 = 0.20 / 0.95$$

Aquesta manera de calcular el valor de X^{ana} és exactament l'equació 1. La determinació de l'interval de valors d'aquesta fórmula prové del càlcul d'aquesta a partir dels fragmentòmers dels diferents aminoàcids alternatius, en aquest cas Phe- α i Tyr- α .

Aquest càlcul considera que la funció anapleròtica de la ruta del glioxilat és el de proporcionar al cicle del TCA molècules 4C (succinat i malat), les quals provindrien del cyt-OAA. D'aquesta manera es pot esperar que hi hagi un transport net del succinat i el malat del peroxisoma fins a la mitocondria, però que, en canvi, no hi hagi una conversió de l'OAA del peroxisoma en cyt-OAA (per exemple per requeriments gluconeogènics). A més, ja s'ha confirmat que no s'observa activitat significativa de la PEPCK i tal com es veurà a continuació, no hi ha activitat significativa de la ruta del glioxilat al citoplasma. En el cas que hi hagués la possibilitat que part de l'OAA generat a través del cicle del glioxilat estigués present al citoplasma i fos posteriorment transportat a la mitocondria, la fracció de mt-OAA que s'origina a partir del PEP no es podria calcular.

La diferència de valors de X^{ana} per als dos cultius a diferent velocitat de dilució indica una major contribució de la reacció anapleròtica del PEP al mt-OAA per al cultiu a velocitat de dilució alta, és a dir, que la quantitat de mt-OAA importat del citosol a la mitocondria és major per al cultiu a elevada velocitat de dilució.

Es podria suggerir una altra mesura de la quantitat de mt-OAA importat del citosol, és a dir, de la fracció de mt-OAA originat a partir del cyt-OAA, pot realitzar-se relacionant la fracció de connexions C₂-C₃ intactes en el mt-OAA, a través del Glu- α , amb aquelles observades en el cyt-OAA, a través de l'Asp- α , però el possible efecte sobre el cyt-OAA de la ruta del glioxilat o bé de l'exportació de les molècules procedents del cicle del TCA faria que aquest càlcul fos erroni.

Es podria suggerir una tercera opció de càlcul de la contribució anapleròtica de l'OAA a partir de la fracció de mt-OAA derivat del cyt-Pyr, però també donaria lloc a errors ja que els aminoàcids derivats del piruvat es sintetitzen a partir del *pool* de mt-Pyr i, per tant, els patrons de marcatge del *pool* de cyt-Pyr no es poden observar amb aquest protocol BDF de marcatge.

Les fraccions de cyt-OAA que prové del PEP per la via de la carboxilació del cyt-Pyr, denominada X_3^{cyt} , són de 32~33% i 68~70% per als cultius a baixa i elevada D, respectivament. El càlcul es pot dur a terme a partir de la següent equació 2 (Maaheimo *et al.*, 2001):

$$X_3^{cyt} = [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\alpha\} \quad \text{eq.(2)}$$

= molècules d'Asp amb l'enllaç C₂-C₃ intacte / molècules totals d'Asp =
 = molècules de cyt-OAA amb l'enllaç C₂-C₃ intacte / molècules totals de cyt-OAA

El *pool* de cyt-OAA es pot mesurar experimentalment a través de l'Asp, així com també a partir de la Thr i la Met, que es deriven d'aquest (d'aquesta manera es pot calcular l'inreval de valors de la fórmula presentada). La Met, però, no s'ha emprat perquè la seva integració és més complicada i els resultats es desvien una mica dels altres dos. La suma dels fragmentòmers $[f^{(1)} + f^{(2*)}] \{Asp-\alpha\}$ indica que el 68% i el 32% dels enllaços C₂-C₃ en el cyt-OAA de les cèl·lules crescudes a baixa i alta D, respectivament, són de nova formació. Això és característic del cyt-OAA sintetitzat a partir, o bé de l'OxGlu en el cicle TCA (cosa que implica que és possible que estigui tenint lloc alguna exportació de mt-OAA des de la mitocondria, per exemple per la via de les llançadores de malat-Asp i/o malat-OAA (Bakker, B.M. *et al.*, 2001), o bé a través del cicle del glioxilat. A més, la producció i posterior reassimilació de l'acetat o de l'etanol també podrien contribuir a aquest *pool* de cyt-OAA (també implicant la contribució del cicle del glioxilat).

El cyt-OAA pot tenir, doncs, diversos orígens a banda del cyt-Pyr i la topologia de la xarxa metabòlica no permet tenir accés als valors directes de les *f* per al cyt-Pyr, per aquest motiu la fracció de cyt-Pyr que prové del PEP no es pot estimar emprant el formalisme METAFoR que s'ha desenvolupat per als llevats amb anterioritat (Szyperski T. *et al.*, 1999).

La fracció d'OAA citosòlic (cyt-OAA) que ha estat reversiblement convertit a fumarat com a mínim una vegada, és a dir, en el **flux d'intercanvi entre el cyt-OAA i el fumarat**, és major per al cultiu a baixa D que per al cultiu a alta D, ja que el valor és 26.3~56.2% per al cultiu a baixa D mentre que és només del 9.1~11.6% en el cultiu a elevada D (taula 4.3.4-1).

El valor d'aquesta fracció del flux de cyt-OAA reconvertit reversiblement a fumarat es recull en la variable $cyt-X^{ench}$, la qual es calcula de la següent manera (Maaheimo H. *et al.*, 2001):

$$cyt-X^{ench} = X(\text{cyt-OAA} \leftrightarrow \text{fumarat}) = [2 * f^{(3)}] \{Asp-\beta\} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\beta\} \quad \text{eq.(3)} =$$

= 2 * fracció de molècules de cyt-OAA que tenen C₂-C₃-C₄ conservats (és a dir que tenien C₁-C₂-C₃ conservats i C₄ provinent del CO₂ però que han passat a fumarat, han

girat, i han tornat a cyt-OAA) / fracció de molècules de cyt-OAA amb els enllaços C₂-C₃ conservats

= 2 * fracció de molècules de cyt-OAA que tenen C₂-C₃-C₄ conservats (és a dir que tenien C₁-C₂-C₃ conservats i C₄ provinent del CO₂ però que han passat a fumarat, han girat, cosa que es suposa només faran el 50% d'elles per probabilitat, i han tornat a cyt-OAA) (sobre el total de molècules de cyt-OAA) / fracció de molècules de cyt-OAA que provenen de la carboxilació del cyt-Pyr (sobre el total de molècules de cyt-OAA)

Aquesta divisió és correcta ja que la referència, el denominador de totes dues variables dividides és el mateix.

Els valors d'aquesta reacció d'intercanvi poden ser el resultat de:

- L'acció dels enzims que constitueixen el cicle del glioxilat, incluint la malat deshidrogenasa i la fumarasa citosòliques,
- i/o de l'intercanvi entre compartiments entre el cyt-Succinat i/o el mt-Fumarat, per exemple per la via de la llançadora del succinat-fumarat, per al qual s'ha proposat un rol en la gluconeogènesi, (Palmieri, L. *et al.*, 1999), o per la via d'un transportador del succinat,
- i/o per l'intercanvi entre compartiments de les molècules d'OAA. Per exemple, l'exportació del mt-OAA des de dins de la mitocondria, per la via de la llançadora malat-OAA (Bakker, B.M. *et al.*, 2001).

La mateixa fracció es podria calcular per al *pool* mitocondrial de mt-OAA ($mt-X^{exch}$) tenint en compte que els fragments C₁-C₂-C₃ intactes originats a partir d'una sola molècula font de glicerina en l'OxGlu, cal que provinquin del mt-OAA (i que corresponen als carbonis C₄-C₃-C₂ d'aquest) que s'ha convertit en mt-fumarat o mt-succinat i després s'ha tornat a convertir en mt-OAA.

Així, la fracció de molècules de mt-OAA que han estat com a mínim una vegada interconvertides reversiblement en mt-fumarat, denominada $mt-X^{exch}$, es pot calcular amb la següent equació 5 (Maaheimo *et al.*, 2001):

$$mt-X^{exch} = X(\text{mt-OAA} \leftrightarrow \text{fumarat}) = [2 * f^{(3)}] \{ \text{Glu-}\alpha \} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{ \text{Glu-}\alpha \} \quad \text{eq.(5)} =$$

= 2 * fracció de molècules amb els enllaços C₁-C₂-C₃ de l'OxGlu conservats (és a dir, enllaços C₄-C₃-C₂ del mt-OAA conservats) / fracció de molècules amb l'enllaç C₂-C₃ del mt-OAA conservat =

= 2 * fracció de molècules de mt-OAA (provinents directament de cyt-OAA) que han passat a fumarat, s'han girat (50% de probabilitats i per això es multiplica per 2) i han tornat a mt-OAA (sobre el total de molècules de mt-OAA) / fracció de molècules de mt-OAA que vénen del cyt-OAA (sobre el total de molècules de mt-OAA) (en aquest cas sí que veig que es puguin dividir les fraccions)

El càlcul de X^{exch} d'acord amb les equacions anteriors implica l'assumpció de la completa simetria per als patrons de marcatge ¹³C sobre l'enllaç dels carbonis C₂-C₃ del

succinat o fumarat (Szyperski T., 1995) els quals no tindrien cap restricció a la rotació en solució.

El flux d'intercanvi entre el mt-OAA i el fumarat ($mt-X^{exch}$) és del 64.5% i del 60.8% per als cultius a baixa i alta D, respectivament (taula 4.3.4-1) (només calculat amb la Glu- α). La similitud entre aquests valors contrasta clarament amb les diferències clares entre els dos cultius pel que fa al flux d'intercanvi entre el cyt-OAA i el fumarat. Aquest fet podria ser un indicador o bé d'una diferència entre l'activitat del cycle del glioxilat o bé en els nivells d'exportació de les molècules de mt-OAA (o altres intermedis del cycle TCA) procedents del cycle del TCA. Tal com es veurà a continuació, la raó més probable és la segona, és a dir, diferències entre el flux net d'exportació del mt-OAA. Per exemple, a elevades velocitats de dilució (és a dir, per al cultiu a major velocitat específica de creixement), on hi ha la necessitat anapleròtica de compostos 4C degut a la major demanda d'intermedis del TCA per a requeriments biosintètics, es podria esperar que no cal exportar molt poc o gens mt-OAA (o altres intermedis del cycle TCA) fora de la mitocòndria.

L'activitat del cycle del glioxilat, detectada com una importació neta significativa de cyt-Succ cap a l'interior de la mitocòndria, sembla negligible en ambdós cultius continus.

A banda de l'anaplerosi a partir de l'OAA, el cycle del TCA pot també estar alimentat amb Succ generat a partir de l'AcCoA (més OAA) pel cycle del glioxilat. La manifestació d'aquesta ruta es concreta en la formació de nous enllaços C₂-C₃ en el cyt-Succ, el qual s'ha generat a partir del cyt-OAA, de la mateixa manera que ocorre amb la formació del mt-Succ a partir de mt-OAA per la via del TCA. No obstant, un import net del cyt-Succ dins del cycle del TCA mitocondrial provocaria un augment de la quantitat relativa d'enllaços C₂-C₃ de nova formació en el mt-OAA i, finalment, de les molècules d'OxGlu per la via del TCA.

Aquest fet es pot observar comparant el patró de marcatge del Glu- α (és a dir, observant el patró de marcatge de l'OxGlu) amb les corresponents abundàncies relatives teòriques dels fragments de carbonis intactes per al mt-OAA en absència d'activitat del cycle del glioxilat, tal i com es calcula a Maaheimo, H. *et al.* (2001). En ambdós cultius continus, aquests valors són comparables, és a dir, que la quantitat relativa d'enllaços C₂-C₃ de nova formació en l'OxGlu és del mateix ordre que en les molècules de mt-OAA i, per tant, es pot deduir que la ruta del glioxilat no està activa, o ho està a nivells basals. Aquest mètode, però, encara no ha estat provat en cèl·lules on s'ha comprovat que el cycle del glioxilat està efectivament actiu, de manera que queda pendent de validar per poder donar per segura aquesta afirmació.

Per confirmar aquestes dades, es van mesurar les activitats relatives d'ICL dels cultius i es van trobar valors baixos per al cultiu a menor velocitat de dilució, 0.05h⁻¹, (0.019 U·mg⁻¹ de proteïna), mentre que per al cultiu a elevada velocitat de dilució, 0.16h⁻¹, encara es van trobar valors d'activitat de l'ICL menors (5.07·10⁻³ U·mg⁻¹ de proteïna).

Pel que fa a l'activitat de l'enzim màlic, en ambdós cultius continus és molt baixa.

Les estructures fines de l'acoblament escalar ¹³C-¹³C corresponents al carboni Ala- α indiquen que l'enllaç C₂-C₃ del piruvat es manté intacte. Això es pot deduir a partir de

la fracció d'enllaços C_{α} - C_{β} intactes en l'Ala- α (és a dir, $[f^{(2)} + f^{(3)}] \{Ala-\alpha\}$) que és 0.98 i 0.99 per als dos cultius continus (taula 4.3.2-1). No obstant, la fracció d'enllaços C_{α} - C_{γ} trencats en l'Ala- α i la Val- α (és a dir, $[f^{(1)} + f^{(2)}] \{Ala-\alpha\}$ i $f^{(1)} \{Val-\alpha\}$) indiquen que una petita fracció de les molècules de piruvat (entre el 4-8%) tenen l'enllaç C_1 - C_2 tallat en ambdós cultius continus. Aquesta observació podria ser el resultat de l'acció de l'enzim màlic a nivells basals permetent una llançadora funcional Pyr-malat per a l'import del NAD(P)H i l'exportació del mt-Pyr al citosol. La baixa contribució de l'enzim màlic en la biosíntesi del mt-Pyr a partir de mt-malat, però, significa que gairebé tot el mt-Pyr és importat del citosol.

Pel que fa a la síntesi de l'AcCoA, la fracció de mt-AcCoA (observable a través de la Leu- α) que prové del mt-Pyr (observable a través de l'Ala) i la fracció de cyt-AcCoA (observable a través de la Lys- α) que prové del cyt-Pyr (corresponent al PEP, observable a través de la Phe i la Tyr) no es poden calcular degut a la degeneració dels valors de les f . És a dir, la fracció de mt-Pyr que té l'enllaç C_2 - C_3 intacte, que es veu en $f^{(2)} \{Ala-\beta\}$, és gairebé idèntica a la fracció de PEP que té el mateix enllaç intacte ($f^{(2)} \{Phe-\beta\}$, per exemple) (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1). Malgrat això, els valors dels fragmentòmers de la Leu- α i la Lys- α no es corresponen completament, cosa que pot ser deguda a aquest petit percentatge de la Lys que podria estar sintetitzada a través d'una altra ruta alternativa a l' α -aminoadipat. Aquesta impossibilitat d'identificació de la procedència de l'AcCoA, s'ha observat també en cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* creixent en presència de glucosa com a única font de carboni (Maaheimo, H. *et al.*, 2001). Com a conseqüència, no es pot determinar el flux d'intercanvi de l'AcCoA entre el citosol i la mitocòndria.

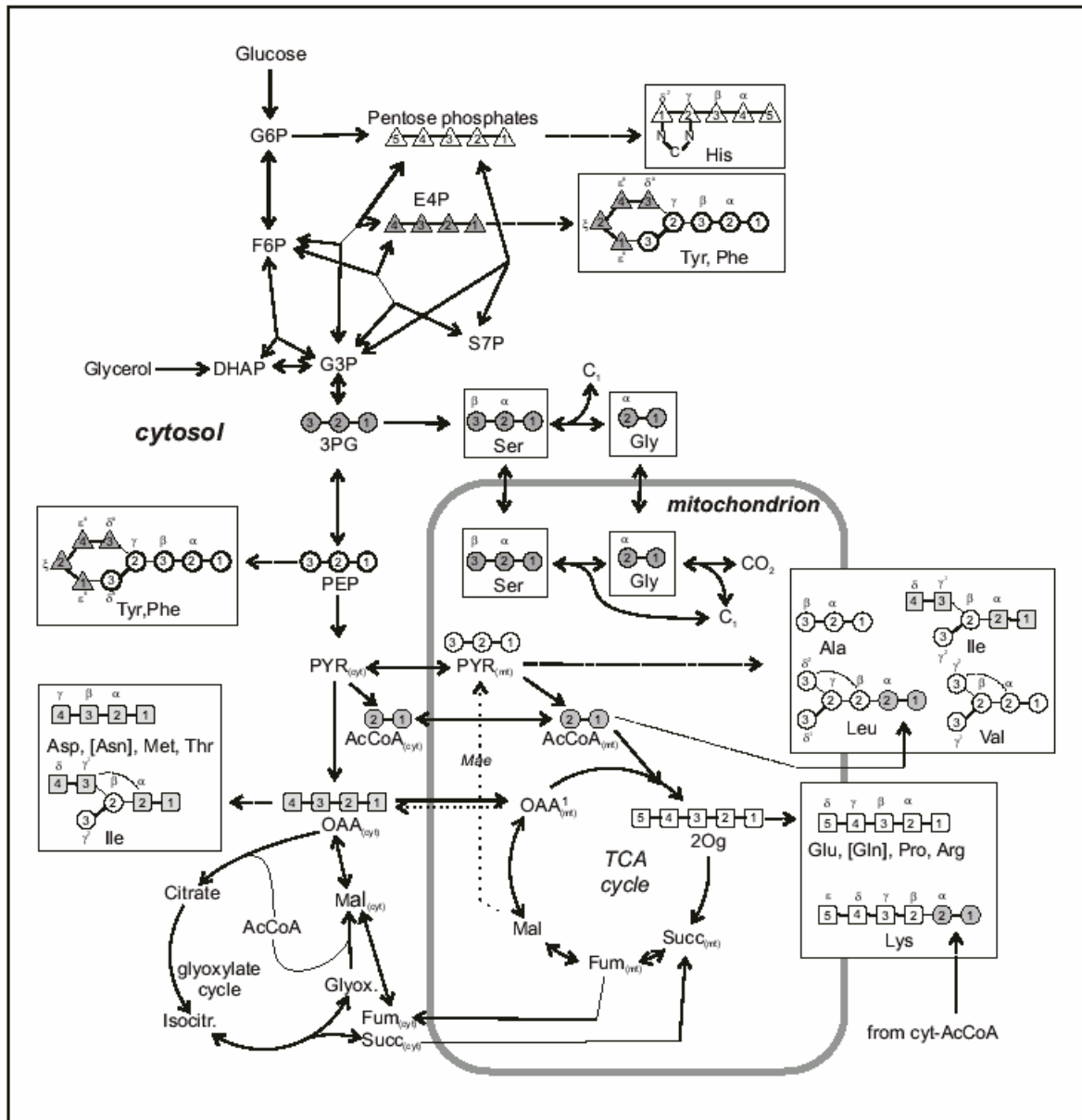


Figura 4.3.3-1. Origen dels esquelets de carboni dels diferents aminoàcids a partir dels seus precursors biosintètics i xarxa de reaccions metabòliques considerades (Hannu Maaheimo, VTT Biotechnology, Helsinki).

4.3.4. Conclusions

Així doncs, s'ha utilitzat el marcatge biosintètic fraccional amb ^{13}C dels aminoàcids combinat amb tècniques d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear per a explorar l'anabolisme dels aminoàcids i el metabolisme central del carboni del llevat *Pichia pastoris* quan creix amb glicerina com a única font de carboni en cultius aeròbics en continu, sota dues velocitats específiques de creixement, és a dir, emprant dues velocitats de dilució diferent. Concretament, els cultius continus es van dur a terme a 0.05 h^{-1} i 0.16 h^{-1} .

L'anàlisi de les dades demostren que els aminoàcids són sintetitzats d'acord amb les rutes metabòliques descrites per a llevats (*Saccharomyces cerevisiae*).

La caracterització de la xarxa de rutes metabòliques actives en el metabolisme central del carboni mostra que, en ambdues velocitats de dilució:

- La gluconeogènesi des del cyt-OAA per la via de la PEPCK no es registra, és a dir que l'activitat de l'enzim gluconeogènic PEP carboxiquinasa és molt baixa.
- El cicle del glioxilat es troba a nivells basals o nuls.
- El rol de l'enzim màlic per al metabolisme mitocondrial del piruvat és virtualment nul, és a dir que l'activitat de l'enzim màlic en la mitocòndria sembla molt baix en ambdós cultius continus.
- La majoria del piruvat mitocondrial (mt-Pyr) s'importa del citosol.
- La fracció de mt-OAA interconvertida reversiblement a Fum és del mateix ordre.
- La transferència d'oxalacetat a través de la membrana mitocondrial sembla ser bidireccional.

En contrast amb això, les diferències més significatives que es van trobar entre les dues velocitats específiques de creixement són:

- Les contribucions de la reacció anapleròtica *via* piruvat carboxilasa per a la síntesi de l'oxalacetat mitocondrial (mt-OAA) són marcadament superiors a D alta. Aquesta conclusió és consistent amb la visió general que quan més elevada és la velocitat específica de creixement, més augmenta també la demanda de biosíntesi d'aminoàcids.
- La fracció de cyt-OAA que prové del *pool* mitocondrial d'intermedis C4 (per exemple a través de les llançadores Mal/OAA) és unes 6 vegades superior a D baixa. Això indica que a velocitats de dilució properes a la velocitat específica màxima de creixement hi ha un flux gairebé unidireccional d'OAA des del citosol a la mitocòndria (tal i com s'observa en els cultius en Erlenmeyer en fase exponencial de *Saccharomyces cerevisiae* realitzats per Maaheimo H. *et al.*, 2001).

Això fa pensar en una contribució diferent pel que fa al cicle anapleròtic del glioxilat i/o dels intercanvis intercompartamentals dels intermedis del cicle del TCA.

Tanmateix, apareixen limitacions molt clares quan s'utilitza la glicerina com a única font de carboni (en lloc de glucosa, com s'ha realitzat en els anteriors estudis

METAFoR) amb aquesta metodologia, ja que les dues rutes alternatives per a la ruta de la pentosa fosfat (la branca oxidativa i la no oxidativa) generen unitats C2 i C3 marcades amb ^{13}C de manera equivalent, cosa que no permet diferenciar-les.

Taula 4.3.4-1. Origen dels intermedis metabòlics del metabolisme central del carboni de *P. pastoris* obtinguts a partir de l'anàlisi del marcatge ^{13}C fraccional dels aminoàcids.

Metabòlits	Fracció del total del pool [%]	
	μ	
	0.05 h ⁻¹	0.16 h ⁻¹
<i>Citosol</i>		
PEP a partir de cyt-OAA (reacció de la PEPCK)	0~3	0~3
cyt-OAA a partir de cyt-Pyr (X_3^{cyt})	32~33	68~70
cyt-OAA convertit reversiblement a fumarat ($cyt-X^{exch}$)	26.3~56.2	9.1~11.6
Gly a partir de Ser	≥30	≥10
<i>Mitocòndria</i>		
mt-Pyr a partir de malat (enzim màlic)	4~8	5~8
mt-OAA a partir de cyt-PEP (X^{ana})	32.3~33.3	47.4~49.5
mt-OAA convertit reversiblement a fumarat ($mt-X^{exch}$)	64.5	60.8
<i>Metabolisme C1</i>		
Ser a partir de Gly i una unitat C1	43	43
Gly a partir de CO ₂ i una unitat C1	2	5

4.4. Cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni

Paral·lelament als estudis del metabolisme realitzats per a cultius amb glicerina (apartat 4.3 dels resultats) i diferents barreges de glicerina i metanol (apartat 4.5 dels resultats), es va veure convenient fer un cultiu amb glucosa com a única font de carboni, per dos motius principals:

- Per validar l'anàlisi METAFoR per al metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* complert, inclosa la ruta de la pentosa fosfat (PPP).
- Per poder comparar aquests estudis del metabolisme per a *Pichia pastoris*, amb el mètode METAFoR, amb altres estudis realitzats amb el mateix mètode per a altres llevats i que han estat fets amb glucosa com a font de carboni (Maaheimo H. *et al.*, 2001; Fiaux J. *et al.*, 2003).
- A més, es podrà veure l'efecte de la glucosa en comparació amb la glicerina sobre les rutes associades als intermedis del TCA.

4.4.1. Característiques del cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni

El cultiu amb glucosa com a única font de carboni es va realitzar únicament a la velocitat de dilució, D , de 0.16h^{-1} . Es va escollir aquesta velocitat específica de creixement per fer-la coincidir amb alguna de les dues velocitats específiques de creixement emprades en els cultius continus amb glicerina com a única font de carboni. Cal recordar, també, que la velocitat específica de creixement màxima que es va trobar per a la soca X33-ROL de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa va ser de 0.18h^{-1} (apartat 4.2 dels resultats), de manera que la velocitat de dilució 0.16h^{-1} queda una mica per sota d'aquesta última, de manera semblant al cas dels cultius amb glicerina (0.17h^{-1} vers 0.16h^{-1}). D'aquesta manera es pot fer una comparació directa de l'observació del metabolisme en ambdós casos, ja que ambdós cultius es realitzen a velocitats de dilució properes a la velocitat específica de creixement i, tal com es veurà, en un estat fisiològic equivalent (com excés de substrat al medi i presència del metabolisme respiratori). Les condicions de cultiu són les que s'especifiquen a l'apartat 3.2.2 (Materials i Mètodes).

Resum de les dades del cultiu continu ($D=0.16\text{h}^{-1}$)

La concentració de glucosa en els medis d'alimentació va ser de 10g/l , i durant el temps de residència amb l'aliment marcat, el 12% de la glucosa estava marcada (és a dir, 88% de glucosa a l'abundància natural i 12% de $[^{13}\text{C}_6]$ -glucosa).

Els valors dels paràmetres més importants a l'estat estacionari són els següents:

Estat estacionari	Biomassa (g/l)	[glucosa] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
$\mu = 0.16\text{h}^{-1}$	5.34 g/l 11.3 OD ₆₀₀	0.5	0	CH _{0.162} N _{1.994} S ₀ O _{0.688} (12.19% cendres)

4.4.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats

Les cèl·lules biosintèticament marcades fraccionalment amb ^{13}C (BDF ^{13}C -marcades amb ^{13}C), es van centrifugar i després es van sotmetre a hidròlisi. Els aminoàcids de l'hidrolitzat es van analitzar emprant els experiments d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear 2D [^{13}C , ^1H]-COSY amb detecció al ^1H per obtenir, finalment, els corresponents valors dels fragmentòmers, f (tal i com s'explica en l'apartat 3.5.3 de Materials i Mètodes).

La taula de dades que permeten al programa FCAL calcular el valor dels fragmentòmers a partir de les intensitats dels multiplets és la següent:

Cultiu 100% glucosa				
	P_n (%)	P_f (%)	F_m (%)	P_1 (%)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	1.1	12	0.617	8.4

On s'han utilitzat les mateixes fórmules que en l'apartat 4.3.2 dels resultats, és a dir, les presentades a l'apartat 6.1 de l'Apèndix.

Els valors dels fragmentòmers trobats per a aquest cultiu continu són els que es mostren a la següent taula 4.4.2-1 (a l'Apèndix 6.5.3 hi ha la taula ampliada amb els valors de les intensitats dels multiplets):

Taula 4.4.2-1. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics.

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes (cultiu 100% glucosa)			
	$\mu 0.16 \text{ h}^{-1}$			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0	0.14	0.01	0.85
Ala- β	0.01	0.99	-	-
Arg- β	0.60	0.39	-	0.01
Arg- δ	0.09	0.91	-	-
Asp- α	0.12	0.12	0.16	0.60
Asp- β	0.13	0.71	0.14	0.02
Glu- α	0.22	0.27	0.41	0.10
Glu- β	0.61	0.39	-	0
Glu- γ	0	0.02	0.96	0.02
Gly- α	0.17	0.83	-	-
His- α	0.06	0	0.04	0.90
His- β	0.13	0.53	0	0.34
His- $\delta 2$	0.23	0.77	-	-
Ile- α	0.23	0	0.77	0
Ile- $\gamma 1$	0.74	0.19	-	0.07
Ile- $\gamma 2$	0.06	0.94	-	-
Ile- δ	0.84	0.16	-	-
Leu- α	0.06	0	0.94	0
Leu- β	0.94	0.06	-	0
Leu- $\delta 1$	0.71	0.29	-	-

Leu- δ_2	1	0	-	-
Lys- α	0.06	0	0.92	0.02
Lys- β	0.63	0.37	-	0
Lys- γ	0.66	0.34	-	0
Lys- δ	0.06	0.94	-	0
Lys- ϵ	0.10	0.90	-	-
Met- α	0.14	0	0.21	0.65
Phe- α	0.03	0.10	0.01	0.86
Phe- β	0.06	0.80	0.14	0
Pro- α	0.29	0.28	0.37	0.06
Pro- β	0.65	0.35	-	0
Pro- γ	0.12	0.86	-	0.02
Pro- δ	0.11	0.89	-	-
Ser- α	0.13	0.04	0.36	0.47
Ser- β	0.47	0.53	-	-
Thr- α	0.16	0.09	0.13	0.62
Thr- β	0.14	0.85	-	0.01
Thr- γ_2	0.82	0.18	-	-
Tyr- α	0.03	0.11	0.01	0.85
Tyr- β	0.05	0.95	0	0
Tyr- δ_x			n.d.	
Tyr- ϵ_x	0.33	0.21	-	0.46
Val- α	0.13	0	0.87	0
Val- γ_1	0.03	0.97	-	-
Val- γ_2	0.05	0.95	-	-

La mostra d'algunes de les seccions transversals preses al llarg de l'eix $\omega_1(^{13}\text{C})$ de l'espectre 2D es pot consultar a l'apartat 6.6.2 de l'Apèndix.

4.4.3. Anàlisi METAFoR dels resultats

El procediment que es durà a terme en aquest apartat, per al cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni, és el mateix que l'efectuat en l'apartat 4.3.3 dels resultats, per als cultius continus amb glicerina com a única font de carboni.

Biosíntesi dels aminoàcids proteics en *Pichia pastoris* durant el creixement sobre glucosa

El primer apartat serà la comprovació de la consistència dels resultats trobats per als fragmentòmers de la mateixa manera que s'ha fet per als cultius amb marcatge únic de la glicerina.

Comprovació dels valors de fragmentòmers coneguts *a priori*

El llistat dels valors dels fragmentòmers coneguts *a priori* es troba a l'apartat 4.3.3 dels resultats. Els valors dels fragmentòmers per al cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni són els següents:

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes (cultiu 100% glucosa)			
	μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ile- α	0.23	0	0.77	0
Ile- γ 1	0.74	0.19	-	0.07
Leu- α	0.06	0	0.94	0
Leu- β	0.94	0.06	-	0
Leu- δ 2	1	0	-	-
Lys- α	0.06	0	0.92	0.02
Lys- β	0.63	0.37	-	0
Phe- β	0.06	0.80	0.14	0
Tyr- β	0.05	0.95	0	0
Tyr- δ_x			n.d.	
Val- α	0.13	0	0.87	0
Val- γ 2	0.05	0.95	-	-

Es pot observar que la majoria dels valors dels fragmentòmers són els esperats, segons les rutes de biosíntesi suposades per a *Pichia pastoris* (apartat 4.3.3 dels resultats), exceptuant el fragmentòmer $f^{(2*)}$ {Phe- β }, de manera que aquest fragmentòmer no s'haurà de tenir en compte al realitzar l'estudi METAFoR. Els altres carbonis que potser presenten una desviació major del valor esperat són els de l'Ile- γ 1 i la Leu- β , però cap d'ells superen el límit considerat del 10% d'error.

Comprovació de les relacions entre fragmentòmers conegudes *a priori*

El llistat de les relacions entre fragmentòmers conegudes *a priori* es troba a l'apartat 4.3.3 dels resultats. Els valors de les igualtats entre fragmentòmers per al cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni són els següents:

Cultiu 100% glucosa			
IGUALTAT	$\mu = 0.16$ h ⁻¹		
	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error
$f^{(1)}$ {Ala- β } = $f^{(1)}$ {Val- γ 1}	0.01	0.03	2
$f^{(1)}$ {Ala- β } = $f^{(1)}$ {Leu- δ 1}	0.01	0.71	70
$f^{(1)}$ {Ala- β } = $f^{(1)}$ {Ile- γ 2}	0.01	0.06	5
$f^{(1)}$ {Val- γ 1} = $f^{(1)}$ {Leu- δ 1}	0.03	0.71	68
$f^{(1)}$ {Val- γ 1} = $f^{(1)}$ {Ile- γ 2}	0.03	0.06	3
$f^{(1)}$ {Leu- δ 1} = $f^{(1)}$ {Ile- γ 2}	0.71	0.06	65
$f^{(3)}$ {Ala- α } + $f^{(2*)}$ {Ala- α } = $f^{(2*)}$ {Val- α }	0.01+0.85 = 0.86	0.87	1
$f^{(1)}$ {Ala- α } + $f^{(2)}$ {Ala- α } = $f^{(1)}$ {Val- α }	0+0.14 = 0.14	0.13	1
$f^{(i)}$ {Asp- α } = $f^{(i)}$ {Met- α }	0.12	n.d.	--
	0.12		
	0.16		
	0.60		
$f^{(i)}$ {Asp- α } = $f^{(i)}$ {Thr- α }	0.12	0.16	4
	0.12	0.09	3

	0.16	0.13	3
	0.60	0.62	2
$f^{(i)}\{\text{Met-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	--		--
$f^{(1)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.13	0.14	1
$f^{(2)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.71+0.14 = 0.85	0.85	0
$f^{(3)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(3)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.02	0.01	1
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Thr-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.16+0.60 = 0.76	0.13+0.62 = 0.75	1
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Met-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Met-}\alpha\}$	0.16+0.60 = 0.76	n.d.	--
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Ile-}\alpha\}$	0.16+0.60 = 0.76	0.77	1
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Ile-}\delta_1\}$	0.14+0.02 = 0.16	0.16	0
	0.22	0.29	7
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.27	0.28	1
	0.41	0.37	4
	0.10	0.06	4
	0.61	0.65	4
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\beta\}$	0.39	0.35	4
	0	0	0
	0.61	0.66	5
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Lys-}\gamma\}$	0.39	0.34	5
	0	0	0
$f^{(1)}\{\text{Lys-}\delta\} = f^{(1)}\{\text{Glu-}\gamma\}$	0.06	0	6
$f^{(2)}\{\text{Lys-}\delta\} =$ $f^{(2)}\{\text{Glu-}\gamma\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\gamma\}$	0.94	0.02+0.96 = 0.98	4
$f^{(3)}\{\text{Lys-}\delta\} = f^{(3)}\{\text{Glu-}\gamma\}$	0	0.02	2
	0	0.06	6
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(i)}\{\text{Leu-}\alpha\}$	0.02	0	2
	0.96	0.94	2
	0.02	0	2
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0	0.12	12
$f^{(2)}\{\text{Glu-}\gamma\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(2)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0.02+0.96 = 0.98	0.86	12
$f^{(3)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(3)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0.02	0.02	0
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.22+0.41 = 0.63	0.29+0.37 = 0.66	3
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\beta\}$	0.22+0.41 = 0.63	0.63	0
$f^{(1)}\{\text{Leu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\alpha\}$	0.06	0.06	0
$f^{(2*)}\{\text{Leu-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Lys-}\alpha\}$	0.94	0.92	2
	0.03	0.03	0
$f^{(i)}\{\text{Phe-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Tyr-}\alpha\}$	0.10	0.11	1
	0.01	0.01	0
	0.86	0.85	1
	0.06	0.05	1
$f^{(i)}\{\text{Phe-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Tyr-}\beta\}$	0.80	0.95	15
	0.14	0	14
	0	0	0
$f^{(i)}\{\text{Pro-}\delta\} = f^{(i)}\{\text{Lys-}\epsilon\}$	0.11	0.10	1
	0.89	0.90	1
$f^{(1)}\{\text{Thr-}\gamma\} = f^{(1)}\{\text{Ile-}\delta_1\}$	0.82	0.84	2
$f^{(2)}\{\text{Thr-}\gamma\} = f^{(2)}\{\text{Ile-}\delta_1\}$	0.18	0.16	2

El càlcul de l'error s'ha realitzat de la següent manera:

$$\% \text{ error} = 100 \cdot |(1^{\text{er}} \text{ terme} - 2^{\text{on}} \text{ terme}) / 1|$$

Les diferències trobades indiquen que cal anar amb compte amb les dades dels fragmentòmers obtinguts per a la Leu- $\delta 1$ i, per tant, en les anàlisis posteriors del metabolisme, caldrà no emprar els valors dels fragmentòmers d'aquest aminoàcid. D'altra banda, les diferències que s'observen pel que fa als fragmentòmers de la Phe i la Tyr són degudes a la desviació del valor correcte del fragmentòmer $f^{(2)}\{\text{Phe-}\beta\}$, que s'extén al valor de $f^{(2*)}\{\text{Phe-}\beta\}$. Quan siguin necessàries aquestes dades, caldrà emprar únicament els valors corresponents de la Tyr ($f^{(2*)}\{\text{Tyr-}\beta\}$ i $f^{(2*)}\{\text{Tyr-}\beta\}$).

Estudi més detallat d'alguns trets característics de les rutes de biosíntesi dels aminoàcids en llevats

La comprovació de les igualtats anteriors demostren que es compleix la hipòtesi realitzada sobre la validesa de les rutes de síntesi dels aminoàcids en *Saccharomyces cerevisiae* per al llevat *Pichia pastoris*. De la mateixa manera que s'ha realitzat per als cultius continus amb glicerina com a única font de carboni, donat que les rutes de síntesi en llevats presenten algunes característiques pròpies i diferenciades en comparació amb les cèl·lules procariotes, s'analitzaran aquestes amb més detall. Així, com s'ha dit anteriorment, les rutes de síntesi de la Lys i la Gly, en *Saccharomyces cerevisiae* es diferencien de les d'*Escherichia coli* i, a més, aquesta última es pot sintetitzar a partir de quatre rutes diferents, cosa també important d'analitzar.

La comprovació de les rutes de biosíntesi dels aminoàcids proteics en *Pichia pastoris* durant el creixement sobre glucosa queda realitzada, doncs, en l'apartat anterior (punt 4.5.2.3.1). Aquestes dades demostren que els aminoàcids es sintetitzen d'acord amb les rutes conegudes per al llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Jones, E.W. & Fink, G.R., 1982; Voet, D. & Voet, J.G., 1995; Michal G., 1998).

Tal com s'ha dit a l'apartat 4.3.3, la Ser es pot sintetitzar a partir de dues rutes diferents, és a dir, pot provenir del 3PG o bé de la Gly. Cal observar els trencaments en les molècules de Ser, ja que aquests indiquen la fracció d'aquestes molècules de Ser que es sintetitzen a partir de la Gly per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT).

La Ser es sintetitza a partir del 3PG, el patró de marcatge del qual és equivalent al del PEP i, per tant, es pot observar a través de la Phe i la Tyr. Com s'ha vist a l'apartat 4.3.3 dels resultats (en les cèl·lules creixent sobre glicerina), en les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa com a única font de carboni (a $D=0.16\text{h}^{-1}$) gairebé totes les molècules de 3PG tenen els enllaços de carboni conservats, és a dir, que provenen majoritàriament d'una mateixa molècula font de glucosa. Tot i així, i de la mateixa manera que succeïa en el cas de la glicerina, la fracció d'enllaços $C_{\beta}-C_{\alpha}-C'$ intactes en la Ser és menor, en aquest cas 0.47. El fet que aquests trencaments de la Ser no s'observin en les molècules de 3PG indiquen que la reacció des de la 3PG fins a la Ser no és reversible. D'altra banda, els trencaments observats en les molècules de Ser, indiquen que una fracció de les molècules de Ser es sintetitzen a partir de la Gly per la via de l'activitat inversa de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). La diferència entre les fraccions d'enllaços $C_{\beta}-C_{\alpha}$ trencats en la Ser i la Phe ($f^{(1)}\{\text{Ser-}\beta\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\beta\}$), indiquen que el 41% de les molècules de Ser estan trencades reversiblement per la via de la SHMT fins a Gly i una unitat C_1 .

	Fracció de molècules de Ser que es sintetitzen a partir de la Gly i una unitat C ₁ per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT)
Cultiu continu 100% glucosa	$f^{(1)}\{\text{Ser-}\beta\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\beta\}$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.47 - 0.06 = 0.41
Cultiu continu 100% glicerina	
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.45 - 0.03 = 0.42

Com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, els llevats poden usar quatre vies de biosíntesi per generar l'aminoàcid Gly. Les dues primeres corresponen al trencament de la Thr per la via de la threonina aldolasa i al trencament de la Ser per la via de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT).

És difícil elucidar quina és la contribució relativa d'aquestes dues possibles rutes, però es pot calcular quina és la fracció mínima de Gly que prové de la Ser de la mateixa manera que s'ha fet pels cultius amb glicerina com a única font de carboni.

	fracció d'enllaços C _α -C' intactes en Gly (via SHMT o threonina aldolasa)	fracció d'enllaços C _α -C' intactes en Ser	fracció d'enllaços C _α -C' intactes en Thr	fracció mínima de molècules de la Gly que provenen de la Ser (SHMT)
Cultiu continu 100% glucosa	$f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\}$	$[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Ser-}\alpha\}$	$[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}$	$\frac{f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\}}{[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}} - \frac{f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\}}{[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}}$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.83	0.83	0.75	0.08
Cultiu continu 100% glicerina				
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.92	0.97	0.82	0.10

Al contrari que en la ruta de la SHMT, i de la mateixa manera que ocorre en els cultius continus de *Pichia pastoris* amb glicerina com a única font de carboni, la reacció de trencament de la Thr per la via de la threonina aldolasa, en el cas que estigués present, semblaria irreversible en el cultiu amb glucosa com a única font de carboni, ja que els patrons de marcatge de la Thr i l'Asp són gairebé idèntics i el patró de l'Asp no pot provenir de la Thr perquè la síntesi de la Thr a partir de l'Asp és irreversible.

Com també s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, la Gly també es pot sintetitzar a partir d'una unitat C₁ i CO₂ per la via mitocondrial de la GCV (*Glycine Cleavage*). Aquesta reacció genera un augment relatiu en la fracció d'enllaços tallats C_α-C' en la Gly (és a dir, valors de $f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\}$ majors) donat que la mt-Gly és transportada al citosol on la major part de la proteïna cel·lular és generada (Maaheimo, H. *et al.*, 2001). En contrast amb els cultius continus amb glicerina com a única font de carboni, on la diferència entre la fracció d'enllaços C_α-C' trencats en la Gly i els corresponents enllaços de la Phe (és a dir, $f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\alpha\}$) era virtualment zero, en el cultiu amb glucosa, s'observa una diferència important entre aquestes dues fraccions, com s'observa a la següent taula:

	Síntesi de Gly per la via mitocondrial de la GCV (a partir d'una unitat C ₁ i CO ₂)
Cultiu continu 100% glucosa	$f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\alpha\}$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.17 - 0.03 = 0.14
Cultiu continu 100% glicerina	
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.08 - 0.03 = 0.05

Això significa que, en el cas del cultiu amb glucosa, hi ha evidència de l'acció reversible de la GCV mitocondrial, així com d'un flux significatiu de la mt-Gly cap al citosol en aquestes cèl·lules. En els cultius amb glicerina, en ambdues velocitats de dilució, es podia suposar, en canvi, que el flux de la mt-Gly cap al pool citosòlic era negligible o que l'activitat inversa de la GCV era baixa.

Com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, la mt-Gly juntament amb una unitat mt-C₁ (derivada de la mt-Gly per la via mitocondrial de la GCV), podria emprar-se per sintetitzar mt-Ser per la via mitocondrial de la SHMT. Aquesta reacció generaria un augment relatiu en la fracció de molècules de Ser amb tots els enllaços C_β-C_α-C' trencats ($f^{(1)}\{\text{Ser-}\alpha\}$), donat que la mt-Ser és transportada al citosol on la major part de la proteïna cel·lular és generada. El valor de $f^{(1)}\{\text{Ser-}\alpha\}$, el qual val 0.13 indica que, efectivament, això és així. Malgrat això, l'exportació de mt-Gly i la síntesi subsegüent de la Ser per la via de la SHMT citosòlica resultaria en el mateix patró de marcatge i és per aquest motiu que no es pot excloure ni tampoc donar per fet que la ruta mitocondrial de la SHMT estigui activa.

Finalment, els llevats poden sintetitzar també la Gly a partir dels intermedis del cicle TCA a través de la via de l'isocitrat liasa i de l'alanina glioxilat aminotransferasa, on el glioxilat es produeix a partir de l'isocitrat i és transaminat per donar Gly. Tot i que el patró de marcatge del glioxilat derivat del cyt-OAA es pot observar (a través dels patrons de marcatge de l'Asp), l'estratègia de marcatge emprada en aquest estudi no permet definir la possible contribució d'aquesta ruta a la síntesi de la Gly. No obstant, les dades obtingudes suggereixen que la ruta del glioxilat és molt baixa (veure més endavant) i per tant aquesta ruta de síntesi de la Gly probablement té molt poca importància

Pel que fa a l'apartat de biosíntesi dels aminoàcids, cal remarcar, per acabar, que en les cèl·lules crescudes sobre glucosa, el valor de $[f^{(2*)} + f^{(3)}]\{\text{Ala-}\alpha\} = 0.14 + 0.85 = 0.99$, és significativament major que el valor corresponent de $f^{(2*)}\{\text{Val-}\alpha\}$, 0.87 (taula 4.4.2-1). El valor de $f^{(2)}\{\text{Leu-}\delta 1\}$, 0.29, és menor que l'observat per a $f^{(2)}\{\text{Ala-}\beta\}$, 0.99, així com de la fracció d'enllaços C_β-C_α intactes en l'Ala observats a partir de l'Ala-α ($[f^{(2)} + f^{(3)}]\{\text{Ala-}\alpha\} = 0.14 + 0.85 = 0.99$), malgrat que tots aquests aminoàcids provinquin del Pyr. Però com ja s'ha dit a l'apartat anterior, els fragmentòmers trobats per a la Leu-δ1 no són correctes i per tant no s'han de tenir en compte. La primera observació, no obstant, podria indicar que hi ha altres rutes de síntesi per a la Val, o que existeixen diferents pools separats de Pyr dins de la mitocondria quan les cèl·lules de *Pichia pastoris* estan creixent sobre glucosa.

Metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* durant el creixement sobre glucosa en cultius continus

En el següent apartat s'estudiaran els paràmetres principals pel que fa al metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* creixent en glucosa com a única font de carboni, emprant com a referència l'anàlisi METAFoR realitzada per als cultius amb glicerina com a única font de carboni (punt 4.3.3).

Glicòlisi

Les cèl·lules estan creixent sobre glucosa (C6), la qual genera GAP (C3) i DHAP (C3), a través de la glicòlisi. Aquests últims acaben generant PEP, a través d'un conjunt de reaccions potencialment reversibles (figures Apèndix 6.8.1). Degut a això, els metabòlits que es troben en les reaccions entre el GAP, el DHAP i el PEP poden considerar-se que tenen el mateix patró de marcatge.

En aquest punt, doncs, és important l'observació del patró de marcatge del PEP (que es pot realitzar a través dels carbonis alifàtics dels aminoàcids Phe i Tyr) per observar si aquesta molècula prové majoritàriament d'una mateixa molècula de glucosa.

	Fragments de carbonis del PEP intactes (observació de Phe-α i Tyr-α)			
	$f^{(1)}$ tots els enllaços del PEP tallats	$f^{(2)}$ enllaços C ₂ -C ₃ del PEP conservat i C ₁ -C ₂ tallat	$f^{(2*)}$ enllaços C ₁ -C ₂ del PEP conservat i C ₂ -C ₃ tallat	$f^{(3)}$ tots els enllaços del PEP conservats
Cultiu continu 100% glucosa				
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.03 / 0.03	0.10 / 0.11	0.01 / 0.01	0.86 / 0.85
Cultiu continu 100% glicerina				
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.03 / 0.06	0 / 0	0 / 0.01	0.97 / 0.93

Com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, les reaccions des del GAP i la DHAP fins al PEP són potencialment reversibles, mentre que la formació de piruvat a partir del PEP és una reacció irreversible. Degut a això, només els metabòlits que es troben en les reaccions entre el GAP i la DHAP i el PEP poden considerar-se que tenen el mateix patró de marcatge. L'observació del patró de marcatge del PEP es pot realitzar a través dels carbonis alifàtics dels aminoàcids Phe i Tyr i, en aquest cas, es pot observar que, a diferència dels cultius amb glicerina, els valors de $f^{(3)}$ {Phe- α } i $f^{(3)}$ {Tyr- α } en el cultiu amb glucosa ja no són propers a 1, com ocorria amb el cultiu amb glicerina a la mateixa velocitat de dilució. Això significa que aquests aminoàcids i el PEP ja no provenen únicament d'una mateixa molècula font de glucosa, sinó que només ho fan el 85% d'aquestes. El trencament d'aquestes molècules pot ser degut a la presència de la ruta de la PPP.

Ruta de la pentosa fosfat

La ruta de la pentosa fosfat (PPP), com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, no es pot estudiar en els cultius continus amb glicerina com a única font de carboni. Però no és aquest el cas dels cultius amb glucosa (C6) com a única font de carboni.

La PPP té presents les dues branques, l'oxidativa i la no oxidativa. L'activitat anabòlica de la branca oxidativa podria observar-se directament a partir de la fracció de fragments C5 intactes de la glucosa en la R5P, la qual s'observa a través de la His (Szyperski T., 1995) (figura a l'Apèndix 6.8.2). Aquest patró de marcatge és possible únicament si la R5P s'origina a través de la ruta oxidativa de la PPP, ja que la branca oxidativa genera enllaços trencats, els corresponents a C_γ-C_β en la His. Així, una fracció mínima d'aproximadament el 34% de les molècules de R5P s'originen directament a partir de glucosa en *Pichia pastoris* ($f^{(3)}$ {His-β}) (figures 4.3.3-1 i 3.5.3-1 i Apèndix 6.8.2). D'aquesta manera, el 66% de les molècules de R5P provindran del GAP i la S7P per la reacció de la transcetolasa (via no oxidativa de la PPP) ($[f^{(1)}+f^{(2)}]$ {His-β}).

Tot i això, l'activitat inversa de la branca no oxidativa, la qual s'expressa per un flux significatiu des de F6P fins a E4P, catalitzada per la transcetolasa i l'intercanvi de fluxos catalitzada per la transaldolasa i la transcetolasa (Szyperski T., 1995), està al voltant del 21% (és a dir, aproximadament el 21% de les molècules d'E4P s'originen a partir de la F6P) ($f^{(2)}$ {Tyr-ε_x}).

En els cultius continus aeròbics de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa, la contribució relativa de la PPP en la generació de PEP (activitat catabòlica) en les cèl·lules de *Pichia pastoris* s'expressa com el límit màxim de molècules de PEP que provenen de com a mínim una reacció de la transcetolasa (Maaheimo H. *et al.*, 2001).

Rutes associades a intermedis del TCA

La gluconeogènesi des del cyt-OAA (observable a partir de l'Asp) per la via de la PEPCK es pot considerar absent. Una activitat significativa de la PEPCK generaria patrons de marcatge dels carbonis C₁-C₂-C₃ semblants entre els carbonis corresponents de les molècules de cyt-OAA i PEP.

Per al cyt-OAA, la fracció de molècules de que tenen *només* el seu enllaç C₂-C₃ trencat està al voltant de 0.13 i 0.16, com es pot comprovar a partir dels valors de $f^{(2*)}$ {Asp-α} i $f^{(2*)}$ {Thr-α}). No obstant, la fracció de molècules de PEP que tenen *només* el seu enllaç C₂-C₃ trencat és negligible, com es pot deduir a partir dels valors de $f^{(2*)}$ {Phe-α} i $f^{(2*)}$ {Tyr-α}, els quals valen tots dos 0.01. L'activitat de la PEPCK, si fos present, significaria unes quantitats relativament majors dels trencaments dels enllaços C₂-C₃ en el PEP que provindrien dels enllaços corresponents del cyt-OAA.

Es pot calcular la contribució de la PEPCK a partir de la següent equació:

$$X^{PEPCK} = f^{(2*)} \{Phe-\alpha, Tyr-\alpha\} / f^{(2*)} \{Asp-\alpha, Thr-\alpha\}$$

La qual es troba entre el 6.5 i el 7.7% per a aquest cultiu amb glucosa com a única font de carboni.

La fracció de mt-OAA que prové del PEP, per la via de l'acció conjunta de la reacció de la piruvat quinasa i la reacció anapleròtica de la piruvat carboxilasa es pot calcular de la següent equació, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats:

$$X^{\text{ana}} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP}) = [f^{(2)} + f^{(3)}] \{ \text{Glu-}\alpha \} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{ \text{Phe, Tyr-}\alpha \}$$

	Fracció de mt-OAA que prové del PEP $X^{\text{ana}} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP})$	
	càlcul amb Phe- α	càlcul amb Tyr- α
Cultiu continu 100% glucosa		
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.38	0.38
Cultiu continu 100% glicerina		
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.47	0.49

La fracció de mt-OAA que prové del PEP per la via anapleròtica de la piruvat carboxilasa en el cultiu de cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa es troba, doncs, al voltant del 38%.

La fracció de cyt-OAA que prové del PEP per la via de la carboxilació del cyt-Pyr, es pot calcular a partir de la següent equació, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats:

$$X_3^{\text{cyt}} = [f^{(2)} + f^{(3)}] \{ \text{Asp-}\alpha \}$$

	Fracció de cyt-OAA que prové del PEP (X_3^{cyt})	
	càlcul amb Asp- α	càlcul amb Thr- α
Cultiu continu 100% glucosa		
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.72	0.71
Cultiu continu 100% glicerina		
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.68	0.70

Tant en les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa com sobre glicerina, a la mateixa velocitat específica de creixement, mostren una mateixa fracció, entre el 68 i el 72%, de molècules de cyt-OAA que provenen del PEP (és a dir, del cyt-Pyr). A l'igual que en les cèl·lules crescudes amb glicerina, aquest fet pot ser el resultat o bé de l'activitat del cycle del glioxilat i/o de l'intercanvi intercompartimental entre els pools de cyt-OAA i mt-OAA (per exemple per la via del transportador d'OAA, o la llançadora del malat-aspartat o del succinat).

El flux d'intercanvi entre l'OAA i el fumarat es pot calcular a partir de la següent equació, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats:

Al citosol:

$$\text{cyt-}X^{\text{exch}} = X(\text{cyt-OAA} \leftrightarrow \text{fumarat}) = [2 * f^{(3)}] \{ \text{Asp-}\beta \} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{ \text{Asp-}\beta \}$$

A la mitocondria:

$$mt-X^{exch} = X(mt-OAA \leftrightarrow \text{fumarat}) = [2 * f^{(3)}] \{Glu-\alpha\} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Glu-\alpha\}$$

Cultiu continu 100% glucosa	Flux d'intercanvi entre l'OAA i el fumarat	
	al citosol <i>cyt-X^{exch}</i>	a la mitocondria <i>mt-X^{exch}</i>
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.01 (càlcul amb Thr) 0.05 (càlcul amb Asp)	0.35 (càlcul amb Pro) 0.54 (càlcul amb Glu)
Cultiu continu 100% glicerina		
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.09~0.12	0.26~0.61

Una fracció significativa del mt-OAA es converteix reversiblement, com a mínim una vegada, fins a fumarat en tots els cultius continus a $D 0.16 \text{ h}^{-1}$, amb glucosa i glicerina com a úniques fonts de carboni. A més, s'observa la mateixa tendència (valors del mateix ordre) tant en la mitocondria com en el citosol.

El cicle del glioxilat opera a nivells baixos en aquest cultiu continu amb glucosa com a substrat únic de creixement, igual com s'ha trobat per als cultius continus amb glicerina. Aquest fet s'ha comprovat, com s'ha realitzat pels cultius amb glicerina, comparant el patró de marcatge del Glu- α amb les corresponents abundàncies relatives teòriques dels fragments de carbonis intactes per al mt-OAA en absència d'activitat del cicle del glioxilat, tal i com es calcula a Maaheimo, H. *et al.* (2001). Tot i així, es va realitzar una anàlisi d'activitat de l'enzim ICL, que va confirmar aquests baixos nivells d'activitat enzimàtica ($0.018 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteïna). L'ICL també s'ha detectat, com a mínim a nivells basals, en cultius amb limitació per glucosa de *Saccharomyces cerevisiae* (Fernández E. *et al.*, 1993). Així doncs, aquestes observacions suggereixen que en els cultius de cèl·lules de llevats amb limitació per glucosa, així com en les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glicerina, el cicle del glioxilat està possiblement actiu a nivell basal.

L'activitat de l'enzim màlic es pot analitzar a partir de l'observació de les estructures fines de l'acoblament escalar ^{13}C - ^{13}C corresponents al carboni Ala- α , les quals indiquen que l'enllaç C₂-C₃ del piruvat es manté intacte. Això es pot deduir a partir de la fracció d'enllaços C α -C β intactes en l'Ala- α (és a dir, $[f^{(2)} + f^{(3)}] \{Ala-\alpha\}$) que és 0.99 (taula 4.4.2-1). No obstant, la fracció d'enllaços C α -C' trencats en l'Ala- α i la Val- α (és a dir, $[f^{(1)} + f^{(2)}] \{Ala-\alpha\}$ i $f^{(1)} \{Val-\alpha\}$) indiquen que una fracció de les molècules de piruvat (entre 13-14%) tenen l'enllaç C₁-C₂ tallat. Aquesta observació podria ser el resultat de l'acció de l'enzim màlic a nivells basals.

Cultiu continu 100% glucosa	Interconversió del mt-malat en mt-Pyr per la via de l'enzim màlic	
	$[f^{(1)} + f^{(2)}] \{Ala-\alpha\}$	$f^{(1)} \{Val-\alpha\}$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.14	0.13
Cultiu continu 100% glicerina		
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.08	0.05

La següent taula recull les dades estudiades en aquest apartat dels resultats:

Taula 4.4.3-1 Origen dels intermedis metabòlics del metabolisme central del carboni de cèl·lules de *Pichia pastoris* crescudes en glucosa com a única font de carboni obtinguts a partir de l'anàlisi del marcatge ^{13}C fraccional dels aminoàcids.

<u>Metabòlits</u>	Fracció del total del <i>pool</i> [%]
	Continu 100% glucosa $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$
<i>Citosol</i>	
P5P procedent de glucosa (límit mínim)	34
R5P procedent de G3P i S7P (reacció de la transcetolasa)	66
R5P procedent d'E4P (reaccions de la transcetolasa i transaldolasa)	21
PEP a partir de cyt-OAA (reacció de la PEPCK)	6~8
cyt-OAA a partir de cyt-Pyr (X_3^{cyt})	71~72
cyt-OAA convertit reversiblement a fumarat ($\text{cyt-}X^{\text{exch}}$)	1~5
<i>Mitocòndria</i>	
mt-Pyr a partir de malat (enzim màlic)	13~14
mt-OAA a partir de cyt-PEP (X^{mt})	38
mt-OAA convertit reversiblement a fumarat ($\text{mt-}X^{\text{exch}}$)	35~54
<i>Síntesi d'aminoàcids</i>	
Gly a partir de Ser	≥ 8
<i>Metabolisme C1</i>	
Ser a partir de Gly i una unitat C1	41
Gly a partir de CO_2 i una unitat C1	14

4.4.4. Comparació de les dades obtingudes per als cultius continus amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni i altres treballs realitzats prèviament

La següent taula resumeix els resultats obtinguts en els apartats anteriors pel que fa als cultius continus amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni. A més, aquestes dades es comparen amb les obtingudes en altres treballs de recerca (Fiaux, J. *et al.*, 2003) en els quals s'ha utilitzat la mateixa metodologia per a cultius continus de *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia stipitis* amb glucosa com a única font de carboni.

Taula 4.4.4-1. Origen dels intermedis metabòlics durant el creixement aeròbic de *Pichia pastoris* en cultius continus de glicerina o glucosa, i de *Pichia stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* en cultius continus de glucosa.

Metabòlits	Fracció del total del pool [%]				
	<i>P. pastoris</i>			<i>P. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	glicerina		glucosa	glucosa ^a	
<i>Citosol</i>	μ 0.05 h ⁻¹	μ 0.16 h ⁻¹	μ 0.16 h ⁻¹	μ 0.1 h ⁻¹	
PEP procedent de la ruta PPP (límit màxim)	n.d.	n.d.	n.d.	61	40
P5P procedent de glucosa (límit mínim)	n.d.	n.d.	34	28	41
R5P procedent de G3P i S7P (reacció de la transcetolasa)	n.d.	n.d.	66	72	59
R5P procedent d'E4P (reaccions de la transcetolasa i transaldolasa)	n.d.	n.d.	21	43	33
E4P procedent de F6P (límit mínim)	n.d.	n.d.	n.d.	27	6
PEP a partir de cyt-OAA (reacció de la PEPCK)	0~3	0~3	6~8	0~3	2
cyt-OAA a partir de cyt-Pyr (X_3^{cvt})	32~33	68~70	71~72	24	62
cyt-OAA convertit reversiblement a fumarat (<i>cyt-X^{exch}</i>) com a mínim una vegada	26.3~56.2	9.1~11.6	1~5	47	0-8
Mitochondria					
mt-Pyr a partir de malat	4~8	4~8	13~14	<7	<13
mt-OAA a partir de cyt-PEP (anaplerosis) (X^{ana})	32.3~33.3	47.4~49.5	38	32	31
mt-OAA convertit reversiblement a fumarat com a mínim una vegada, en el cicle TCA (<i>mt-X^{exch}</i>)	64.5	60.8	35-54	58	56
Síntesi d'aminoàcids					
Gly a partir de Ser	≥30	≥10	≥8	n.d.	n.d.
metabolisme C1					
Ser a partir de Gly i una unitat C1	43	43	41	n.d.	n.d.
Gly a partir de CO ₂ i una unitat C1	2	5	14	n.d.	n.d.

^a Dades extretes de la referència Fiaux, J. *et al.* (2003).
n.d. (valor no determinat)

Malgrat que no s'han trobat grans diferències entre les diferents espècies de llevats ni tampoc entre les diferents condicions de cultiu, aquests estudis del metabolisme han posat de manifest diferències significatives pel que fa a la distribució de les fraccions dels fluxos metabòlics, tant quan es comparen diferents espècies de llevats creixent sobre glucosa, com quan es comparen els cultius de *Pichia pastoris* sobre glicerina o glucosa. Tot i això, es pot considerar que les cèl·lules de *Pichia pastoris* es troben en estats fisiològics equivalents, és a dir, creixent a una velocitat específica de creixement

propera a la μ_{\max} , creixent en excés de substrat i amb metabolisme respiratori actiu. No obstant, no s'observa la mateixa equivalència entre les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* cultivades a concentracions limitants de substrat (i diferent relació C/N al medi d'alimentació) i a $D\ 0.1\text{h}^{-1}$, és a dir lluny de la μ_{\max} (Fiaux, J. *et al.*, 2003), tot i que sí que presenten metabolisme respiratori. En aquests casos, doncs, la comparació s'haurà de fer a nivell més qualitatiu.

Comparació de la distribució de les fraccions de fluxos del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* amb altres llevats durant el creixement sobre glucosa o glicerina en cultius continus.

L'anàlisi METAFoR del metabolisme central del carboni de *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia stipitis*, a partir del marcatge fraccional biosintèticament dirigit, ^{13}C -BDF, de cultius *batch* i continus a velocitat de dilució de 0.1h^{-1} , amb glucosa com a única font de carboni, la van dur a terme, com s'ha explicat, Fiaux, J. *et al.* (2003) i Maaheimo, H. *et al.* (2001).

Quan es comparen els cultius continus aerats de *Pichia pastoris*, *Pichia stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* creixent sobre glucosa a una velocitat específica de creixement i una composició del medi similars, s'observa el següent:

- La contribució relativa de la ruta PPP en la generació del PEP (activitat catabòlica) en les cèl·lules de *Pichia pastoris*, expressada com el límit màxim de les molècules de PEP que provenen, com a mínim, d'una reacció TK (transcetolasa) (Maaheimo, H. *et al.*, 2001) és molt similar a la que s'observa en *Saccharomyces cerevisiae*, però significativament menor que l'observada en *Pichia stipitis* (taula 4.4.4-1), a les mateixes condicions de creixement. Cal recordar la peculiaritat de *Pichia stipitis* com a organisme assimilador de xilosa (C5) (Fiaux, J. *et al.*, 2003).
- En tots els casos, la ruta PPP té les dues branques, tant l'oxidativa com la no oxidativa, presents. L'activitat anabòlica de la branca oxidativa es pot observar directament a partir de la fracció de fragments C5 intactes en les molècules de R5P, procedents de la glucosa (Szyperski T., 1995): un límit inferior o mínim d'aproximadament el 34% de les molècules de R5P s'originen directament a partir de la glucosa en *Pichia pastoris*, valor que és molt semblant al trobat per a *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia stipitis* (taula 4.4.4-1). Tot i així, l'activitat inversa de la branca no oxidativa, la qual implica un flux significatiu des de F6P fins a E4P catalitzat per la transcetolasa i l'intercanvi de fluxos catalitzat per la transaldolasa i la transcetolasa (Szyperski T., 1995), és significativament menor en *Pichia pastoris* (on al voltant del 21% de les molècules d'E4P provenen de F6P) que en *Pichia stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* (les fraccions corresponents de les quals són 43% i 33%, respectivament).
- La gluconeogènesi a partir del cyt-OAA per la via de la PEPCK sembla absent (al voltant de 0~8%), de la mateixa manera que ocorren en *Pichia stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* (taula 4.4.4-1).
- La fracció de mt-OAA que prové del PEP per la via anapleròtica de la piruvat carboxilasa en les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa (38%) és una mica superior als valors corresponents per als cultius dels altres llevats (que es

troben al voltant del 32-31%), però són clarament inferiors als valors trobats per a les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glicerina a la mateixa velocitat de dilució (48%) (taula 4.4.4-1).

- Les molècules de cyt-OAA, en els cultius continus de *Pichia pastoris* amb glicerina com a única font de carboni, no es deriven exclusivament del cyt-Pyr, com també s'observa en els cultius continus amb limitació per glucosa de *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia stipitis* (taula 4.4.4-1).
- Tant les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa i glicerina, com les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae*, mostren una fracció comparable de molècules de cyt-OAA que es deriven de cyt-Pyr (entre el 62-68%), mentre que els valors obtinguts per a les cèl·lules de *Pichia stipitis* són clarament inferiors, 24%. Com s'ha dit anteriorment, aquest fet pot ser el resultat de l'activitat de la ruta o cycle del glioxilat i/o de l'intercanvi intercompartimental entre els pools de cyt-OAA i mt-OAA (per exemple, per la via del transportador d'OAA i la llançadora malat-aspartat o la llançadora succinat-fumarat), en contrast amb l'observat en cultius en *batch* (Erlenmeyers) (Maaheimo H. *et al.*, 2001) on el flux del cyt-OAA cap a la mitocondria és unidireccional.
- De la mateixa manera, en tots els cultius, una fracció significativa de les molècules de cyt-OAA és convertida reversiblement, com a mínim una vegada, a fumarat. No obstant, cal remarcar que els valors de les fraccions de cyt-OAA que provenen del cyt-Pyr, així com els valors de les fraccions de cyt-OAA reversiblement convertit a fumarat, són variables (taula 4.4.4-1): aquests valors són relativament baixos en els casos de *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa o glicerina a la velocitat de dilució de 0.16 h⁻¹ (entre 1-12%), en contrast amb els valors majors que s'obtenen per als cultius de glucosa de *Pichia stipitis* (47%). Això podria explicar-se per les diferents contribucions relatives tant de l'intercanvi intercompartimental d'OAA, com de la ruta o cycle del glioxilat, depenent de cada organisme i de les condicions de cultiu.
- De la mateixa manera que s'observa per a les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glicerina i en les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia stipitis* en cultius continus amb limitació per glucosa, l'activitat del cycle del glioxilat en els cultius continus amb limitació per glucosa de *Pichia pastoris* sembla absent, malgrat l'observació de certa activitat basal d'ICL en els cultius de cèl·lules de *Pichia pastoris*.
- L'activitat de l'enzim màlic, mitocondrial, es troba a nivells basals en tots els cultius continus de *Pichia pastoris* (amb glicerina com a única font de carboni, per a ambdues velocitats de dilució, i amb glucosa com a única font de carboni), de manera molt similar als nivells baixos que es troben en els altres cultius continus amb limitació per glucosa de *Pichia stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest fet contrasta amb el rol pivotal del metabolisme del mt-Pyr que aquest mateix enzim màlic té en els cultius *batch* (és a dir, respiro-fermentatius) de *Saccharomyces cerevisiae* (Maaheimo, H. *et al.*, 2001).

De la mateixa manera com s'ha trobat per als casos de *Pichia stipitis* i *Saccharomyces cerevisiae* (Fiaux, J. *et al.*, 2003), les cèl·lules de *Pichia pastoris* exhibeixen un

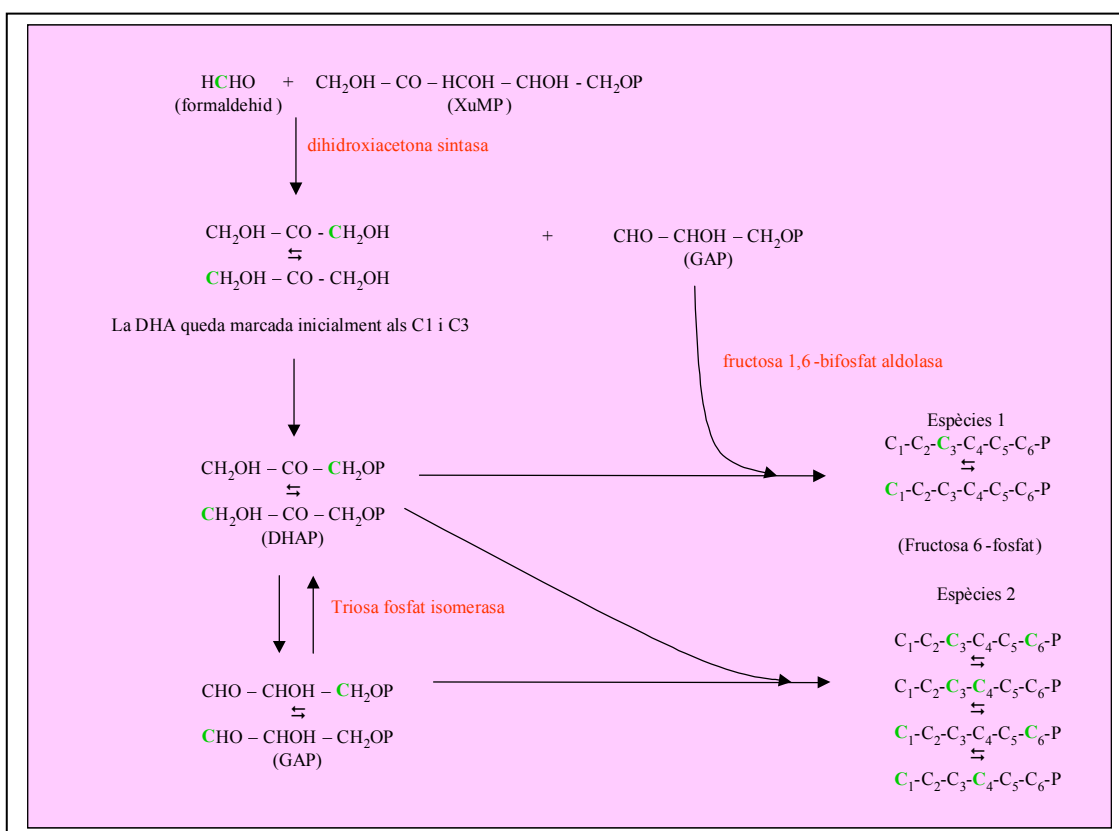
metabolisme predominantment respiratiu en els cultius continus aeròbis amb limitació per glucosa. Els resultats obtinguts en aquest treball indiquen que les rutes de biosíntesi dels aminoàcids en *Pichia pastoris* són idèntiques a les descrites per a *Saccharomyces cerevisiae*.

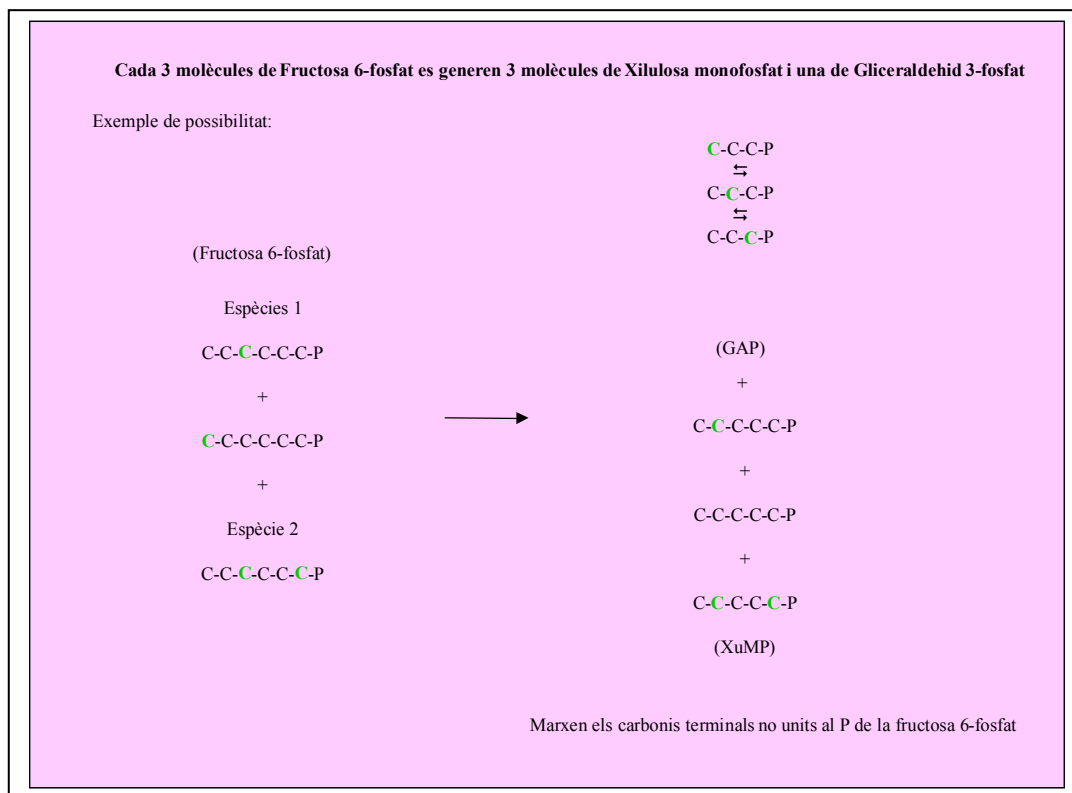
4.5 CULTIUS CONTINUS de *Pichia pastoris* AMB BARREJA DE GLICERINA I METANOL

En els cultius continus amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni (apartats 4.3 i 4.4 dels resultats) s'ha utilitzat el programa FCAL i el mètode METAFoR per a l'anàlisi del metabolisme central del carboni en *Pichia pastoris*. Aquests cultius, doncs, han servit per a realitzar una primera aproximació a l'aplicació d'aquest mètode en aquest organisme. Com s'ha explicat en els objectius, el present treball centra l'interès en l'estudi del metabolisme central del carboni quan hi ha assimilació simultània de dos substrats. En els cultius continus amb barreja de substrats, però, aquest mètode METAFoR no ha estat emprat encara. Per aquest motiu cal validar l'estratègia de marcatge abans de procedir a l'anàlisi de la informació obtinguda.

Així doncs, per poder dissenyar una estratègia de marcatge adequada, previ a la utilització del programa FCAL i del mètode METAFoR en els cultius amb barreja de glicerina i metanol, caldrà estudiar la incorporació del metanol al metabolisme cel·lular.

Waites *et al.* (1981) van estudiar el metabolisme del metanol (apartat 1.7 de la Introducció) en el llevat metilotròfic *Hansenula polymorpha* a partir del marcatge amb ^{14}C , és a dir, que s'estudia la incorporació al metabolisme del $[^{14}\text{C}]$ -metanol. L'anàlisi del ^{14}C realitzada per raigs X demostra que, com s'ha explicat a l'apartat de la Introducció mencionat, inicialment el carboni del metanol marcat es distribueix per la ruta metabòlica de la següent manera:





En els estudis dels cultius continus amb glicerina o glucosa com a única font de carboni (apartats 4.3 i 4.4), s'ha considerat que l'alimentació amb un cert percentatge d'aquesta glicerina o glucosa en forma de [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina o [$^{13}\text{C}_6$]-glucosa implicava que tots els carbonis de la xarxa metabòlica tindran la mateixa oportunitat o probabilitat d'aparèixer marcats amb ^{13}C , i d'aquí l'ús de la probabilitat P_1 com a grau de marcatge total (o probabilitat de marcatge total) de cada un dels carbonis observats en els aminoàcids (definició a l'aparat 6.1 de l'Apèndix).

El metanol entra a la xarxa de reaccions bioquímiques preferentment en unes posicions i no en unes altres a la vegada que s'assimila glicerina (una part de la qual serà [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina). Aquesta manera com el metanol es distribueix en les molècules de la xarxa metabòlica podria significar que no tots els carbonis d'aquestes molècules tenen la mateixa probabilitat que aquests provinguin d'una molècula de metanol, si hom es fixa en les primeres reaccions d'assimilació del metanol (figura 1.7.1-1 de la Introducció). Però una següent anàlisi de les rutes metabòliques que segueixen, com podria ser l'exemple de la segona figura d'aquest apartat, indicaria que això possiblement no és així, donat que el cicle de les xiloses monofosfat podria reequilibrar aquesta primera entrada preferent del metanol en els extrems de les molècules DHAP i GAP.

Així doncs, per a poder emprar el mètode METAFoR en els cultius amb barreja de glicerina i metanol, caldrà tenir en compte les dues hipòtesis anteriors. En aquest treball s'han proposat dues estratègies de marcatge per abordar la modificació del mètode emprat en els cultius amb glicerina o glucosa com única font de carboni.

- La primera estratègia de marcatge consisteix en marcar únicament la glicerina (és a dir, que un percentatge de la glicerina alimentada sigui [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina), mentre que el metanol alimentat contingui ^{13}C únicament a l'abundància natural.

La segona hipòtesi suposa que el metanol es distribueix aleatòriament per tota la xarxa metabòlica. Això significaria que tots els carbonis de tots els aminoàcids tindrien la mateixa probabilitat de provenir del metanol o no, de manera que, marcant únicament una proporció de la glicerina alimentada, la probabilitat total que un carboni qualsevol de qualsevol aminoàcid serà la mateixa, i només dependrà d'aquesta fracció de glicerina alimentada. Aquesta hipòtesi, però, s'haurà de comprovar, i per aquest motiu, caldrà determinar experimentalment el grau de marcatge de cada carboni de cada aminoàcid i assegurar que són equivalents. En el cas que resultés que la probabilitat P_1 depengui de cada carboni, és a dir, que no es compleix aquesta segona hipòtesi, una vegada determinats els graus de marcatge de cada carboni, les equacions de probabilitat es podrien aplicar per separat, introduint en cada cas el corresponent valor de P_1 .

Per dur a terme aquesta mesura del grau de marcatge total de cada carboni de cada aminoàcid, caldrà primer separar els diferents aminoàcids (provinents de la hidròlisi àcida de la proteïna cel·lular) per cromatografia d'HPLC, tal i com s'explica a l'apartat 3.4 dels Materials i Mètodes. Els experiments d'RMN que es duran a terme posteriorment per mesurar el grau de marcatge total de cada carboni s'expliquen als Materials i Mètodes.

Suposant que el grau de marcatge de cada carboni de cada aminoàcid fos igual, es podria dur a terme els experiments HSQC i l'anàlisi METAFoR posterior a partir de les dades obtingudes de l'FCAL, tal i com s'ha realitzat amb els cultius amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni. Aquests experiments d'RMN es van realitzar, però es fan servir, en aquest treball, únicament per trobar la distribució dels isotopòmers amb l'FCAL (veure esquema de treball de l'apartat 4.5.1.2 dels resultats).

Aquest serà el bloc de resultats 4.5.1.

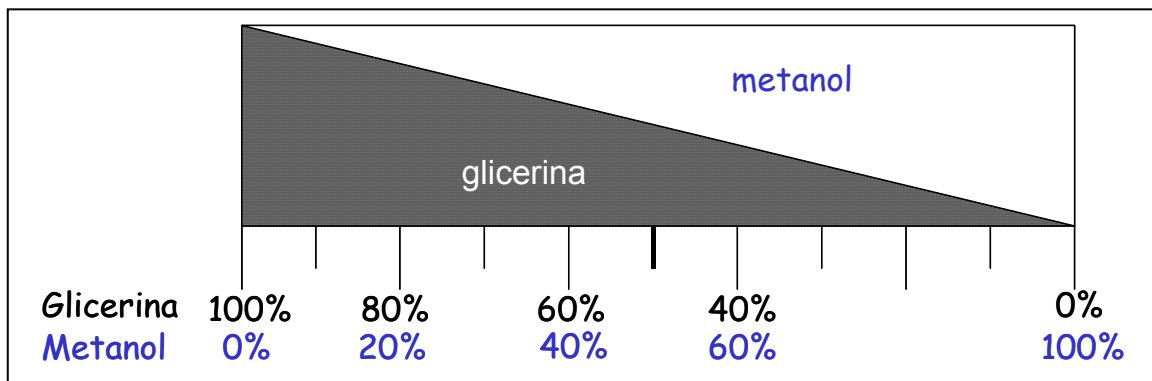
- La segona estratègia de marcatge consisteix en marcar simultàniament, i en la mateixa proporció, la glicerina i el metanol. És a dir, que un percentatge de la glicerina alimentada serà [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina mentre que el mateix percentatge de metanol alimentat serà [$^{13}\text{C}_1$]-metanol.

La primera hipòtesi suposa que el metanol no es distribueix aleatòriament per tota la xarxa metabòlica, és a dir, que tots els carbonis no tenen la mateixa probabilitat de provenir d'una molècula de metanol. Si això fos així, significaria que per aconseguir que grau de marcatge total de cada carboni sigui el mateix, és a dir, per aconseguir que la probabilitat P_1 sigui la mateixa per a cada carboni i, per tant, no depengui de cadascun d'ells, només cal que el metanol estigui marcat ([$^{13}\text{C}_1$]-metanol) en la mateixa proporció amb què la glicerina estigui marcada ([$^{13}\text{C}_3$]-glicerina). Si la hipòtesi vàlida fos la segona, però, on es suposa que el metanol es distribueix aleatòriament per tota la xarxa metabòlica, aquest doble marcatge no anul·laria el fet que tots els carbonis tinguessin el mateix grau de marcatge, de manera que aquesta estratègia de doble marcatge només suposaria una despesa innecessària pel que fa al consum de metanol marcat.

Així doncs, amb aquesta estratègia de marcatge ens assegurem que la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C és la mateixa per a qualsevol carboni de qualsevol aminoàcid. De manera que es podrà aplicar la mateixa metodologia dels cultius amb glicerina o glucosa com a úniques fonts de carboni (apartat 3.4 dels Materials i Mètodes). Així doncs, en aquest cas es podran aplicar directament les equacions de probabilitat del mètode METAFoR.

Aquest serà l'apartat 4.5.2 dels resultats.

Les mescles de glicerina i metanol que s'estudiaran al llarg d'aquest treball, des de l'apartat 4.3 (amb glicerina com a única font de carboni), fins a l'apartat 4.6 (on s'estudiaran els paràmetres fisiològics i es realitzarà un cultiu amb metanol com a única font de carboni) seran les següents:



4.5.1. Marcatge únic de la glicerina

4.5.1.1 Característiques dels cultius continus amb mescla de glicerina i metanol (amb marcatge únic de la glicerina)

Els cultius continus amb la soca X33-ROL es van dur a terme amb les condicions experimentals que ja s'han especificat als Materials i Mètodes.

De la mateixa manera que en els cultius amb glicerina com a única font de carboni, els cultius es van realitzar a dues velocitats de dilució diferents, D (definida com cabal volumètric/volum de treball), és a dir, a dues velocitats específiques de creixement, de 0.05h^{-1} i 0.16h^{-1} , respectivament. Després d'aproximadament cinc temps de residència, és a dir una vegada assolit l'estat estacionari (indicat pels valors constants de concentració de biomassa i substrat al reactor, i de producció de CO_2 , tal i com s'explica a la Introducció), es canvia l'aliment amb barreja de glicerina i metanol per un altre aliment, amb la mateixa proporció de mescla de glicerina i metanol, però en aquest cas un 12%, aproximadament, de la glicerina serà $[^{13}\text{C}_3]$ -glicerina.

Les barreges de substrats (glicerina i metanol) que es van dur a terme són les següents:

	Percentatge font de carboni (%) (pes/pes)		
	Continu 1	Continu 2	Continu 3
Glicerina	80	60	40
Metanol	20	40	60

La composició dels medis d'alimentació de cada cultiu continu va ser la que es presenta a continuació. Es varen fer mesures experimentals per comprovar aquests valors i en tots els casos la diferència o l'error experimental va ser menor o igual al 10%, segurament degut a petits canvis de volum del medi durant el procés d'autoclavat o esterilització i a l'error mateix de l'assaig per HPLC. D'altra banda, la relació del substrat marcat i no marcat es va pesar amb precisió.

CONTINU 1 (80% glicerina + 20% metanol)		
Tancs d'alimentació:	[metanol] (g/l)	[glicerina] (g/l)
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència de $\mu=0.05\text{h}^{-1}$)	2	8
Medi marcat (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final de $\mu=0.05\text{h}^{-1}$)	2	8 El 15% és $[^{13}\text{C}_3]$ -glicerina. Un 12% de la font de C està marcada.
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència de $\mu=0.16\text{h}^{-1}$)	2	8
Medi marcat (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final de $\mu=0.16\text{h}^{-1}$)	2	8 El 12% és $[^{13}\text{C}_3]$ -glicerina. Un 8.65% de la font de C està marcada.

CONTINU 2 (60% glicerina + 40% metanol)		
Tancs d'alimentació:	[metanol] (g/l)	[glicerina] (g/l)
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència, per ambdós velocitats de dilució)	4	6
Medi marcat (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final, per ambdós velocitats de dilució)	4	6 El 12% és [¹³ C ₃]-glicerina. Un 7.22% de la font de C està marcada.

CONTINU 3 (40% glicerina + 60% metanol)		
Tancs d'alimentació:	[metanol] (g/l)	[glicerina] (g/l)
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència de $\mu=0.05\text{h}^{-1}$)	6	4
Medi marcatge (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final de $\mu=0.05\text{h}^{-1}$)	6	2.8 (*) El 42.86% és [¹³ C ₃]-glicerina. Un 13.64% de la font de C està marcada.
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència de $\mu=0.16\text{h}^{-1}$)	6	4
Medi marcatge (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final de $\mu=0.16\text{h}^{-1}$)	6	2.8 (*) El 42.86% és [¹³ C ₃]-glicerina. Un 13.64% de la font de C està marcada.

(*) Per error de càlcul a l'hora de preparar el medi de cultiu aquesta va ser la concentració de glicerina en el tanc d'alimentació marcat. Això significa que al canviar el medi d'alimentació no marcat pel medi marcat, es trenca l'estat estacionari assolit durant els cinc primers temps de residència anteriors. Per aquest motiu, aquest cultiu continu no podrà ser analitzat amb la metodologia METAFoR utilitzada amb els altres dos cultius continus.

Per a aquest cultiu continu, al 40% de glicerina i 60% de metanol, les dades fisiològiques que es tindran en compte seran les que corresponen al punt anterior a l'inici del marcatge fraccional, és a dir, una vegada assolit l'estat estacionari després dels primers cinc temps de residència amb l'aliment no marcat. La validesa de les dades recollides amb els espectres de RMN es discutirà més endavant.

Els valors dels paràmetres mesurats a l'estat estacionari són els següents:

CONTINU 1 (80% glicerina + 20% metanol)					
Estat estacionari (punt presa mostra)	bio (g/l) i OD ₆₀₀	[gli] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Act. lipasa (U/ml)	Comp. elemental cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5 g/l 23.65 OD ₆₀₀	0.03	0	1.5	CH _{1.87} N _{0.128} S _{0.002} O _{0.553} (12.08% cendres)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.55 g/l 15.4 OD ₆₀₀	2.2	1.86	0.06	CH _{1.90} N _{0.146} S _{0.008} O _{0.610} (10.80% cendres)

CONTINU 2 (60% glicerina + 40% metanol)					
Estat estacionari (punt presa mostra)	bio (g/l) i OD ₆₀₀	[gli] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Act. lipasa (U/ml)	Comp. elemental cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	4.26 g/l 19.44 OD ₆₀₀	0	0	6.67	CH _{1.89} N _{0.139} S _{0.002} O _{0.626} (7.59% cendres)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.92 g/l 17.46 OD ₆₀₀	0.02	2.94	0.06	CH _{1.97} N _{0.143} S _{0.002} O _{0.719} (8.73% cendres)

CONTINU 3 (40% glicerina + 60% metanol)					
Estat estacionari (punt presa mostra)	bio (g/l) i OD ₆₀₀	[gli] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Act. lipasa (U/ml)	Comp. elemental cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	3.52 g/l 17.0 OD ₆₀₀	0	0.09	17.74	CH _{1.83} N _{0.148} S _{0.002} O _{0.620} (10.59% cendres)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	2.8 g/l 11.8 OD ₆₀₀	0	4.08	9.34	CH _{1.86} N _{0.140} S _{0.002} O _{0.629} (13.44% cendres)

4.5.1.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats

Dels tres cultius continus realitzats, amb barreges de glicerina i metanol que van des del 80% de glicerina fins al 40% d'aquesta, només s'ha realitzat l'anàlisi completa, tal i com es detallarà en aquest apartat, per a dos dels cultius: el cultiu amb 80% de glicerina i 20% de metanol, i el cultiu amb 40% de glicerina i 60% de metanol. En aquest últim cas, com ja s'ha explicat a l'apartat 4.5.1.1, degut a un error en la composició del medi marcat, no es podran aprofitar les dades de l'anàlisi METAFoR. D'altra banda, i donada la laboriositat de la metodologia emprada en aquests cultius amb barreja de substrats i marcatge únic de glicerina, que s'especifica més endavant, es va decidir primer validar aquesta metodologia per als dos cultius mencionats, per després aplicar-la, si es trobava convenient, al cultiu amb el 60% de glicerina i el 40% de metanol. Com es veurà més endavant, aquesta estratègia de marcatge s'ha descartat davant del doble marcatge simultani, tant de la glicerina com del metanol, i per tant, en aquest treball, no s'ha usat aquest tercer cultiu per a l'anàlisi METAFoR, sinó que únicament s'han usat les seves dades fisiològiques en el punt 4.7.

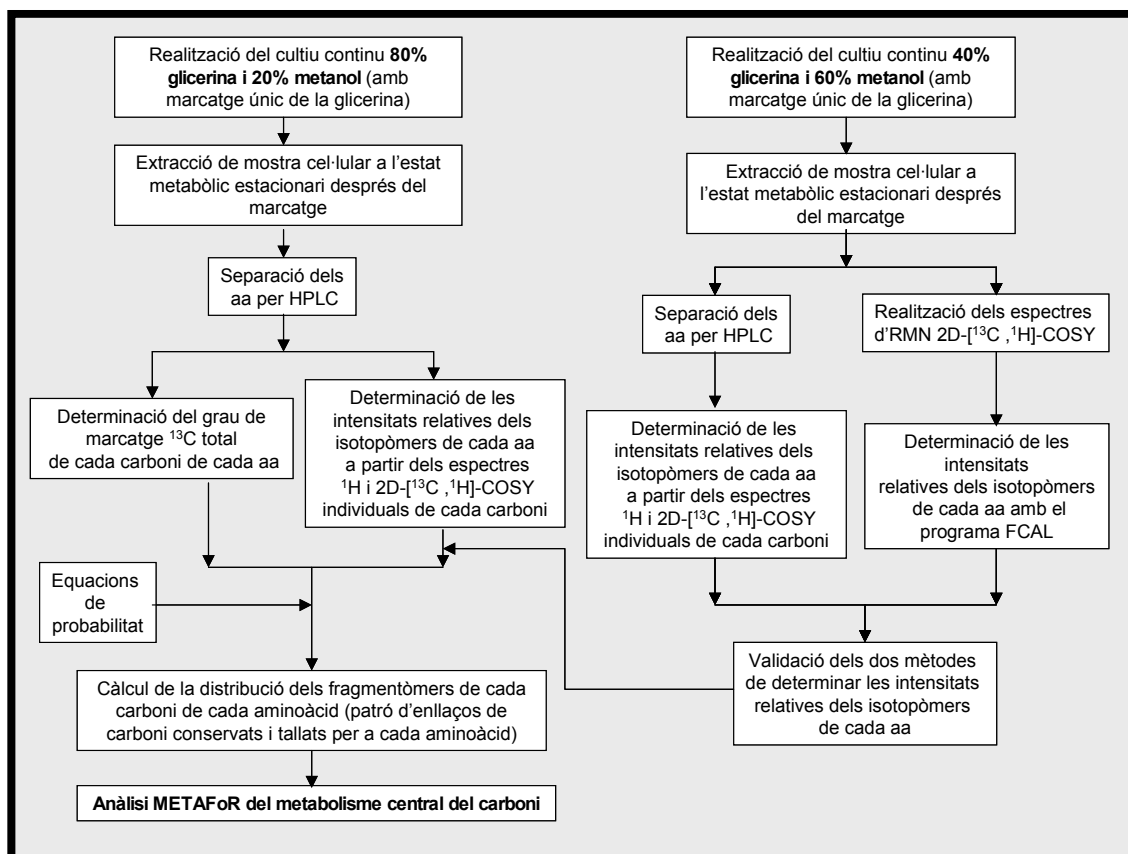
Així doncs, en aquest apartat dels resultats, es realitzarà la validació del mètode de marcatge únic de glicerina per al cultiu al 80% de glicerina i 20% de metanol, per decidir posteriorment si és convenient realitzar el mateix procediment amb la resta de cultius continus presentats a l'apartat 4.5.1.1. Si aquesta validació fos positiva, caldria validar, després, l'estratègia del doble marcatge de glicerina i metanol, per decidir finalment quina estratègia de marcatge és més recomanable.

L'estratègia analítica per a aquests cultius amb barreja de glicerina i metanol, però marcatge únic de la glicerina, consisteix en l'adaptació de la metodologia descrita en l'apartat 3.5.3 dels Materials i Mètodes, considerant que el canvi més important que es produeix és que el grau de marcatge total de cada carboni de cada aminoàcid no serà el

mateix (apartat 3.5.4 dels Materials i Mètodes). És a dir, que la probabilitat P_1 de les equacions de probabilitat, podrà ser diferent per a cada carboni de cada aminoàcid (la taula amb les equacions de probabilitat es troba a l'Apèndix 6.1).

Així doncs, el primer que cal és determinar aquest grau de marcatge per a cada un dels carbonis de cada aminoàcid. Per a aquest motiu, cal dur a terme la separació dels aminoàcids per HPLC que es troben en la mostra final del cultiu (després del temps de residència de marcatge), la qual es va dur a terme als laboratoris del VTT Biotechnology de Helsinki, Finlàndia, seguint la metodologia descrita a l'apartat 3.4 dels Materials i Mètodes. Una vegada separats els aminoàcids, es pot realitzar la mesura del grau de marcatge de cada un d'ells per RMN segons s'ha explicat als Materials i Mètodes. D'aquesta manera, s'hauran d'aplicar les equacions de probabilitat per a cada carboni per separat per tal de trobar la distribució dels fragmentòmers de cada carboni de cada aminoàcid, o el que és el mateix, per trobar el patró d'enllaços de carboni tallats i conservats de cada aminoàcid, a partir del qual es podrà dur a terme l'estudi del metabolisme central del carboni. Encara faltaria, però, per poder aplicar aquestes equacions de probabilitat, determinar la distribució de les intensitats relatives dels isotopòmers de cada carboni de cada aminoàcid. Aquesta mesura s'ha realitzat, en el cas del cultiu continu al 80% de glicerina i 20% de metanol a partir d'espectres ^1H i 2D- $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -COSY de les mostres dels aminoàcids separats per HPLC. Donat que en la resta del treball, concretament en els apartats 4.3, 4.4 i 4.5.2, la determinació d'aquestes distribucions s'ha realitzat emprant el programa FCAL, caldria realitzar una validació per determinar que els resultats trobats en ambdues metodologies és el mateix. Per dur a terme aquesta validació, s'han comparat les distribucions relatives d'isotopòmers trobades per al cultiu al 40% de glicerina i 60% de metanol seguint els dos procediments, ja que els espectres 2D- $[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]$ -COSY de les mostres (dels aminoàcids sense separar) del cultiu al 80% de glicerina i 20% de metanol no es van poder realitzar.

El resum de la metodologia que es segueix per als cultius continus al 80% de glicerina i 20% de metanol (amb el marcatge únic de la glicerina) juntament amb el resum del procediment que es du a terme en aquest apartat dels resultats es presenta en la figura 4.5.1.2-1:



Les fraccions cromatogràfiques resultants de la separació dels aminoàcids per HPLC de la mostra final del marcatge amb $[^{13}\text{C}_3]$ -glicerina del cultiu continu al 80% de glicerina i 20% de metanol, tant per a $\mu 0.05 \text{ h}^{-1}$ com per a $\mu 0.16 \text{ h}^{-1}$, van ser les següents:

Número de fracció	Aminoàcids presents	Aminoàcids presents en quantitat no suficient
1	Ser, Glu	-
2	Asp	-
3	Gly	-
4	Thr	-
5	Tyr	-
6	Ala	-
7	-	-
8	Pro	-
9	-	-
10	Val	-
11	-	-
12	-	Ile, Leu
13	Phe	-

Com es pot comprovar, hi ha aminoàcids que no apareixen en les fraccions recol·lectades, segurament com a conseqüència de l'ús de dietilèter per a la realització de l'extracció dels aminoàcids derivatitzats després de la seva separació per HPLC. L'ús

d'aquest solvent (de major polaritat que el pentà, que també es pot emprar per a realitzar aquesta extracció) provoca una pèrdua dels aminoàcids més hidrofòbics, com són l'histidina, l'ornitina i la lisina, que són alguns dels aminoàcids desapareguts en aquestes fraccions recol·lectades. Pel que fa a l'estabilitat dels aminoàcids després de la derivatització, cal comentar que l'únic aminoàcid que mostra un trencament important és la histidina, cosa que també podria haver provocat la pèrdua d'aquest aminoàcid. Aquesta metodologia de derivatització, doncs, s'hauria de revisar, ja que la histidina és un aminoàcid clau en la interpretació de la ruta de la pentosa fosfat.

Aquests resultats es van obtenir també per al cultiu al 60% de glicerina i 40% de metanol que es va separar posteriorment. Però degut a tots aquests inconvenients exposats, es va decidir no tirar endavant aquesta metodologia per al tercer cultiu que quedava, el corresponent al 60% de glicerina amb 40% de metanol. D'aquesta manera es va decidir comprovar la validació del mètode amb únicament dos dels cultius realitzats.

Posteriorment, tal com es resumeix a l'esquema de la figura 4.5.1.2-1, es va analitzar cada aminoàcid per separat emprant els experiments d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY, tal com s'explica als Materials i Mètodes, per a obtenir, finalment, els corresponents valors de marcatge total de cada un dels carbonis de cada aminoàcid. Cal remarcar que les mostres d'alguns aminoàcids es van fer malbé al llarg del procés experimental i, per tant, no es pot disposar de les seves anàlisis d'RMN. Els resultats es presenten a la següent taula 4.5.1.2-1:

Àtom de carboni (marcats per asterisc els carbonis ramificats)	Valors de P_1 (en %) per al cultiu continu al 80% de glicerina i 20% de metanol (amb marcatge únic de la glicerina)	
	μ 0.05 h $^{-1}$	μ 0.16 h $^{-1}$
Ala- α	11.9	15.3
Ala- β	11.9	13.1
Ala-COOH	10.5	12.7
Asp- α	10.1	12.6
Asp- β	13.4	14.8
Asp-COOH	4.2	5.4
Glu- α	17.6	9.2
Glu- β	21.4	10.8
Glu- γ	20.5	10.4
Glu-COOH	7.0	n.d.
Gly- α	8.4	7.5
Gly-COOH	8.4	5.8
Pro- α	9.7	7.8
Pro- β	14.1	13.2
Pro- γ	14.0	10.2
Pro- δ	13.9	11.7
Pro-COOH	5.2	3.1
Ser- α	11.1	4.6
Ser- β	12.7	5.4
Ser-COOH	9.9	n.d.
Thr- α	9.3	9.8
Thr- β	11.9	10.3
Thr- γ 2	8.1	7.7

Thr-COOH	9.3	4.1
Tyr- α	17.5	4.9
Tyr- β	22.7	5.9
* Tyr- γ	5.2	5.3
Tyr- δ_x	17.3	11.4
Tyr- ϵ_x	17.1	12.0
* Tyr- ζ	6.5	4.2
Tyr-COOH	2.7 (mètode DeGraaf)	4.4 (2.7 mètode DeGraaf)
Val- α	10.6	15.3
* Val- β	13.6	19.1
Val- γ_1	12.6	19.0
Val- γ_2	11.4	16.9
Val-COOH	9.2	12.2

Aquestes dades de grau de marcatge total de diferents carbonis de diferents aminoàcids permeten comprovar les hipòtesis realitzades anteriorment a la Introducció de l'apartat 4.5. La segona hipòtesi realitzada en aquest apartat suposava que el metanol entrava aleatòriament a la xarxa metabòlica, és a dir, que no entrava de manera preferent en unes o altres posicions. Aquesta hipòtesi significaria que tots els carbonis de tots els aminoàcids estarien marcats en la mateixa proporció en els experiments amb alimentació simultània de glicerina i metanol, on la glicerina fos l'única font de carboni marcada fraccionadament amb ^{13}C . Els resultats de la taula anterior, en canvi, anul·len aquesta segona hipòtesi, ja que mostren un grau de marcatge diferent per als diferents carbonis analitzats. Així, ara el que caldria seria comprovar la consistència d'aquests resultats per acabar d'assegurar aquesta afirmació.

Per a realitzar la comprovació de la consistència d'aquests resultats, caldria esperar que el grau de marcatge dels carbonis d'aminoàcids que es sintetitzen a partir d'un altre aminoàcid, fossin similars als carbonis d'aquest aminoàcid precursor. És a dir, els graus de marcatge dels carbonis de dos o més aminoàcids que provenen del mateix metabòlit intermedi precursor han de ser els mateixos.

En canvi, com es pot observar a partir dels resultats del grau de marcatge total determinats per al cultiu continu al 80% de glicerina i 20% de metanol, aquests resultats esperats no serien els obtinguts. És a dir que si s'analitzen dos aminoàcids que procedeixen del mateix precursor es troben diferents patrons de marcatge.

Aquest seria el cas, per exemple, de l'Asp i la Thr, o del Glu i la Pro (figures 4.3.3-1 i 4.3.3-2). Si ens fixem en les dades del cultiu continu amb 80% de glicerina i 20% de metanol a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$, per a l'Asp i la Thr, els quals es sintetitzen a partir del mateix precursor (OAA):

$$P_1 (\text{Asp-}\alpha) = 10.1$$

$$P_1 (\text{Asp-}\beta) = 13.4$$

$$P_1 (\text{Asp-COOH}) = 4.2$$

$$P_1 (\text{Thr-}\alpha) = 9.3$$

$$P_1 (\text{Thr-}\beta) = 11.9$$

$$P_1 (\text{Thr-COOH}) = 9.3$$

Mentre que per al Glu i la Pro, que també provenen del mateix precursor (OxGlu):

$$P_1 (\text{Glu-}\alpha) = 17.6$$

$$P_1 (\text{Glu-}\beta) = 21.4$$

$$P_1 (\text{Glu-}\gamma) = 20.5$$

$$P_1 (\text{Glu-COOH}) = 7.0$$

$$P_1 (\text{Pro-}\alpha) = 9.7$$

$$P_1 (\text{Pro-}\beta) = 14.1$$

$$P_1 (\text{Pro-}\gamma) = 14.0$$

$$P_1 (\text{Pro-COOH}) = 5.2$$

Per al mateix cultiu a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$,

$$P_1 (\text{Asp-}\alpha) = 12.6$$

$$P_1 (\text{Asp-}\beta) = 14.8$$

$$P_1 (\text{Asp-COOH}) = 5.4$$

$$P_1 (\text{Thr-}\alpha) = 9.8$$

$$P_1 (\text{Thr-}\beta) = 10.3$$

$$P_1 (\text{Thr-COOH}) = 4.1$$

Mentre que:

$$P_1 (\text{Glu-}\alpha) = 9.2$$

$$P_1 (\text{Glu-}\beta) = 10.8$$

$$P_1 (\text{Glu-}\gamma) = 10.4$$

$$P_1 (\text{Pro-}\alpha) = 7.8$$

$$P_1 (\text{Pro-}\beta) = 13.2$$

$$P_1 (\text{Pro-}\gamma) = 10.2$$

A partir de les diferències que s'observen entre algunes d'aquestes dades de marcatge es pot posar en dubte la seva equivalència, sobretot pel que fa al cultiu a baixa velocitat de dilució, ja que aquestes diferències serien superiors a les acceptables com a error experimental. Sembla, doncs, que aquest mètode de mesura del grau de marcatge total dels carbonis dels aminoàcids, P_1 , no és del tot correcte, malgrat que s'observa una tendència correcta en el grau de marcatge entre aminoàcids procedents del mateix precursor. En aquest cas, en què no es consideren del tot fiables les dades de P_1 , no es pot treure cap conclusió sobre les hipòtesis realitzades al principi d'aquest apartat de resultats 4.5, és a dir, que no es pot concloure si el metanol s'incorpora a la xarxa metabòlica de manera aleatòria o, contràriament, el metanol s'incorpora en unes posicions preferents i l'estudi de les dades de P_1 , és a dir, del grau de marcatge total de cada carboni de cada aminoàcid, per determinar quines són aquestes posicions d'entrada o d'incorporació preferent del metanol a la xarxa metabòlica, quedaria pendent per a futurs treballs. En el cas en què no es consideressin aquestes dades de P_1 com a vàlides, per tal de realitzar l'estudi del metabolisme central del carboni en cultius continus amb

alimentació simultània de glicerina i metanol, s'hauria d'emprar l'estratègia de doble marcatge, ja que aquesta és vàlida independentment de quina de les dues hipòtesis inicials es confirma. Per aquest motiu, l'estratègia del doble marcatge és la que s'ha escollit com a vàlida en aquest treball. Però tot i així, per acabar d'estudiar la validesa d'aquest mètode de determinació de P_1 , es pot realitzar la mateixa anàlisi anterior amb les dades del cultiu continu amb 40% de glicerina i 60% de metanol a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$:

La taula de dades de P_1 en aquest cas és la següent (taula 4.5.1.2-2):

Àtom de carboni (marcats per asterisc els carbonis ramificats)	Valors de P_1 (en %) per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de la glicerina)	
	$\mu 0.05 \text{ h}^{-1}$	$\mu 0.16 \text{ h}^{-1}$
Ala- α	11.9	25.9
Ala- β	12.4	26.4
Ala-COOH	n.d.	n.d.
Asp- α	n.d.	10.9
Asp- β	n.d.	14.0
Asp-COOH	n.d.	n.d.
Glu- α	7.2	17.3
Glu- β	9.4	21.4
Glu- γ	7.3	18.0
Glu-COOH	n.d.	n.d.
Gly- α	8.1	19.6
Gly-COOH	6.7	17.0
Pro- α	7.2	15.6
Pro- β	10.2	18.8
Pro- γ	9.1	18.4
Pro- δ	8.1	18.4
Pro-COOH	n.d.	n.d.
Ser- α	6.0	16.7
Ser- β	7.3	17.5
Ser-COOH	5.2	n.d.
Thr- α	5.6	18.8
Thr- β	6.5	20.5
Thr- γ_2	5.8	18.5
Thr-COOH	n.d.	15.4 (mètode DeGraaf 12.5)
Tyr- α	15.7	21.5
Tyr- β	16.4	19.6
* Tyr- γ	-	10.5
Tyr- δ_x	6.4	17.9
Tyr- ϵ_x	7.2	19.6
* Tyr- ξ	n.d.	9.1
Tyr-COOH	n.d.	19.7 (mètode DeGraaf 7.0)
Val- α	10.5	22.2
* Val- β	12.5	28.0
Val- γ_1	11.8	30.5
Val- γ_2	10.5	27.8
Val-COOH	n.d.	16.3 (mètode DeGraaf 12.9)

Així,

$$P_1 (\text{Glu-}\alpha) = 7.2$$

$$P_1 (\text{Glu-}\beta) = 9.4$$

$$P_1 (\text{Glu-}\gamma) = 7.3$$

$$P_1 (\text{Pro-}\alpha) = 7.2$$

$$P_1 (\text{Pro-}\beta) = 10.2$$

$$P_1 (\text{Pro-}\gamma) = 9.1$$

Aquestes dades es podrien considerar equivalents, o com a mínim segueixen una mateixa tenència, però si s'analitza el cultiu a elevada velocitat de dilució, aquestes equivalències no semblen tan correctes.

Per al mateix cultiu a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$,

$$P_1 (\text{Asp-}\alpha) = 10.9$$

$$P_1 (\text{Asp-}\beta) = 14.0$$

$$P_1 (\text{Thr-}\alpha) = 18.8$$

$$P_1 (\text{Thr-}\beta) = 20.5$$

Mentre que:

$$P_1 (\text{Glu-}\alpha) = 17.3$$

$$P_1 (\text{Glu-}\beta) = 21.4$$

$$P_1 (\text{Glu-}\gamma) = 18.0$$

$$P_1 (\text{Pro-}\alpha) = 15.6$$

$$P_1 (\text{Pro-}\beta) = 18.8$$

$$P_1 (\text{Pro-}\gamma) = 18.4$$

Donat que hi ha la possibilitat que aquestes dades de P_1 siguin efectivament vàlies, es procedirà al càlcul dels fragmentòmers, f , per a aquests cultius amb marcatge únic de la glicerina, per tenir més dades amb què poder concloure si la metodologia és vàlida o no. En aquest cas (doble alimentació de glicerina i metanol amb marcatge únic de la glicerina) el càlcul de cada un dels fragmentòmers s'ha de realitzar per a cada carboni de cada aminoàcid separatament, ja que el pas des del valor de les intensitats a fragmentòmers depèn de les equacions de probabilitat (Apèndix apartat 6.1), les quals, al seu torn, depenen del grau de marcatge total, P_1 , que en aquest cas anirà variant per a cada carboni, com s'ha vist més amunt.

Com s'ha resumit a la figura 4.5.2.1-1, per poder calcular aquests fragmentòmers per al cultiu al 80% de glicerina i 20% de metanol, a més dels valors de P_1 per a cadascun dels carbonis, és necessari disposar de la distribució relativa dels multiplets, és a dir, de la relació entre isotopòmers, per a cada carboni de cada aminoàcid. Per a aquest cultiu, aquestes dades s'han obtingut amb el mètode descrit a l'apartat 3.5.4 dels Materials i Mètodes. Donat que a la resta de cultius continus d'aquest treball l'obtenció d'aquestes dades sobre la distribució relativa dels isotopòmers s'ha dut a terme amb el programa

FCAL, primer caldrà comprovar que, efectivament, els resultats que s'obtenen amb ambdós mètodes és el mateix. Així, tal com es resumeix a l'esquema de la figura 4.5.2.1-1, aquesta comprovació es durà a terme amb les dades del cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de glicerina).

La distribució relativa de les intensitats dels multiplets trobades amb el programa FCAL per al cultiu continu amb 40% de glicerina i 60% de metanol (i marcatge únic de la glicerina) és la que es presenta en les següents taules:

Dades obtingudes amb el programa FCAL				
Àtom de carboni TERMINAL	Intensitat dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de la glicerina)			
	μ 0.05 h ⁻¹		μ 0.16 h ⁻¹	
	I_s	I_d	I_s	I_d
Ala- β	0.181	0.819	0.089	0.911
Gly- α	0.288	0.712	0.130	0.870
Pro- δ	0.278	0.722	0.133	0.867
Ser- β	0.446	0.554	0.249	0.751
Thr- γ 2	0.441	0.559	0.364	0.636
Val- γ 1	0.185	0.815	0.084	0.916
Val- γ 2	0.664	0.336	0.583	0.417

Dades obtingudes amb el programa FCAL						
Àtom de carboni CENTRAL en un fragment C3 amb igual constant d'acoblament	Intensitat dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de la glicerina)					
	μ 0.05 h ⁻¹			μ 0.16 h ⁻¹		
	I_s	I_d	I_t	I_s	I_d	I_t
Glu- β	0.40	0.47	0.13	0.20	0.52	0.28
Pro- β	0.33	0.46	0.21	0.17	0.50	0.33
Pro- γ	0.13	0.53	0.34	0.05	0.52	0.43
Thr- β	0.23	0.53	0.24	0.09	0.54	0.37
Tyr- δ_x	0.16	0.57	0.27	0.06	0.57	0.37
Tyr- ϵ_x	0.38	0.24	0.38	0.23	0.26	0.51

Dades obtingudes amb el programa FCAL								
Àtom de carboni CENTRAL en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament	Intensitat dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de la glicerina)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}
Ala- α	0.19	0.10	0.06	0.65	0.06	0.09	0.03	0.82
Asp- α	0.26	0.14	0.28	0.32	0.10	0.15	0.20	0.55
Asp- β	0.25	0.24	0.28	0.23	0.10	0.34	0.19	0.37
Glu- α	0.23	0.22	0.29	0.26	0.09	0.28	0.21	0.42
Glu- γ	0.13	0.0	0.59	0.28	0.05	0.0	0.57	0.38
Pro- α	0.25	0.23	0.27	0.25	0.11	0.27	0.21	0.41
Ser- α	0.22	0.03	0.29	0.45	0.08	0.01	0.24	0.67
Thr- α	0.25	0.14	0.27	0.34	0.10	0.15	0.19	0.56
Tyr- α	0.23	0.07	0.08	0.62	0.07	0.02	0.05	0.86
Tyr- β	0.18	0.58	0.0	0.24	0.06	0.59	0.0	0.35
Val- α	0.23	0.04	0.46	0.27	0.09	0.03	0.52	0.36

Nota: els carbonis carboxílics no apareixen als espectres 2D [^{13}C , ^1H]-COSY i per tant no es disposa dels valors de les intensitats per a aquests carbonis.

D'altra banda, la distribució relativa de les intensitats dels multiplets trobades a partir d'espectres de RMN ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY de cada una de les fraccions cromatogràfiques per al cultiu continu amb 40% de glicerina i 60% de metanol (i marcatge únic de la glicerina) és la que es presenta en les següents taules:

Dades obtingudes a partir d'espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY de les diferents fraccions cromatogràfiques				
Àtom de carboni TERMINAL	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de la glicerina)			
	μ 0.05 h $^{-1}$		μ 0.16 h $^{-1}$	
	I _s	I _d	I _s	I _d
Gly- α	0.17	0.83	0.13	0.87

Nota: no hi ha cap carboni α central en un fragment C3 amb igual constant d'acoblament.

Dades obtingudes a partir d'espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY de les diferents fraccions cromatogràfiques								
Àtom de carboni CENTRAL en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol (marcatge únic de la glicerina)							
	μ 0.05 h $^{-1}$				μ 0.16 h $^{-1}$			
	I _s	I _{da}	I _{db}	I _{dd}	I _s	I _{da}	I _{db}	I _{dd}
Ser- α	0.13	0	0.24	0.63	n.d.			
Thr- α	n.d.				0.08	0.10	0.17	0.65
Tyr- α	n.d.				0.08	0	0	0.92
Val- α	n.d.				0.26	0	0.74	0

Les taules comparatives de les dades anteriors són les següents:

Taula comparativa de la distribució relativa dels multiplets				
Àtom de carboni TERMINAL	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol a $\mu=0.16$ h $^{-1}$ (marcatge únic de la glicerina)			
	FCAL		espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY	
	I _s	I _d	I _s	I _d
Gly- α	0.13	0.87	0.13	0.87

Taula comparativa de la distribució relativa dels multiplets								
Àtom de carboni CENTRAL en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol a $\mu=0.16$ h $^{-1}$ (marcatge únic de la glicerina)							
	FCAL				espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY			
	I _s	I _{da}	I _{db}	I _{dd}	I _s	I _{da}	I _{db}	I _{dd}
Thr- α	0.10	0.15	0.19	0.56	0.08	0.10	0.17	0.65
Tyr- α	0.07	0.02	0.05	0.86	0.08	0	0	0.92
Val- α	0.09	0.03	0.52	0.36	0.26	0	0.74	0

Taula comparativa de la distribució relativa dels multiplets				
Àtom de carboni TERMINAL	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol a $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge únic de la glicerina)			
	FCAL		espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY	
	I_s	I_d	I_s	I_d
Gly- α	0.29	0.71	0.17	0.83

Taula comparativa de la distribució relativa dels multiplets								
Àtom de carboni CENTRAL en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 40% de glicerina i 60% de metanol a $\mu=0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge únic de la glicerina)							
	FCAL				espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}
Ser- α	0.22	0.03	0.29	0.45	0.13	0	0.24	0.63

Exceptuant algun cas puntual (Val- α), es pot considerar que aquestes dades són equivalents. Això significa que ambdós mètodes de determinació de la distribució relativa de les intensitats dels multiplets és correcta i proporcionen dades que es poden considerar equivalents.

Així, per al cultiu continu amb 80% de glicerina i 20% de metanol, aquesta distribució relativa de les intensitats dels isotopòmers és la que es mostra a la següent taula:

Dades obtingudes a partir d'espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY de les diferents fraccions cromatogràfiques				
Àtom de carboni TERMINAL	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 80% de glicerina i 20% de metanol (marcatge únic de la glicerina)			
	$\mu 0.05 \text{ h}^{-1}$		$\mu 0.16 \text{ h}^{-1}$	
	I_s	I_d	I_s	I_d
Gly- α	0	1	0.23	0.77

Nota: no hi ha cap carboni α central en un fragment C3 amb igual constant d'acoblament.

Dades obtingudes a partir d'espectres ^1H i 2D [^{13}C , ^1H]-COSY de les diferents fraccions cromatogràfiques								
Àtom de carboni CENTRAL en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament	Intensitats dels multiplets per al cultiu continu al 80% de glicerina i 20% de metanol (marcatge únic de la glicerina)							
	$\mu 0.05 \text{ h}^{-1}$				$\mu 0.16 \text{ h}^{-1}$			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}
Ala- α	0.12	0	0	0.88	0.17	0	0	0.83
Asp- α	0.15	0.43	0.42	0	0.57	0	0.43	0
Glu- α	0.23	0.37	0.40	0	n.d.			
Pro- α	0.22	0.24	0.24	0.30	0.33	0.27	0.40	0
Ser- α	0.11	0	0.26	0.63	n.d.			
Thr- α	0	0	0	1	0.58	0	0.42	0
Tyr- α			n.d.		0.10	0	0.15	0.75
Val- α	0.13	0	0.87	0	0.20	0	0.80	0

A partir de les intensitats dels multiplets anteriors, dels diferents P_1 anteriorment tabulats i de les altres probabilitats necessàries, que es presenten a la següent taula, es poden calcular els valors dels fragmentòmers d'interès, que es presenten més endavant.

Cultiu continu 80% glicerina + 20% metanol (marcatge únic de la glicerina)			
	P_n (%)	P_f (%)	F_m (%)
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	1.1	12.0	63.7
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	1.1	8.65	69.9

En aquests cultius continus amb alimentació simultània de glicerina i metanol, però amb marcatge únic de la glicerina, P_f es considera com el percentatge de marcatge ^{13}C sobre el total de la font de carboni (glicerina i metanol), ja que també F_m és el percentatge de medi marcat (glicerina i metanol) dins del bioreactor en el moment de prendre la mostra (Apèndix 6.2).

Abans de poder calcular els fragmentòmers cal calcular el valor de les constants de probabilitat per a cada carboni. Per exemple, per al carboni Asp- α (carboni central en un fragment C3 amb diferent constant d'acoblament) d'aquest cultiu continu amb 80% de glicerina i 20% de metanol a velocitat de dilució de 0.05 h^{-1} :

$$P_1 = 10.1 \% = 0.101 \text{ (taula 4.5.1.2-1)}$$

$$P_n = 1.1 \% = 0.011 \text{ (taula 4.5.1.2-1)}$$

$$P_f = 12.0 \% = 0.120 \text{ (taula 4.5.1.2-1)}$$

$$F_m = 0.637 \text{ (taula 4.5.1.2-1)}$$

àtom de carboni : Asp-α	K	Valor de les equacions (cultiu continu 80% glicerina i 20% metanol, marcatge únic de glicerina)	
central en un fragment C₃ (amb diferent constant d'acoblament)	K⁽¹⁾	$K^{(1)}_s = P_1 (1-P_1)^2 = 0.0816$	$K^{(1)}_{da} = P_1 P_1 (1-P_1) = 0.0092$
		$K^{(1)}_{db} = K^{(1)}_{da} = 0.0092$	$K^{(1)}_{dd} = P_1^3 = 0.0010$
	K^(2a)	$K^{(2a)}_s = (1-P_1)[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)] = 0.0090$	$K^{(2a)}_{da} = (1-P_1)[F_m P_f + (1-F_m)P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2] = 0.0688$
		$K^{(2a)}_{db} = P_1[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)] = 0.0010$	$K^{(2a)}_{dd} = P_1[F_m P_f + (1-F_m)P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2] = 0.0077$
	K^(2b)	$K^{(2b)}_s = K^{(2a)}_s = 0.0090$	$K^{(2b)}_{da} = K^{(2a)}_{db} = 0.0010$
		$K^{(2b)}_{db} = K^{(2a)}_{da} = 0.0688$	$K^{(2b)}_{dd} = K^{(2a)}_{dd} = 0.0077$
	K⁽³⁾	$K^{(3)}_s = (1-F_m)P_n(1-P_n)^2 + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)^2 = 0.0099$	$K^{(3)}_{da} = (1-F_m)P_n^2(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n^2(1-P_n) = 0.0001$
		$K^{(3)}_{db} = K^{(3)}_{da} = 0.0001$	$K^{(3)}_{dd} = F_m P_f + (1-F_m)P_n^3 + F_m(1-P_f)P_n^3 = 0.0764$

Per al càlcul dels fragmentòmers a partir de les intensitats relatives i de les constants de probabilitat es procedeix com s'explica en el següent exemple per al carboni Asp- α :

A partir dels espectres ^1H i $2\text{D}-[^{13}\text{C}, ^1\text{H}]\text{-COSY}$ (o del programa FCAL en altres casos) s'han obtingut les següents intensitats relatives del carboni Asp- α (taula de més amunt), $I_s = 0.15$, $I_{da} = 0.43$, $I_{db} = 0.42$, $I_{dd} = 0$, de manera que:

Per al senyal del sinlget,

$$I_s = f^{(1)} K_s^{(1)} + f^{(2)} K_s^{(2a)} + f^{(2*)} K_s^{(2b)} + f^{(3)} K_s^{(3)}$$

Per al senyal del doblet de menor constant d'acoblament,

$$I_{da} = f^{(1)} K_{da}^{(1)} + f^{(2)} K_{da}^{(2a)} + f^{(2*)} K_{da}^{(2b)} + f^{(3)} K_{da}^{(3)}$$

Per al senyal del doblet de major constant d'acoblament,

$$I_{db} = f^{(1)} K_{db}^{(1)} + f^{(2)} K_{db}^{(2a)} + f^{(2*)} K_{db}^{(2b)} + f^{(3)} K_{db}^{(3)}$$

Per al senyal del doblet de dobles,

$$I_{dd} = f^{(1)} K_{dd}^{(1)} + f^{(2)} K_{dd}^{(2a)} + f^{(2*)} K_{dd}^{(2b)} + f^{(3)} K_{dd}^{(3)}$$

Substituint els valors coneguts, queda:

Per al senyal del sinlget,

$$0.15 = 0.0816 f^{(1)} + 0.0090 f^{(2)} + 0.0090 f^{(2*)} + 0.0099 f^{(3)}$$

Per al senyal del doblet de menor constant d'acoblament,

$$0.43 = 0.0092 f^{(1)} + 0.0688 f^{(2)} + 0.0010 f^{(2*)} + 0.0001 f^{(3)}$$

Per al senyal del doblet de major constant d'acoblament,

$$0.42 = 0.0092 f^{(1)} + 0.0010 f^{(2)} + 0.0688 f^{(2*)} + 0.0001 f^{(3)}$$

Per al senyal del doblet de dobles,

$$0 = 0.0010 f^{(1)} + 0.0077 f^{(2)} + 0.0077 f^{(2*)} + 0.0764 f^{(3)}$$

Per trobar el valor dels respectius fragmentòmers només cal resoldre aquest sistema d'equacions lineals de quatre equacions amb quatre incògnites (per exemple amb el programa Matlab de l'Apèndix 6.7, *tesiequak.m*). Els resultats són els següents:

$$f^{(1)} = 0.66183374693732$$

$$f^{(2)} = 6.07708450035152$$

$$f^{(2*)} = 5.92959187498279$$

$$f^{(3)} = -1.21875970990853$$

Els fragmentòmers anteriors haurien de sumar 1 però en canvi sumen 11.44975041236311, però es poden normalitzar les dades:

$$f^{(1)} = 0.05780333396811$$

$$f^{(2)} = 0.53076130758184$$

$$f^{(2*)} = 0.51787957478795$$

$$f^{(3)} = -0.10644421633790$$

Considerant que existeix la restricció que els valors dels fragmentòmers no poden ser negatius, els resultats serien els següents:

$$f^{(1)} = 0.66183374693732$$

$$f^{(2)} = 6.07708450035152$$

$$f^{(2*)} = 5.92959187498279$$

$$f^{(3)} = 0$$

Els fragmentòmers anteriors haurien de sumar 1 però en canvi sumen 12.66851012227164, però es poden normalitzar les dades:

$$f^{(1)} = 0.05224242950036$$

$$f^{(2)} = 0.47970001536864$$

$$f^{(2*)} = 0.46805755513100$$

$$f^{(3)} = 0$$

Si considerem únicament 3 decimals:

$$f^{(1)} = 0.052$$

$$f^{(2)} = 0.480$$

$$f^{(2*)} = 0.468$$

$$f^{(3)} = 0$$

L'altra possibilitat per obtenir els fragmentòmers en tant per u és normalitzar les equacions de probabilitat. Això significa dividir entre P_1 totes les constants K , de manera que, els valors de les equacions normalitzades seran:

àtom de carboni : Asp- α	K	Valor de les equacions (normalitzades per a P_1) (cultiu continu 80% glicerina i 20% metanol, marcatge únic de glicerina)	
central en un fragment C_3 (amb diferent constant d'acoblament)	$K^{(1)}$	$K^{(1)}_S = 0.8082$	$K^{(1)}_{da} = 0.0908$
		$K^{(1)}_{db} = K^{(1)}_{da} = 0.0908$	$K^{(1)}_{dd} = 0.0102$
	$K^{(2a)}$	$K^{(2a)}_S = 0.0894$	$K^{(2a)}_{da} = 0.6814$
		$K^{(2a)}_{db} = 0.0100$	$K^{(2a)}_{dd} = 0.0765$
	$K^{(2b)}$	$K^{(2b)}_S = K^{(2a)}_S = 0.0894$	$K^{(2b)}_{da} = K^{(2a)}_{db} = 0.0100$
		$K^{(2b)}_{db} = K^{(2a)}_{da} = 0.6814$	$K^{(2b)}_{dd} = K^{(2a)}_{dd} = 0.0765$
	$K^{(3)}$	$K^{(3)}_S = 0.0984$	$K^{(3)}_{da} = 0.0011$
		$K^{(3)}_{db} = K^{(3)}_{da} = 0.0011$	$K^{(3)}_{dd} = 0.7568$

A partir del programa FCAL s'han obtingut les següents intensitats relatives del carboni Asp- α (taula de més amunt), $I_S = 0.15$, $I_{da} = 0.43$, $I_{db} = 0.42$, $I_{dd} = 0$, de manera que:

Per al senyal del sinllet,

$$I_S = f^{(1)} K^{(1)}_S + f^{(2)} K^{(2a)}_S + f^{(2*)} K^{(2b)}_S + f^{(3)} K^{(3)}_S$$

Per al senyal del doblet de menor constant d'acoblament,

$$I_{da} = f^{(1)} K^{(1)}_{da} + f^{(2)} K^{(2a)}_{da} + f^{(2*)} K^{(2b)}_{da} + f^{(3)} K^{(3)}_{da}$$

Per al senyal del doblet de major constant d'acoblament,

$$I_{db} = f^{(1)} K^{(1)}_{db} + f^{(2)} K^{(2a)}_{db} + f^{(2*)} K^{(2b)}_{db} + f^{(3)} K^{(3)}_{db}$$

Per al senyal del doblet de dobles,
 $I_{dd} = f^{(1)} K_{dd}^{(1)} + f^{(2)} K_{dd}^{(2a)} + f^{(2*)} K_{dd}^{(2b)} + f^{(3)} K_{dd}^{(3)}$

Substituint els valors coneguts, queda:

Per al senyal del sinlget,
 $0.15 = 0.8082 f^{(1)} + 0.0894 f^{(2)} + 0.0894 f^{(2*)} + 0.0984 f^{(3)}$
 Per al senyal del doblet de menor constant d'acoblament,
 $0.43 = 0.0908 f^{(1)} + 0.6814 f^{(2)} + 0.0100 f^{(2*)} + 0.0011 f^{(3)}$
 Per al senyal del doblet de major constant d'acoblament,
 $0.42 = 0.0908 f^{(1)} + 0.0100 f^{(2)} + 0.6814 f^{(2*)} + 0.0011 f^{(3)}$
 Per al senyal del doblet de dobles,
 $0 = 0.0102 f^{(1)} + 0.0765 f^{(2)} + 0.0765 f^{(2*)} + 0.7568 f^{(3)}$

Per trobar el valor dels respectius fragmentòmers només cal resoldre aquest sistema d'equacions lineals de quatre equacions amb quatre incògnites (per exemple amb el mateix programa Matlab anterior):

$$\begin{aligned} f^{(1)} &= 0.057555196 \\ f^{(2)} &= 0.531126522 \\ f^{(2*)} &= 0.518232532 \\ f^{(3)} &= 0 \end{aligned}$$

La suma dels quatre fragmentòmers és 1.10691425. Si es recalculen els números perquè sumin exactament 1, el resultat és:

$$\begin{aligned} f^{(1)} &= 0.051996074 \\ f^{(2)} &= 0.479826258 \\ f^{(2*)} &= 0.468177668 \\ f^{(3)} &= 0 \end{aligned}$$

Amb només tres decimals,

$$\begin{aligned} f^{(1)} &= 0.052 \\ f^{(2)} &= 0.480 \\ f^{(2*)} &= 0.468 \\ f^{(3)} &= 0 \end{aligned}$$

Aquests resultats són els mateixos que els que s'han trobat amb les K no normalitzades a priori.

Un mètode de validació d'aquests càlculs podria consistir en realitzar aquest mateix càlcul per al carboni Asp- β del mateix cultiu i comprovar si els fragmentòmers es corresponen amb els trobats per al carboni Asp- α . Això seria, comprovar si $[f^{(1)} + f^{(2*)}] \{Asp-\alpha\} = [f^{(1)} + f^{(2*)}] \{Asp-\beta\}$ i si, simultàniament, $[f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\alpha\} = [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\beta\}$. El problema és que no es disposa de les dades per al carboni Asp- β , de manera que aquesta anàlisi quedaria pendent.

Emprant el procediment anterior per a cada un dels carbonis, s'han obtingut els valors dels fragmentòmers per a les diferents velocitats de dilució que es mostren a les següents taules:

Taula 4.5.1.2-3. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics per al cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (marcatge únic de la glicerina).

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (amb marcatge únic de la glicerina)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.006	0	0	0.994	0.022	0	0	0.978
Asp- α	0.052	0.480	0.468	0	0.452	0	0.548	0
Glu- α	0.110	0.425	0.465	0		-		
Gly- α	0	1	-	-	0.104	0.896	-	-
Pro- α	0.143	0.284	0.284	0.289	0.241	0.299	0.460	0
Ser- α	0	0	0.327	0.673		n.d.		
Thr- α	0	0.013	0.013	0.974	0.503	0	0.497	0
Tyr- α		n.d.			0	0	0.176	0.824
Val- α	0.029	0	0.971	0	0.055	0	0.945	0

4.5.1.3. Anàlisi METAFoR dels resultats

En aquest apartat es farà la comprovació de la consistència dels resultats trobats per als fragmentòmers del cultiu al 80% de glicerina i 20% de metanol amb marcatge únic de glicerina. Com s'ha explicat a l'apartat anterior, els resultats obtinguts del marcatge total de cada un dels carbonis en aquest cultiu no ha donat resultats massa fiables. A més, els valors de les intensitats relatives de cada isotopòmer o multiplet, semblen dependre del mètode amb què aquestes es determinen, cosa que genera precaució pel que fa a la fiabilitat també d'aquests resultats. Tot i així, s'ha procedit al càlcul dels fragmentòmers corresponents, tal i com s'ha detallat a l'apartat anterior, perquè a partir de les rutes de síntesi dels aminoàcids conegudes d'aquests a priori (apartat 1.7 de la Introducció) es poden establir uns valors de control (apartat 4.3.3 dels Resultats), que ajudaran a acabar de determinar la validesa o no de la metodologia utilitzada. A més, s'ha considerat interessant establir el protocol a seguir pel que fa al càlcul dels fragmentòmers en aquells cultius amb alimentació simultània de glicerina i metanol on només la primera ha estat marcada fraccionalment.

Així, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels Resultats, donades les rutes de síntesi dels aminoàcids, hi ha uns fragmentòmers i unes relacions entre aquests que seran coneguts a priori, que són els següents:

Comprovació dels valors de fragmentòmers coneguts a priori

En aquest cas només es disposa de dades dels carbonis α , així:

$$f^{(2)} \{\text{Val-}\alpha\} = f^{(3)} \{\text{Val-}\alpha\} = 0$$

Àtom de carboni	Cultiu continu 80% glicerina + 20% metanol (marcatge únic de la glicerina)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Val- α	0.029	0	0.971	0	0.055	0	0.945	0

No es poden treure gaires conclusions amb una sola dada, però en tot cas, aquest resultat sembla coherent amb la ruta de síntesi de la Val, de manera que els fragmentòmers obtinguts per a aquest aminoàcid serien correctes.

Comprovació de les relacions entre fragmentòmers conegudes a priori

Per als fragmentòmers de què es disposa de dades:

$$f^{(3)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2*)} \{Ala-\alpha\} = f^{(2*)} \{Val-\alpha\} \quad \text{ja que } f^{(2)} \{Val-\alpha\} = 0$$

$$f^{(1)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2)} \{Ala-\alpha\} = f^{(1)} \{Val-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\}$$

$$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Thr-\alpha\} + f^{(3)} \{Thr-\alpha\}$$

$$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Met-\alpha\} + f^{(3)} \{Met-\alpha\}$$

$$f^{(i)} \{Glu-\alpha\} = f^{(i)} \{Pro-\alpha\}$$

$$f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} = f^{(1)} \{Pro-\alpha\} + f^{(2*)} \{Pro-\alpha\}$$

Així,

IGUALTAT	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$			$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		
	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error
$f^{(3)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2*)} \{Ala-\alpha\} = f^{(2*)} \{Val-\alpha\}$	0.994 + 0 = 0.994	0.971	2.3	0.978 + 0 = 0.978	0.945	3.3
$f^{(1)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2)} \{Ala-\alpha\} = f^{(1)} \{Val-\alpha\}$	0.006 + 0 = 0.006	0.029	2.3	0.022 + 0 = 0.022	0.055	7.7
$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\}$	0.052	0	5.2	0.452	0.503	5.1
	0.480	0.013	46.7	0	0	0
	0.468	0.013	45.5	0.548	0.497	5.1
	0	0.974	97.4	0	0	0
$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Thr-\alpha\} + f^{(3)} \{Thr-\alpha\}$	0.468 + 0 = 0.468	0.013 + 0.974 = 0.987	51.9	0.548 + 0 = 0.548	0.497 + 0 = 0.497	5.2
$f^{(i)} \{Glu-\alpha\} = f^{(i)} \{Pro-\alpha\}$	0.110	0.143	3.3	n.d.	0.241	-
	0.425	0.284	14.1			
	0.465	0.284	18.1			
	0	0.289	28.9			
$f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} = f^{(1)} \{Pro-\alpha\} + f^{(2*)} \{Pro-\alpha\}$	0.110 + 0.465 = 0.575	0.143 + 0.284 = 0.427	14.8	n.d.	0.241 + 0.460 = 0.701	-

Com en les altres taules comparatives d'aquestes igualtats, el càlcul de l'error s'ha fet de la següent manera:

$$\% \text{ error} = 100 \cdot |(1^{\text{er}} \text{ terme} - 2^{\text{on}} \text{ terme})|$$

Si es considera que el màxim error acceptable està al voltant del 10%, s'observa que hi ha problemes només en el cultiu a baixa velocitat de dilució i que en aquest cas, aquests es concentren en un parell d'aminoàcids. La major part de les igualtats es compleixen i, per tant, sembla que els resultats són correctes i que els errors s'haurien comès només pel que fa a aquests aminoàcids. Malgrat això, la pèrdua de dades de molts aminoàcids no permet extreure conclusions gaire fiables. Amb les dades de què es disposa, doncs, es podria considerar que aquests resultats validen la metodologia emprada per al càlcul del grau de marcatge total dels carbonis individuals i de la distribució de les intensitats relatives dels multiplets, que en aquest cas només s'hauria aplicat correctament en el cas del cultiu continu a elevada velocitat de dilució (80% glicerina i 20% metanol).

Malgrat tot, i com s'ha explicat anteriorment, s'ha escollit la metodologia del doble marcatge, de la glicerina i el metanol simultàniament, per realitzar finalment l'estudi del metabolisme central del carboni amb la metodologia METAFoR, ja que en aquest cas no és necessari saber quina és la manera com el metanol s'incorpora a la xarxa metabòlica.

4.5.2. Marcatge simultani de la glicerina i el metanol

4.5.2.1. Característiques dels cultius continus realitzats amb mescla de glicerina i metanol (amb marcatge doble, de la glicerina i el metanol)

Els cultius continus amb la soca X33-ROL (Mut⁺) es van dur a terme com ja s'ha especificat a l'apartat 3.2.2 dels Materials i Mètodes.

Com en els cultius amb glicerina com a única font de carboni, els cultius es van realitzar a dues velocitats de dilució diferents, D (definida com cabal volumètric/volum de treball), és a dir, a dues velocitats específiques de creixement, de 0.05h⁻¹ i 0.16h⁻¹, respectivament.

Les barreges de substrats (glicerina i metanol) que es van dur a terme són les següents:

	Percentatge font de carboni (%) (pes/pes)		
	Continu 1	Continu 2	Continu 3
Glicerina	80	60	40
Metanol	20	40	60

El cultiu continu 3 el va realitzar en Juan Bastida (Universidad Católica de Valparaíso, Xile), en una estada d'estudi per a realitzar el projecte final de carrera d'Enginyeria Bioquímica.

La composició dels medis d'alimentació de cada cultiu continu va ser la següent. Es varen fer mesures experimentals per comprovar aquests valors i en tots els casos la diferència o l'error experimental va ser menor o igual al 10%, segurament degut a petits canvis de volum del medi durant el procés d'autoclavat o esterilització i a l'error mateix de l'assaig per HPLC. D'altra banda, la relació del substrat marcat i no marcat es va pesar amb precisió.

CONTINU 1 (80% glicerina + 20% metanol)		
Tancs d'alimentació:	[metanol] (g/l)	[glicerina] (g/l)
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència)	2	8
Medi marcat (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final)	2	8 (12.5% del metanol és ¹³ C-metanol i 13.5% de la glicerina és [¹³ C ₃]-glicerina)

En aquest cas es va considerar un marcatge de la font de carboni de 13% (P_f) per al càlcul de les probabilitats en el programa FCAL.

CONTINU 2 (60% glicerina + 40% metanol)		
Tancs d'alimentació:	[metanol] (g/l)	[glicerina] (g/l)
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència)	4	6
Medi marcat (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final)	4	4 (12.5% del metanol és ¹³ C-metanol i 13.5% de la glicerina és [¹³ C ₃]-glicerina)

En aquest cas es va considerar un marcatge de la font de carboni de 13% (P_f) per al càlcul de les probabilitats en el programa FCAL.

CONTINU 3 (40% glicerina + 60% metanol)		
Tancs d'alimentació:	[metanol] (g/l)	[glicerina] (g/l)
Medi no marcat (per al <i>batch</i> inicial i dels primers 5 temps de residència)	6	4
Medi marcat (per a l'últim temps de residència abans de prendre la mostra final)	6	4 (12 % del metanol és ¹³ C-metanol i 12 % de la glicerina és [¹³ C ₃]-glicerina)

Els valors dels paràmetres més importants a l'estat estacionari són els següents:

CONTINU 1 (80% glicerina + 20% metanol)					
Estat estacionari	Bio (g/l) i OD ₆₀₀	[gli] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5.39 g/l n.d.	0.03	0	0.9	CH _{1.79} N _{0.127} S _{0.002} O _{0.531} (12.08% cendres)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.81 g/l n.d.	n.d.	n.d.	0.03	CH _{1.82} N _{0.147} S _{0.002} O _{0.627} (10.80% cendres)

CONTINU 2 (60% glicerina + 40% metanol)					
Estat estacionari	Bio (g/l) i OD ₆₀₀	[glic] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	3.96 g/l n.d.	0	0.04	9.0	CH _{2.00} N _{0.169} S _{0.023} O _{0.748} (7.59% cendres)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.75 g/l 33 OD ₆₀₀	0	3.41	0.1	CH _{1.83} N _{0.172} S ₀ O _{0.602} (8.78% cendres)

CONTINU 3 (40% glicerina + 60% metanol)					
Estat estacionari	Bio (g/l) i OD ₆₀₀	[gli] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	3.88 g/l 9.69 OD ₆₀₀	0	0	16.0	CH _{1.76} N _{0.163} S _{0.003} O _{0.535} (8.35% cendres)
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	2.58 g/l 6.38 OD ₆₀₀	0	3.93	1.70	CH _{1.83} N _{0.179} S _{0.003} O _{0.576} (8.78% cendres)

L'anàlisi comparativa d'aquestes dades es realitzarà a l'apartat 4.6 dels Resultats.

4.5.2.2. Espectres d'RMN i fragmentòmers calculats

Per a tots els cultius, a diferent proporció de barreja de substrats i diferent velocitat de dilució, les cèl·lules fraccionalment marcades biosintèticament amb ^{13}C (BDF ^{13}C -marcades), es van centrifugar i després es van sotmetre a hidròlisi. Els aminoàcids de l'hidrolitzat es van analitzar emprant els experiments d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear 2D [^{13}C , ^1H]-COSY per a obtenir, finalment, els corresponents valors dels fragmentòmers, f (tal i com s'explica en l'apartat 3.4.3 de Materials i Mètodes).

La taula de dades que permeten al programa FCAL calcular el valor dels fragmentòmers a partir de les intensitats dels multiplets és la següent:

Cultiu continu 80% glicerina + 20% metanol (marcatge simultani de glicerina i metanol)				
	P_n (%)	P_f (%)	F_m (%)	P_1 (%)
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	1.1	13	63.2	9.2
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	1.1	13	61.7	9.0

Cultiu continu 60% glicerina + 40% metanol (marcatge simultani de glicerina i metanol)				
	P_n (%)	P_f (%)	F_m (%)	P_1 (%)
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	1.1	13	63.2	9.2
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	1.1	13	61.7	9.0

Cultiu continu 40% glicerina + 60% metanol (marcatge simultani de glicerina i metanol)				
	P_n (%)	P_f (%)	F_m (%)	P_1 (%)
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	1.1	12	63.2	8.6
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	1.1	12	61.7	8.42

On s'ha utilitzat la fórmula presentada a l'apartat 6.1 de l'Apèndix:

$$P_1 = (1-F_m) \cdot P_n + F_m \cdot P_f \cdot 1 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n$$

Els valors trobats d'aquests fragmentòmers per a les diferents velocitats de dilució són els que es mostren a les següents taules:

Taula 4.5.2.2.-1. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics per al cultiu continu a 40% de glicerina i 60% de metanol.

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes (Cultiu continu a 40% de glicerina i 60% de metanol amb marcatge simultani de la glicerina i el metanol)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.55	0.05	0.02	0.38	0.06	0.02	0	0.92
Ala- β	0.57	0.43	-	-	0.07	0.93	-	-
Arg- β	0.85	0.15	0	0	0.59	0.25	0.15	0.01
Arg- δ	0.61	0.39	-	-	0.12	0.88	-	-
Asp- α	0.66	0.04	0.17	0.13	0.14	0.03	0.17	0.66
Asp- β	0.67	0.13	0.17	0.03	0.17	0.66	0.16	0.01
Glu- α	0.66	0.10	0.20	0.04	0.21	0.27	0.40	0.12
Glu- β	0.82	0.09	0.08	0.01	0.57	0.30	0.11	0.02
Glu- γ	0.54	0	0.46	0	0.05	0	0.95	0
Gly- α	0.55	0.45	-	-	0.15	0.85	-	-
His- α	0.54	0	0	0.46	0.11	0	0	0.89
His- β	0.55	0.45	0	0	0.08	0.91	0	0.01
His- δ 2	0.87	0.13	-	-		n.d.		
Ile- α	0.64	0	0.36	0	0.27	0	0.73	0
Ile- γ 1	0.73	0.25	-	0.02	0.76	0.20	0	0.04
Ile- γ 2	0.50	0.50	-	-	0.07	0.93	-	-
Ile- δ	0.75	0.25	-	-	0.80	0.20	-	-
Leu- α	0.55	0	0.45	0	0.11	0	0.89	0
Leu- β	0.99	0	-	0.01	0.99	0	-	0.01
Leu- δ 1	0.53	0.47	-	-	0.09	0.91	-	-
Leu- δ 2	1	0	-	-	1	0	-	-
Lys- α	0.46	0.09	0.40	0.05	0.11	0.01	0.88	0
Lys- β	0.82	0.16	-	0.02	0.63	0	0.37	0
Lys- γ	0.83	0.16	-	0.01	0.62	0.30	0.08	0
Lys- δ	0.56	0.44	-	0	0.08	0.92	-	0
Lys- ϵ	0.52	0.48	-	-	0.13	0.87	-	-
Met- α	0.70	0.01	0.17	0.12	0.12	0.08	0.14	0.66
Phe- α	0.49	0.01	0.01	0.49	0.09	0	0	0.91
Phe- β	0.51	0.49	0	0	0.08	0.92	0	0
Pro- α	0.65	0.11	0.20	0.04	0.27	0.29	0.36	0.08
Pro- β	0.74	0.22	-	0.04	0.53	0.43	-	0.04
Pro- γ	0.50	0.48	-	0.02	0.10	0.87	-	0.03
Pro- δ		n.d.			0.13	0.87	-	-
Ser- α	0.53	0	0.28	0.19	0.11	0	0.51	0.38
Ser- β	0.79	0.21	-	-	0.59	0.41	-	-
Thr- α	0.66	0.04	0.18	0.12	0.16	0.03	0.15	0.66
Thr- β	0.63	0.18	0.15	0.04	0.15	0.57	0.26	0.02
Thr- γ 2	0.74	0.26	-	-	0.79	0.21	-	-
Tyr- α	0.51	0	0.01	0.48	0.09	0	0	0.91
Tyr- β	0.56	0.44	0	0	0.06	0.94	0	0
Tyr- δ_x		n.d.				n.d.		
Tyr- ϵ_x	0.82	0	0	0.18	0.56	0	0	0.44
Val- α	0.53	0	0.47	0	0.06	0	0.93	0.01
Val- γ 1	0.54	0.46	-	-	0.08	0.92	-	-
Val- γ 2	0.98	0.02	-	-	0.99	0.1	-	-

Taula 4.5.2.2.-2. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics per al cultiu continu a 60% de glicerina i 40% de metanol.

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes (Cultiu continu a 60% de glicerina i 40% de metanol amb marcatge simultani de la glicerina i el metanol)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	1	0	0	0	0	0.04	0	0.96
Ala- β	1	0	-	-	0.01	0.99	-	-
Arg- β	1	0	0	0	0.42	0.37	0.15	0.06
Arg- δ	1	0	-	-	0.10	0.90	-	-
Asp- α	1	0	0	0	0.07	0.03	0.15	0.75
Asp- β	0.99	0	0	0.01	0.09	0.73	0.14	0.04
Glu- α	1	0	0	0	0.20	0.30	0.39	0.11
Glu- β	0.96	0	0	0.04	0.55	0.45	0	0
Glu- γ	1	0	0	0	0	0	1	0
Gly- α	1	0	-	-	0.06	0.94	-	-
His- α	1	0	0	0	0.04	0	0	0.96
His- β	0.96	0	0	0.04	0.04	0.96	0	0
His- δ 2	1	0	-	-	0.59	0.41	-	-
Ile- α	1	0	0	0	0.14	0	0.86	0
Ile- γ 1	0.93	0	0	0.07	0.75	0.20	-	0.05
Ile- γ 2		n.d.			0.79	0.21	-	-
Ile- δ	1	0	-	-	0.81	0.19	-	-
Leu- α	1	0	0	0	0.03	0	0.97	0
Leu- β	0.98	0	0	0.02	1	0	0	0
Leu- δ 1	1	0	-	-	0.04	0.96	-	-
Leu- δ 2	1	0	-	-	0.99	0.01	-	-
Lys- α		n.d.			0.04	0.03	0.93	0
Lys- β	0.96	0	0	0.04	0.60	0.36	0.04	0
Lys- γ	0.97	0	0	0.03	0.56	0.02	0.39	0.02
Lys- δ	0.99	0	0	0.01	0.04	0.16	0.80	0
Lys- ϵ	0.96	0.04	-	-	0.10	0.90	-	-
Met- α	1	0	0	0	0.08	0.10	0.14	0.68
Phe- α	1	0	0	0	0.02	0.01	0	0.97
Phe- β	1	0	0	0	0.01	0.99	0	0
Pro- α	1	0	0	0	0.27	0.27	0.38	0.08
Pro- β	1	0	-	0	0.57	0.10	0.33	0
Pro- γ	1	0	-	0	0.10	0.87	-	0.03
Pro- δ	-	-	-	-	0.13	0.87	-	-
Ser- α	1	0	0	0	0	0	0.33	0.67
Ser- β	1	0	-	-	0.35	0.65	-	-
Thr- α	1	0	0	0	0.09	0.02	0.14	0.75
Thr- β	1	0	0	0	0.08	0.62	0.29	0.01
Thr- γ 2	1	0	-	-	0.80	0.20	-	-
Tyr- α	1	0	0	0	0.03	0	0	0.97
Tyr- β	1	0	0	0	0	1	0	0
Tyr- δ_x		n.d.				n.d.		
Tyr- ϵ_x	0.99	0	0	0.01	0.55	0	0	0.45
Val- α	1	0	0	0	0.02	0	0.98	0
Val- γ 1	1	0	-	-	0.02	0.99	-	-
Val- γ 2	1	0	-	-	0.97	0.03	-	-

Taula 4.5.2.2.-3a. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics per al cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (MOSTRA 1).

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes per al cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾	f ^(2*)	f ⁽³⁾	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾	f ^(2*)	f ⁽³⁾
Ala- α	0.24	0.05	0	0.71	0.09	0.04	0	0.87
Ala- β	0.24	0.76	-	-	0.10	0.90	-	-
Arg- β	0.73	0.27	-	0	0.55	0.42	-	0.03
Arg- δ	0.19	0.81	-	-	0.25	0.75	-	-
Asp- α	0.42	0.04	0.32	0.22	0.14	0.03	0.07	0.76
Asp- β	0.45	0.21	0.29	0.05	0.15	0.79	0.06	0
Glu- α	0.31	0.02	0.30	0.37	0.26	0.30	0.33	0.11
Glu- β	0.78	0.22	-	0	0.58	0.42	-	0
Glu- γ	0.21	0	0.79	0	0.10	0	0.90	0
Gly- α	0.30	0.70	-	-	0.13	0.87	-	-
His- α	0.25	0	0	0.75	0.15	0	0	0.85
His- β	0.24	0.76	0	0	0.12	0.88	0	0
His- δ 2	0.70	0.30	-	-	0.64	0.36	-	-
Ile- α		n.d.			0.18	0	0.82	0
Ile- γ 1	0.67	0.33	-	0	0.96	0.02	-	0.02
Ile- γ 2	0.24	0.76	-	-	0.10	0.90	-	-
Ile- δ	0.67	0.33	-	-	1	0	-	-
Leu- α	0.23	0	0.77	0	0.16	0	0.84	0
Leu- β	1	0	-	0	1	0	-	0
Leu- δ 1	0.29	0.71	-	-	0.12	0.88	-	-
Leu- δ 2	1	0	-	-	1	0	-	-
Lys- α	0.20	0.03	0.77	0	0.21	0	0.79	0
Lys- β	0.88	0.12	-	0	0.64	0.36	-	0
Lys- γ	0.84	0.16	-	0	0.59	0.40	-	0.01
Lys- δ	0.23	0.77	-	0	0.21	0.79	-	0
Lys- ϵ	0.26	0.74	-	-	0.23	0.77	-	-
Met- α	0.45	0.06	0.28	0.21	0.15	0.08	0.06	0.71
Phe- α	0.27	0	0	0.73	0.10	0	0	0.90
Phe- β	0.25	0.75	0	0	0.08	0.92	0	0
Pro- α	0.48	0.15	0.34	0.03	0.33	0.27	0.29	0.11
Pro- β	0.71	0.26	-	0.03	0.59	0.41	-	0
Pro- γ	0.24	0.76	-	0	0.22	0.78	-	0
Pro- δ	0.24	0.76	-	-	0.23	0.77	-	-
Ser- α	0.26	0	0.30	0.44	0.09	0	0.33	0.58
Ser- β	0.56	0.44	-	-	0.44	0.56	-	-
Thr- α	0.40	0.04	0.32	0.24	0.15	0.01	0.07	0.77
Thr- β	0.42	0.56	-	0.02	0.15	0.85	-	0
Thr- γ 2	0.64	0.36	-	-	0.93	0.07	-	-
Tyr- α	0.28	0.02	0	0.70	0.11	0	0	0.89
Tyr- β	0.27	0.73	0	0	0.09	0.91	0	0
Tyr- δ_x	0.68	0	-	0.32	-	-	-	-
Tyr- ϵ_x	0.70	0	-	0.31	0.57	0	-	0.43
Val- α	0.24	0	0.76	0	0.09	0	0.91	0
Val- γ 1	0.23	0.77	-	-	0.06	0.94	-	-
Val- γ 2	1	0	-	-	1	0	-	-

Taula 4.5.2.2.-3b. Abundàncies relatives dels fragments C2 i C3 intactes en els aminoàcids proteics per al cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (RÈPLICA MOSTRA 1). Aquesta mostra ha estat analitzada per duplicat, és a dir, que per a la mateixa mostra cel·lular experimental es va realitzar el procés d'hidròlisi fins a la recollida de l'espectre i processament d'aquest per duplicat.

Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes			
	$\mu 0.05 \text{ h}^{-1}$			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.26	0.07	0	0.67
Ala- β	0.27	0.73	-	-
Arg- β	0.73	0.27	-	0
Arg- δ	0.18	0.82	-	-
Asp- α	0.48	0.04	0.31	0.17
Asp- β	0.46	0.21	0.30	0.03
Glu- α	0.50	0.12	0.38	0
Glu- β	0.80	0.20	-	0
Glu- γ	0.22	0	0.78	0
Gly- α	0.32	0.68	-	-
His- α	0.23	0.03	0	0.74
His- β	0.26	0.74	0	0
His- $\delta 2$	0.74	0.26	-	-
Ile- α	0.49	0	0.51	0
Ile- $\gamma 1$	0.74	0.26	-	0
Ile- $\gamma 2$	0.25	0.75	-	-
Ile- δ	0.64	0.36	-	-
Leu- α	0.25	0	0.75	0
Leu- β	0.88	0	-	0.12
Leu- $\delta 1$	0.25	0.75	-	-
Leu- $\delta 2$	1	0	-	-
Lys- α	0.25	0.03	0.72	0
Lys- β	0.87	0.13	-	0
Lys- γ	0.79	0.15	-	0.06
Lys- δ	0.25	0.75	-	0
Lys- ϵ	0.24	0.76	-	-
Met- α	0.45	0	0.31	0.24
Phe- α	0.27	0.02	0	0.71
Phe- β	0.25	0.75	0	0
Pro- α	0.49	0.15	0.36	0
Pro- β	0.52	0.29	-	0.19
Pro- γ	0.23	0.77	-	0
Pro- δ	0.22	0.78	-	-
Ser- α	0.24	0	0.31	0.45
Ser- β	0.53	0.47	-	-
Thr- α	0.46	0.04	0.33	0.17
Thr- β	0.39	0.55	-	0.06
Thr- $\gamma 2$	0.63	0.37	-	-
Tyr- α	0.27	0	0	0.73
Tyr- β	0.28	0.72	-	0
Tyr- δ_x			n.d.	
Tyr- ϵ_x	0.64	0	-	0.36
Val- α	0.26	0	0.74	0
Val- $\gamma 1$	0.24	0.76	-	-
Val- $\gamma 2$	1	0	-	-

La taula comparativa d'aquesta mostra analitzada per duplicat és la següent:

Taula comparativa del duplicat d'experiments (cultius 80% glicerina i 20% metanol amb marcatge doble de glicerina i metanol)								
Àtom de carboni	Abundàncies relatives de fragments de carboni intactes							
	μ 0.05 h ⁻¹							
	$f^{(1)}$ <i>exp. 1</i>	$f^{(1)}$ <i>exp. 2</i>	$f^{(2)}$ <i>exp. 1</i>	$f^{(2)}$ <i>exp. 2</i>	$f^{(2*)}$ <i>exp. 1</i>	$f^{(2*)}$ <i>exp. 2</i>	$f^{(3)}$ <i>exp. 1</i>	$f^{(3)}$ <i>exp. 2</i>
Ala- α	0.26	0.24	0.07	0.05	0	0	0.67	0.71
Ala- β	0.27	0.24	0.73	0.76	-	-	-	-
Arg- β	0.73	0.73	0.27	0.27	0	0	-	-
Arg- δ	0.18	0.19	0.82	0.81	-	-	-	-
Asp- α	0.48	0.42	0.04	0.04	0.31	0.32	0.17	0.22
Asp- β	0.46	0.45	0.21	0.21	0.30	0.29	0.03	0.05
Glu- α	0.50	0.31	0.12	0.02	0.38	0.30	0	0.37
Glu- β	0.80	0.78	0.20	0.22	0	0	-	-
Glu- γ	0.22	0.21	0	0	0.78	0.79	0	0
Gly- α	0.32	0.30	0.68	0.70	-	-	-	-
His- α	0.23	0.25	0.03	0	0	0	0.74	0.75
His- β	0.26	0.24	0.74	0.76	0	0	0	0
His- δ 2	0.74	0.70	0.26	0.30	-	-	-	-
Ile- α	0.49	-	0	-	0.51	-	0	-
Ile- γ 1	0.74	0.67	0.26	0.33	0	0	-	-
Ile- γ 2	0.25	0.24	0.75	0.76	-	-	-	-
Ile- δ	0.64	0.67	0.36	0.33	-	-	-	-
Leu- α	0.25	0.23	0	0	0.75	0.77	0	0
Leu- β	0.88	1	0	0	0.12	0	-	-
Leu- δ 1	0.25	0.29	0.75	0.71	-	-	-	-
Leu- δ 2	1	1	0	0	-	-	-	-
Lys- α	0.25	0.20	0.03	0.03	0.72	0.77	0	0
Lys- β	0.87	0.88	0.13	0.12	0	0	-	-
Lys- γ	0.79	0.84	0.15	0.16	0.06	0	-	-
Lys- δ	0.25	0.23	0.75	0.77	0	0	-	-
Lys- ϵ	0.24	0.26	0.76	0.74	-	-	-	-
Met- α	0.45	0.45	0	0.06	0.31	0.28	0.24	0.21
Phe- α	0.27	0.27	0.02	0	0	0	0.71	0.73
Phe- β	0.25	0.25	0.75	0.75	0	0	0	0
Pro- α	0.49	0.48	0.15	0.15	0.36	0.34	0	0.03
Pro- β	0.52	0.71	0.29	0.26	0.19	0.03	-	-
Pro- γ	0.23	0.24	0.77	0.76	0	0	-	-
Pro- δ	0.22	0.24	0.78	0.76	-	-	-	-
Ser- α	0.24	0.26	0	0	0.31	0.30	0.45	0.44
Ser- β	0.53	0.53	0.47	0.44	-	-	-	-
Thr- α	0.46	0.40	0.04	0.04	0.33	0.32	0.17	0.24
Thr- β	0.39	0.42	0.55	0.56	0.06	0.02	-	-
Thr- γ 2	0.63	0.64	0.37	0.36	-	-	-	-
Tyr- α	0.27	0.28	0	0.02	0	0	0.73	0.70
Tyr- β	0.28	0.27	0.72	0.73	0	0	-	0
Tyr- δ_x	-	0.68	-	0	-	0.32	-	-
Tyr- ϵ_x	0.64	0.70	0	0	0.36	0.31	-	-
Val- α	0.26	0.24	0	0	0.74	0.76	0	0
Val- γ 1	0.24	0.23	0.76	0.77	-	-	-	-
Val- γ 2	1	1	0	0	-	-	-	-

Es pot observar que hi ha molt pocs valors que no es puguin considerar equivalents (marcats en negreta). Concretament, els fragmentòmers del carboni Leu- β són els que es diferencien més entre ells.

D'altra banda, com es pot observar, les dades del cultiu 40% glicerina i 60% metanol (taula 4.5.2.2-2) a baixa velocitat de dilució (0.05h^{-1}) presenten una quantitat molt elevada de fragmentòmers que indiquen que tots els enllaços de la molècula en qüestió estan tallats ($f^{(i)}=1$). Això fa pensar, per exemple, que el temps de marcatge va ser inferior a un temps de residència (i per tant, conduint a una incorporació ^{13}C menor, de manera que augmenta la probabilitat d'obtenir enllaços ^{13}C - ^{12}C més enllà de l'esperada). Com explica Van Winden W. (2001), en experiments de marcatge on aquest es produeix en un període curt de temps, s'observa que el patró de marcatge de la biomassa naturalment marcada té una contribució més gran al patró de marcatge total. Aquest marcatge natural provoca una contribució major de senyals de singlets respecte a altres multiplets, ja que el marcatge a l'atzar de dos carbonis seguits passa molt rarament. Així, podria ser que el temps experimental de marcatge per a aquest experiment va ser menor del que s'esperava, que la quantitat de substrat marcat va ser menor, o que, per exemple, la bomba de l'aliment va anar a una velocitat més lenta de la suposada. No obstant, es feien comprovacions periòdiques del cabal de l'aliment i el temps de marcatge es va controlar acuradament.

Donat que aquest efecte només s'observa a la velocitat de dilució menor, segurament l'error es va produir en el temps de marcatge. Les dades corresponents a aquest cultiu continu (40% glicerina i 60% metanol a baixa velocitat de dilució, 0.05h^{-1}) no s'utilitzaran per realitzar l'anàlisi METAFoR.

4.5.2.3. Anàlisi METAFoR dels resultats

El primer apartat serà la comprovació de la consistència dels resultats trobats per als fragmentòmers de la mateixa manera que s'ha fet per als cultius amb marcatge únic de la glicerina.

Biosíntesi dels aminoàcids proteics en *Pichia pastoris* durant el creixement sobre barreja de glicerina i metanol

Com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats, donades les rutes de síntesi dels aminoàcids, hi ha uns fragmentòmers i unes relacions entre aquests que seran coneguts a priori.

Comprovació dels valors de fragmentòmers coneguts a priori

Suposant que les rutes de síntesi dels aminoàcids en el llevat *Pichia pastoris* són les mateixes que les identificades per al llevat *Saccharomyces cerevisiae*, es poden establir uns valors de fragmentòmers coneguts a priori. Aquests es troben especificades a l'apartat 4.3.3 dels Resultats.

Es pot comprovar la correcció d'aquests valors a les taules de l'apartat 6.5.1 de l'Apèndix. És a dir, les dades s'ajusten als valors suposats i descrits anteriorment a l'apartat 4.3.3 dels Resultats.

Comprovació de les relacions entre fragmentòmers conegudes a priori

Suposant que les rutes de síntesi dels aminoàcids en el llevat *Pichia pastoris* són les mateixes que les identificades per al llevat *Saccharomyces cerevisiae*, es poden establir un conjunt de relacions entre fragmentòmers conegudes a priori. Aquestes es troben especificades a l'apartat 4.3.3 dels resultats.

Es pot comprovar la validesa d'aquestes igualtats a les taules de l'apartat 6.5.2 de l'Apèndix. És a dir, les dades compleixen les igualtats suposades i descrites anteriorment a l'apartat 4.3.3 dels Resultats. Tot i així, en el cas del cultiu continu 80% glicerina i D baixa, els fragmentòmers dels carbonis Pro- α i Glu- α presenten una desviació important, de manera que en els càlculs METAFoR on aquests s'utilitzin caldrà anar amb compte.

Estudi més detallat d'alguns trets característics de les rutes de biosíntesi dels aminoàcids en llevats

La comprovació de les rutes de biosíntesi dels aminoàcids proteics en *Pichia pastoris* durant el creixement sobre les barreges de glicerina i metanol queda realitzada en l'apartat anterior.

Pel que fa a la Ser, la qual es pot sintetitzar a partir de dues rutes diferents (a partir del 3PG o de la Gly), cal observar els trencaments en les molècules de Ser, que indiquen la fracció d'aquestes molècules de Ser que es sintetitzen a partir de la Gly per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT).

La Ser es sintetitza a partir del 3PG, el patró de marcatge del qual és equivalent al del PEP i, per tant, es pot observar a través de la Phe i la Tyr. Com s'ha vist a l'apartat 4.3.3 dels resultats (en les cèl·lules creixent sobre glicerina com a única font de carboni) i a l'apartat 4.4.3 (en les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixent sobre glucosa com a única font de carboni) la fracció de molècules de 3PG que tenen tots els enllaços de carboni conservats (és a dir, que provenen majoritàriament d'una mateixa molècula font de glicerina) és major que la fracció de molècules de Ser que també tenen tots els enllaços de carboni conservats. Això es pot comprovar a partir de l'observació que $f^{(3)}\{\text{Ser-}\alpha\} < f^{(3)}\{\text{Phe-}\alpha\}$, per a tots els cultius continus amb barreja de glicerina i metanol (taules 4.5.2.2-1 a 5.5.2.2-3a).

El fet que aquests trencaments de la Ser no s'observin en les molècules de 3PG indiquen que la reacció des de la 3PG fins a la Ser no és reversible. D'altra banda, els trencaments observats en les molècules de Ser, indiquen que una fracció de les molècules de Ser es sintetitzen a partir de la Gly per la via de l'activitat inversa de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). La diferència entre les fraccions d'enllaços C_{β} - C_{α} trencats en la Ser i la Phe ($f^{(1)}\{\text{Ser-}\beta\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\beta\}$), indiquen que el 41% de les molècules de Ser estan trencades reversiblement per la via de la SHMT fins a Gly i una unitat C_1 .

		Fracció de molècules de Ser que es sintetitzen a partir de la Gly i una unitat C_1 per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT)	
Cultiu continu		$f^{(1)}\{\text{Ser-}\beta\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\beta\}$	
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		0.41
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$		0.43
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		0.42
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$		0.31
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		0.36
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$		n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		0.34
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$		0.02
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		0.51

Com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, els llevats poden usar quatre vies de biosíntesi per generar l'aminoàcid Gly. Les dues primeres corresponen al trencament de la Thr per la via de la threonina aldolasa i al trencament de la Ser per la via de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT).

És difícil elucidar quina és la contribució relativa d'aquestes dues possibles rutes, però es pot calcular quina és la fracció mínima de Gly que prové de la Ser de la mateixa manera que s'ha fet pels cultius amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni.

	fracció d'enllaços C _α -C' intactes en Gly (via SHMT o threonina aldolasa) $f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\}$	fracció d'enllaços C _α -C' intactes en Ser $[f^{(2*)}+f^{(3)}]\{\text{Ser-}\alpha\}$	fracció d'enllaços C _α -C' intactes en Thr $[f^{(2*)}+f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}$	fracció mínima de molècules de la Gly que provenen de la Ser (SHMT) $f^{(2)}\{\text{Gly-}\alpha\} - [f^{(2*)}+f^{(3)}]\{\text{Thr-}\alpha\}$
100% glucosa $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.83	0.83	0.75	0.08
100% glicerina $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.94	0.99	0.64	0.30
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.92	0.97	0.82	0.10
80% glicerina $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.70	0.74	0.66	0.04
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.87	0.91	0.84	0.03
60% glicerina $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.94	1	0.89	0.05
40% glicerina $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.45	0.47	0.30	0.15
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.85	0.89	0.81	0.04

Al contrari que en la ruta de la SHMT, i de la mateixa manera que ocorre en els cultius continus de *Pichia pastoris* amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni, la reacció de trencament de la Thr per la via de la threonina aldolasa, en el cas que estigués present, semblaria irreversible en tots els cultius continus amb barreja de glicerina i metanol, ja que els patrons de marcatge de la Thr i l'Asp són gairebé idèntics i el patró de l'Asp no pot provenir de la Thr perquè la síntesi de la Thr a partir de l'Asp és irreversible (taules 4.5.2.2-1 a 5.5.2.2-3a).

Com també s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, la Gly també es pot sintetitzar a partir d'una unitat C₁ i CO₂ per la via mitocondrial de la GCV (*Glycine Cleavage*). Aquesta reacció genera un augment relatiu en la fracció d'enllaços tallats C_α-C' en la Gly (és a dir, valors de $f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\}$ majors) donat que la mt-Gly és transportada al citosol on la major part de la proteïna cel·lular és generada (Maaheimo, H. *et al.*, 2001). En els cultius continus amb glicerina com a única font de carboni la diferència entre la fracció d'enllaços C_α-C' trencats en la Gly i els corresponents enllaços de la Phe (és a dir, $f^{(1)}\{\text{Gly-}\alpha\} - f^{(1)}\{\text{Phe-}\alpha\}$) era virtualment zero, mentre que en el cultiu amb glucosa com a única font de carboni s'observa una diferència important entre aquestes dues fraccions. Els valors per als cultius continus amb barreja de glicerina i metanol són els que es mostren a la següent taula:

	Síntesi de Gly per la via mitocondrial de la GCV (a partir d'una unitat C ₁ i CO ₂) $f^{(l)}\{\text{Gly-}\alpha\} - f^{(l)}\{\text{Phe-}\alpha\}$
100% glucosa	
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	$0.17 - 0.03 = 0.14$
100% glicerina	
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	$0.06 - 0.04 = 0.02$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	$0.08 - 0.03 = 0.05$
80% glicerina	
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	$0.30 - 0.27 = 0.03$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	$0.13 - 0.10 = 0.03$
60% glicerina	
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	$0.06 - 0.02 = 0.04$
40% glicerina	
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	$0.55 - 0.49 = 0.06$
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	$0.15 - 0.09 = 0.06$

Mentre que en el cas del cultiu amb glucosa hi ha evidència de l'acció reversible de la GCV mitocondrial, així com d'un flux significatiu de la mt-Gly cap al citosol en aquestes cèl·lules, tant en els cultius amb glicerina com a única font de carboni com en els cultius amb barreja de glicerina i metanol, o bé el flux de la mt-Gly cap al *pool* citosòlic és negligible o bé l'activitat inversa de la GCV era molt baixa.

Com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, la mt-Gly juntament amb una unitat mt-C₁ (derivada de la mt-Gly per la via mitocondrial de la GCV), podria emprar-se per sintetitzar mt-Ser per la via mitocondrial de la SHMT. Aquesta reacció generaria un augment relatiu en la fracció de molècules de Ser amb tots els enllaços C_β-C_α-C' trencats ($f^{(l)}\{\text{Ser-}\alpha\}$), donat que la mt-Ser és transportada al citosol on la major part de la proteïna cel·lular és generada. Els valors de $f^{(l)}\{\text{Ser-}\alpha\}$ per als cultius a elevada velocitat de dilució (0.09, 0 i 0.11, per als cultius de 80% glicerina, 60% glicerina i 40% glicerina, respectivament) indiquen que aquest cas és poc freqüent. Per als cultius 80% glicerina i 40% glicerina a baixa velocitat de dilució, en canvi, aquests valors són alts (0.26 i 0.53, respectivament). En aquest cas, doncs, es pot suposar que hi ha activitat de la GCV, de manera que es genera mt-Ser a partir de mt-Gly i només la primera, és a dir, la mt-Ser, és exportada des de la mitocondria cap al citosol. L'exportació de mt-Gly (amb els enllaços C_α-C' tallats) i la síntesi subsegüent de la Ser per la via de la SHMT citosòlica resultaria en el mateix patró de marcatge, és a dir, molècules de Ser amb tots els enllaços C_β-C_α-C' trencats, però els valors de ($f^{(l)}\{\text{Gly-}\alpha\} - f^{(l)}\{\text{Phe-}\alpha\}$) per a aquests cultius són pràcticament zero, com s'ha indicat anteriorment, i per tant es descarta aquesta possibilitat.

Per als cultius continus amb barreja de glicerina i metanol a elevada velocitat de dilució, considerant que no hi ha sortida de mt-Gly al citosol ni tampoc mt-Ser al citosol, es dedueix que les molècules de Ser que són trencades reversiblement a través de la via de la SHMT per convertir-se en Gly i una unitat C₁ provenen únicament de l'activitat citosòlica de la SHMT.

Finalment, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels Resultats, els llevats poden sintetitzar també la Gly a partir dels intermedis del cicle TCA a través de la via de l'isocitrat liasa i de l'alanina glioxilat aminotransferasa, on el glioxilat es produeix a partir de l'isocitrat i és transaminat per donar Gly. Tot i així, donat que el cicle del glioxilat no es troba actiu (vegeu més endavant) en cap dels cultius continus, aquesta possibilitat queda, doncs, descartada.

Metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* durant el creixement sobre diferents barreges de glicerina i metanol en cultius continus

En el següent apartat s'estudiaran els paràmetres principals pel que fa al metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris*, emprant com a referència l'anàlisi METAFoR realitzada per als cultius amb glicerina com a única font de carboni (punt 4.3.3).

Glicòlisi

Les cèl·lules estan creixent sobre glicerina i metanol. La primera s'incorpora a la glicòlisi a nivell del GAP i de la DHAP, els quals acaben generant PEP, a través d'un conjunt de reaccions potencialment reversibles. Degut a això, els metabòlits que es troben en les reaccions entre la glicerina i el PEP poden considerar-se que tenen el mateix patró de marcatge.

En aquest punt, doncs, és important l'observació del patró de marcatge del PEP (que es pot realitzar a través dels carbonis alifàtics dels aminoàcids Phe i Tyr) per observar si aquesta molècula prové majoritàriament d'una sola molècula de glicerina o, en canvi, s'observa incorporació del metanol, el qual prové del DHAP que es genera pel cicle de la XuMP.

Cultiu continu		Fragments de carbonis del PEP intactes (observació de Phe- α i Tyr- α)			
		$f^{(1)}$ tots els enllaços del PEP tallats	$f^{(2)}$ enllaços C ₂ -C ₃ del PEP conservat i C ₁ -C ₂ tallat	$f^{(2*)}$ enllaços C ₁ -C ₂ del PEP conservat i C ₂ -C ₃ tallat	$f^{(3)}$ tots els enllaços del PEP conservats
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.03 / 0.03	0.10 / 0.11	0.01 / 0.01	0.86 / 0.85
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.04 / 0.06	0 / 0	0 / 0.01	0.96 / 0.93
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.03 / 0.06	0 / 0	0 / 0.01	0.97 / 0.93
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.27 / 0.28	0 / 0.02	0 / 0	0.73 / 0.70
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.10 / 0.11	0 / 0	0 / 0	0.90 / 0.89
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.02 / 0.03	0.01 / 0	0 / 0	0.97 / 0.97
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.49 / 0.51	0.01 / 0	0.01 / 0.01	0.49 / 0.48
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.09 / 0.09	0 / 0	0 / 0	0.91 / 0.91

Per als cultius a elevada velocitat de dilució (0.16 h^{-1}), els valors de $f^{(3)}\{\text{Phe-}\alpha\}$ i $f^{(3)}\{\text{Tyr-}\alpha\}$ es troben igual o per sobre de 0.9 en tots els casos (menys en el cultiu de glucosa), cosa que significa que la majoria de les molècules de PEP provenen d'una sola molècula font de glicerina. En canvi, en els cultius a baixa velocitat de dilució (0.05 h^{-1}) aquests valors varien significativament, de manera que els valors de $f^{(1)}\{\text{Phe-}\alpha\}$ i $f^{(1)}\{\text{Tyr-}\alpha\}$ augmenten i deixen de ser zero (ambdós enllaços del PEP trencats) a mesura que augmenta la concentració de metanol al medi d'aliment. Això podria indicar un canvi en la relació entre el metanol assimilat (a biomassa)/disassimilat a CO_2 , tot i que caldria fer balanços de matèria per acabar d'assegurar-se. També podria indicar que hi ha activitat de la ruta de la pentosa fosfat. Resulta interessant remarcar que el cultiu al 40% de glicerina (i 60% metanol) a velocitat de dilució alta és on hi ha més consum de metanol i, en canvi, el PEP no es veu afectat, és a dir, que les molècules de PEP provenen majoritàriament de la glicerina (tot i així, la fracció de molècules de PEP que es conserven intactes és més baixa que per al cultiu continu 60% glicerina i D baixa).

Ruta de la pentosa fosfat

La ruta de la pentosa fosfat, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3, no és pot estudiar detalladament amb aquesta tècnica de marcatge fraccional amb glicerina (C3) i metanol (C1) com a substrats del creixement pels motius explicats anteriorment (apartat 4.3.3 dels resultats). Per poder estudiar la ruta de la pentosa fosfat, cal analitzar dos metabòlits precursors, l'E4P i la R5P, els quals poden observar-se a través dels carbonis de l'anell aromàtic de la Tyr i de la His, respectivament.

Quan es fan créixer les cèl·lules sobre glicerina, l'únic patró de marcatge possible per a l'E4P indica que aquesta conté el fragment $\text{C}_2\text{-C}_3\text{-C}_4$ intacte i l'enllaç $\text{C}_1\text{-C}_2$ sempre tallat, tant quan s'origina a través de la part oxidativa com la no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfat (figures a l'Apèndix 6.8.2). Degut a què aquest és l'únic patró de marcatge que es pot observar per a aquest metabòlit, a partir d'ell no es podrà obtenir cap informació a banda d'observar qualitativament si l'acció reversible de la tranquetolasa i la transaldolasa es manifesten, però sí que es podrà observar, en aquests casos d'alimentació simultània de glicerina i metanol, si aquests fragments $\text{C}_2\text{-C}_3\text{-C}_4$ de l'E4P es mantenen efectivament intactes. Això es podria observar a partir de $f^{(3)}\{\text{Tyr-}\delta_x\}$, el qual val 0.97 i 0.95 per als cultius amb glicerina com a única font de carboni (a D baixa i alta, respectivament) i en canvi, per al cultiu 80% glicerina a D baixa val 0.32. Però només es disposa de dades d'aquest fragmentòmer per a aquest cultiu ja que en la resta el senyal era massa feble com per poder ser integrat correctament i fins i tot en alguns espectres aquest senyal semblava absent.

La His tindrà sempre tallat l'enllaç $\text{C}_2\text{-C}_3$ quan l'aliment sigui glicerina. Els patrons de marcatge observats per a l'His mostren que, efectivament, aquest enllaç està sempre trencat ($f^{(3)}\{\text{His-}\beta\} \approx 0$ per a tots els cultius des de 100% glicerina fins a 40% glicerina). D'altra banda, així com en els cultius 100% glicerina només restava l'enllaç $\text{C}_1\text{-C}_2$ per a recollir informació, ja que els carbonis $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-C}_5$ sempre venien directament d'una única molècula de glicerina, en el cas d'alimentació simultània de glicerina i metanol això no té perquè ser així. Efectivament, així com en els cultius amb glicerina com a única font de carboni els enllaços $\text{C}_3\text{-C}_4\text{-C}_5$ de la His sempre es trobaven intactes (valors $f^{(3)}\{\text{His-}\alpha\} \geq 0.94$), en els cultius amb barreja de glicerina i metanol aquest fragmentòmer varia des de 0.46 fins a 0.96:

Cultiu continu		Fracció de molècules His amb enllaços C ₃ -C ₄ -C ₅ intactes $f^{(3)} \{His-\alpha\}$
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.96
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.94
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.75
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.85
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.96
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.46
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.89

Per als cultius a baixa D es troben valors de $f^{(3)} \{His-\alpha\}$ menors, cosa que coincideix amb l'observació realitzada anteriorment sobre les molècules de PEP.

D'altra banda, el trencament de l'enllaç C₁-C₂ en la His ($f^{(1)} \{His-\delta 2\}$) indica l'acció dels enzims transcetolasa i transaldolasa.

Cultiu continu		Activitat transaldolasa/TK $f^{(1)} \{His-\delta 2\}$
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.55
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.55
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.70
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.64
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.59
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.87
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	n.d.

En tots els cultius continus hi ha una fracció significativa d'enllaços C₁-C₂ de la His tallats, cosa que podria indicar l'acció dels enzims transcetolasa i transaldolasa, de manera que com a mínim una part de la branca no oxidativa de la ruta de la pentosa fosfat estaria activa. No obstant, aquest patró de marcatge també s'obtidria en el cas en què tant la branca oxidativa de la ruta de la pentosa fosfat com les reaccions reversibles catalitzades per la transcetolasa i la transaldolasa estiguessin actives. Aquest fet significa que, malgrat que es pot observar l'efecte combinat de la tranquetolasa i la transaldolasa, no es pot diferenciar, però, la relativa contribució de la branca oxidativa vers la no oxidativa.

Rutes associades a intermedis del TCA

La gluconeogènesi des del cyt-OAA (observable a partir de l'Asp) per la via de la PEPCK significaria unes quantitats relativament grans dels trencaments dels enllaços C₂-C₃ (i C₁-C₂) en el cyt-OAA que es transferirien als enllaços corresponents en el PEP, C₂-C₃ (i C₁-C₂).

La fracció de molècules de PEP que tenen *només* el seu enllaç C₂-C₃ trencat és negligible en els tres cultius continus amb alimentació simultània de glicerina i metanol

com es pot deduir a partir dels valors de $f^{(2*)}$ {Phe- α } i $f^{(2*)}$ {Tyr- α } (taules 4.5.2.2-1 a 4.5.2.2.3a).

En canvi, per al cyt-OAA, aquesta fracció és molt major per a gairebé tots aquests mateixos cultius: al voltant de 0.32-0.07 per als cultius amb 80% de glicerina, entre 0.15-0.18 per als cultius amb 40% de glicerina i entre 0.14-0.15 per al cultiu amb 60% de glicerina i D alta.

Es pot calcular la contribució de la PEPCK a partir de la següent equació:

$$X^{PEPCK} = f^{(2*)} \{Phe-\alpha, Tyr-\alpha\} / f^{(2*)} \{Asp-\alpha, Thr-\alpha\}$$

Cultiu continu		Activitat de la PEPCK			
		$f^{(2*)} \{Phe-\alpha\} / f^{(2*)} \{Asp-\alpha\}$	$f^{(2*)} \{Phe-\alpha\} / f^{(2*)} \{Thr-\alpha\}$	$f^{(2*)} \{Tyr-\alpha\} / f^{(2*)} \{Asp-\alpha\}$	$f^{(2*)} \{Tyr-\alpha\} / f^{(2*)} \{Thr-\alpha\}$
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.06	0.077	0.06	0.077
	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0	0	0.024	0.025
100% glicerina	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0	0	0.055	0.06
	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0	0	0	0
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0	0	0	0
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0	0	0	0
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0	0	0	0
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.06	0.055	0.06	0.055
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0	0	0	0

Com es pot observar, en tots els cultius continus és molt baixa.

La fracció de mt-OAA que prové del PEP, per la via de l'acció conjunta de la reacció de la piruvat quinasa i la reacció anapleròtica de la piruvat carboxilasa es calcula a partir de la següent equació, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats:

$$X^{ana} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP}) = [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Glu-\alpha\} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Phe, Tyr-\alpha\}$$

Cultiu continu		Fracció de mt-OAA que prové del PEP $X^{ana} = X(\text{mt-OAA} \leftarrow \text{PEP})$	
		càlcul amb Phe- α	càlcul amb Tyr- α
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.38	0.38
	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.32	0.33
100% glicerina	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.47	0.49
	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.53	0.54
80% glicerina	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.46	0.46
	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.
60% glicerina	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.42	0.42
	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.28	0.29
40% glicerina	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.43	0.43

Es pot observar com, en els cultius a elevada D, la fracció de mt-OAA que prové del PEP, és a dir l'anaplerosi, es manté a nivells similars i no es veu afectada per la diferent proporció de glicerina i metanol al medi de cultiu. En canvi, pels cultius a baixa D, sembla que s'observi una tendència desigual, essent el cultiu a 80% de glicerina el que presenta una anaplerosi major.

Per a un mateix cultiu continu, la fracció de mt-OAA que prové del PEP es pot considerar del mateix ordre tant a baixa com alta velocitat específica de creixement.

La fracció de cyt-OAA que prové del PEP per la via de la carboxilació del cyt-Pyr es pot calcular a partir de la següent equació, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats:

$$X_3^{cyt} = [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\alpha\}$$

Cultiu continu		Fracció de cyt-OAA que prové del PEP (X_3^{cyt})	
		$[f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\alpha\}$	$[f^{(2)} + f^{(3)}] \{Thr-\alpha\}$
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.72	0.71
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.32	0.33
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.68	0.70
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.26	0.28
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.79	0.78
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.78	0.77
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.17	0.16
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.69	0.69

En aquest cas també es pot observar una tendència clara en els cultius a D baixa: quan augmenta la proporció de metanol al medi d'alimentació disminueix la fracció de cyt-OAA que prové del PEP. En canvi en els cultius a D alta, aquesta fracció es manté relativament constant.

Per a un mateix cultiu continu, la fracció de cyt-OAA que prové del PEP sempre és més elevada a alta velocitat específica de creixement.

El flux d'intercanvi entre l'OAA i el fumarat es pot calcular a partir de la següent equació, com s'ha explicat a l'apartat 4.3.3 dels resultats:

Al citosol:

$$cyt-X^{exch} = X(\text{cyt-OAA} \leftrightarrow \text{fumarat}) = [2 * f^{(3)}] \{Asp-\beta\} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Asp-\beta\}$$

A la mitocondria:

$$mt-X^{exch} = X(\text{mt-OAA} \leftrightarrow \text{fumarat}) = [2 * f^{(3)}] \{Glu-\alpha\} / [f^{(2)} + f^{(3)}] \{Glu-\alpha\}$$

Cultiu continu		Flux d'intercanvi entre l'OAA i el fumarat	
		al citosol $cyt-X^{exch} = X(cyt-OAA \leftrightarrow \text{fumarat})$	a la mitocòndria $mt-X^{exch} = X(mt-OAA \leftrightarrow \text{fumarat})$
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.01~0.05	0.35~0.54
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.26~0.56	0.64
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.12	0.61
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.38	0.33
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0	0.54
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.10	0.54
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.37	0.57
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.03	0.62

El càlcul per al cultiu 80% glicerina i D baixa s'ha realitzat amb el fragmentòmer Pro- α , ja que, com s'ha comprovat al principi d'aquest apartat 4.5.2.3 els fragmentòmers trobats per al Glu- α d'aquest cultiu presenten un error important.

En general la fracció de mt-OAA que és reconvertida reversiblement a fumarat no presenta diferències entre les diferents velocitats de dilució d'un mateix cultiu continu, ni tampoc entre els diferents cultius continus a diferent barreja de glicerina i metanol. Pel que fa a la fracció de cyt-OAA que és reconvertida reversiblement a fumarat, en canvi, s'observa que, per a un mateix cultiu continu (és a dir, per a una mateixa proporció entre glicerina i metanol a l'aliment), els cultius a alta D presenten uns valors significativament menors que els corresponents a D baixa. Això podria indicar que, a D alta, es produeix un flux unidireccional del cyt-OAA cap a la mitocòndria (i no pas la sortida del fumarat des d'aquesta al citosol). D'altra banda, en els cultius a D baixa, a mesura que augmenta la quantitat de metanol al medi de cultiu, la fracció de cyt-OAA que és reconvertida reversiblement a fumarat disminueix, indicant, potser també, que disminueix l'exportació de fumarat des de dins de la mitocòndria.

El cicle del glioxilat opera a nivells baixos en tots els cultius continus amb barreges de glicerina i metanol, igual com s'ha trobat per als cultius continus amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni. Aquest fet s'ha comprovat, com s'ha realitzat anteriorment, comparant el patró de marcatge del Glu- α amb les corresponents abundàncies relatives teòriques dels fragments de carbonis intactes per al mt-OAA en absència d'activitat del cicle del glioxilat, tal i com es calcula a Maaheimo, H. *et al.* (2001), els quals poden considerar-se equivalents.

L'activitat de l'enzim màlic es pot analitzar a partir de les estructures fines de l'acoblament escalar ^{13}C - ^{13}C corresponents al carboni Ala- α , les quals indiquen que l'enllaç C₂-C₃ del piruvat es manté pràcticament intacte en tots els cultius continus a elevada velocitat de dilució. Això es pot deduir a partir de la fracció d'enllaços C _{α} -C _{β} intactes en l'Ala- α (és a dir, $[f^{(2)} + f^{(3)}] \{Ala-\alpha\}$) que val 0.94 (cultiu continu 40% glicerina a alta velocitat de dilució), 1 (cultiu continu 60% glicerina a alta velocitat de dilució), i 0.91 (cultiu continu 80% glicerina a alta velocitat de dilució). No obstant, la fracció d'enllaços C _{α} -C' trencats en l'Ala- α i la Val- α (és a dir, $[f^{(1)} + f^{(2)}] \{Ala-\alpha\}$ i $f^{(1)} \{Val-\alpha\}$), per a aquests mateixos cultius a elevada velocitat de dilució, valen 0.06 i 0.08 (cultiu continu 40% glicerina a alta velocitat de dilució), 0.04 i 0.02 (cultiu continu 60% glicerina a alta velocitat de dilució), 0.13 i 0.09 (cultiu continu 80% glicerina a alta

velocitat de dilució). Aquests valors indiquen que una petita fracció de les molècules de piruvat, en tots els cultius a elevada velocitat de dilució, tenen l'enllaç C₁-C₂ tallat. Aquesta observació podria ser el resultat de l'acció de l'enzim màlic a nivells basals.

Pel que fa als cultius a baixa velocitat de dilució, l'enllaç C₂-C₃ del piruvat apareix trencat en una fracció significativa, com es pot deduir a partir de la fracció d'enllaços C_α-C_β intactes en l'Ala-α (és a dir, $[f^{(2)} + f^{(3)}]$ {Ala-α}) que val 0.43 (cultiu continu 40% glicerina a baixa velocitat de dilució) i 0.75 (cultiu continu 80% glicerina a baixa velocitat de dilució). A més, la fracció d'enllaços C_α-C' trencats en l'Ala-α i la Val-α (és a dir, $[f^{(1)} + f^{(2)}]$ {Ala-α} i $f^{(1)}$ {Val-α}), per a aquests mateixos cultius a elevada velocitat de dilució, valen 0.60 i 0.53 (cultiu continu 40% glicerina a baixa velocitat de dilució), 0.29 i 0.24 (cultiu continu 80% glicerina a baixa velocitat de dilució), com es s'observa a la següent taula:

Cultiu continu		Interconversió del mt-malat en mt-Pyr per la via de l'enzim màlic	
		$[f^{(1)} + f^{(2)}]$ {Ala-α}	$f^{(1)}$ {Val-α}
100% glucosa	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.14	0.13
100% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.08	0.04
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.08	0.05
80% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.29	0.24
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.13	0.09
60% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	n.d.	n.d.
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.04	0.02
40% glicerina	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	0.60	0.53
	$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	0.06	0.08

Es pot observar que en els cultius a D baixa, a mesura que augmenta la proporció de metanol al medi de cultiu, augmenta la fracció de mt-Pyr procedent del mt-Mal per la via de l'enzim màlic. L'activitat de l'enzim màlic, en canvi, es manté a nivells basals en tots els cultius continus a alta D.

Així doncs, en els cultius a D baixa, a mesura que augmenta la quantitat de metanol al medi, augmenta l'activitat de l'enzim màlic (mt-Pyr <- mt-Mal) mentre que, com s'ha vist abans, si es comparen els cultius 80% glicerina (a D baixa) i 40% glicerina (a D baixa), a mesura que augmenta la quantitat de metanol, disminueix l'anaplerosi del PEP a mt-OAA (mt-OAA <- PEP), així com la fracció de cyt-OAA que prové també del PEP. La reacció de mt-Mal a mt-Pyr consumeix NAD(P)H mentre que el pas de PEP a mt-OAA consumeix ATP. Així doncs, sembla que la cèl·lula reparteix els fluxos en funció dels diferents requeriments redox i energètics.

La taula on es resumeixen totes les dades anteriors és la següent:

Origen dels intermedis metabòlics del metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris* obtinguts a partir de l'anàlisi del marcatge ^{13}C fraccional dels aminoàcids.

Metabòlits	Fracció del total del <i>pool</i> [%]							
	100% glicerina		80% glicerina		60% glicerina	40% glicerina		
	μ 0.05 h ⁻¹	μ 0.16 h ⁻¹	μ 0.05 h ⁻¹	μ 0.16 h ⁻¹	μ 0.16 h ⁻¹	μ 0.05 h ⁻¹	μ 0.16 h ⁻¹	
Citosol								
PEP a partir de cyt-OAA (reacció de la PEPCK)	0~3	0~3	0	0	0	5~6	0	
cyt-OAA a partir de cyt-Pyr (X_3^{cyt})	32~33	68~70	26~28	78~79	77~78	16~17	69	
cyt-OAA convertit reversiblement a fumarat ($cyt-X^{exch}$)	26.3~56.2	9.1~11.6	38	0	10	37	3	
Mitocòndria								
mt-Pyr a partir de mt-Mal (enzim màlic)	4~8	5~8	24~29	9~13	2~4	53~60	6~8	
mt-OAA a partir de cyt-PEP (X^{ana})	32.3~33.3	47.4~49.5	53~54	46	42	28~29	43	
mt-OAA convertit reversiblement a fumarat ($mt-X^{exch}$)	64.5	60.8	33	54	54	57	62	
Síntesi d'aminoàcids								
Gly a partir de Ser	≥ 30	≥ 10	≥ 4	≥ 3	≥ 5	≥ 15	≥ 4	
Metabolisme C1								
Ser a partir de Gly i una unitat C1	43	42	31	36	34	2	51	
Gly a partir de CO ₂ i una unitat C1	2	5	3	3	4	6	6	

4.6 ANÀLISI DE LES DADES FISIOLÒGIQUES

En aquest treball, s'ha implementat un sistema de cultiu en continu per a caracteritzar el metabolisme de *Pichia pastoris* creixent en glicerina i/o metanol, i més particularment la influència de la relació glicerina:metanol quan les cèl·lules co-assimilen ambdós substrats. D'altra banda aquesta investigació s'ha realitzat a dues velocitats específiques de creixent fixades. Aquests experiments han permès l'adquisició de dades fisiològiques dels diferents cultius a estat estacionari, els quals seran de gran ajut per al càlcul de fluxos metabòlics (conjuntament amb les dades obtingudes dels experiments de marcatge isotòpic) i observar com aquests varien al llarg d'una sèrie d'estats fisiològics: concretament, a l'augmentar o disminuir la velocitat específica de creixement i/o augmentar o disminuir la relació glicerina:metanol, dos paràmetres clau en el disseny d'esquemes de cultiu en *fed-batch* per a processos de producció de proteïnes recombinants. D'altra banda, els experiments han proporcionat informació sistematitzada sobre els mecanismes de regulació del metabolisme del metanol en *Pichia pastoris*, els quals presenten alguns trets específics diferents d'altres llevats metilotròfics com ara *Hansenula polymorpha* (veure l'apartat 1.7.1 de la Introducció).

Els paràmetres mesurats de manera rutinària han estat els següents: biomassa, anàlisi elemental de la biomassa, concentració de substrat(s) residuals en el medi de cultiu del reactor, i activitat lipàsica. A més, en alguns casos s'ha pogut disposar d'anàlisi fiable dels nivells de producció de CO₂ i consum d'O₂. Les dades obtingudes han estat presentades a la secció de resultats i en les taules següents se'n presenta un resum. Cada cultiu s'ha realitzat almenys per duplicat a cada una de les condicions ambientals seleccionades (en el cas dels cultius amb barreja de substrats, de cada parella d'experiments, una rèplica ha estat utilitzada per a fer un experiment de marcatge d'una de les dues fonts de carboni i l'altra amb doble marcatge).

4.6.1. Altres cultius continus

4.6.1.1. Cultius continus amb metanol com a única font de carboni

Per poder realitzar l'estudi de les dades fisiològiques de *Pichia pastoris* a partir dels cultius continus anteriors, es va creure convenient realitzar uns nous cultius continus amb metanol com a única font de carboni per completar el rang de barreges de substrats, glicerina i metanol, des del 100% de glicerina fins al 100% de metanol. Aquests cultius continus amb la soca X33-ROL (Mut⁺) de *Pichia pastoris* es van dur a terme com ja s'ha especificat a l'apartat 3.2.2 dels Materials i Mètodes.

Els cultius continus amb metanol com a única font de carboni es van dur a terme a la velocitat de dilució de 0.05h⁻¹, la qual es troba lleugerament per sota de la velocitat específica de creixement màxima d'aquesta soca en metanol (vegeu apartat dels resultats 4.2).

Resum de les dades dels cultius continus (D=0.05h⁻¹)

La concentració de metanol al medi d'alimentació va ser de 10g/l en els dos cultius continus amb metanol com a única font de carboni que es van dur a terme. Els valors dels paràmetres més importants a l'estat estacionari va ser els següents:

Estat estacionari (100% metanol) $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	Biomassa (g/l) i OD ₆₀₀	[metanol] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
Cultiu 1	2.7 g/l 14.4 OD ₆₀₀	0.61	n.d.	CH _{1.994} N _{0.162} S ₀ O _{0.688} (12.19% cendres)
Cultiu 2	2.95 g/l 15.1 OD ₆₀₀	0.11	203	n.d.

4.6.1.2. Cultiu continu amb glicerina com a única font de carboni (sense marcatge)

Es va repetir un cultiu 100% glicerina sense marcatge per recollir dades fisiològiques i comprovar la seva coincidència amb les dades obtingudes amb els altres cultius continus de 100% glicerina (apartat 4.3 dels resultats).

Resum de les dades del cultiu continu ($D=0.05\text{h}^{-1}$ i $D=0.16\text{h}^{-1}$)

La concentració de glicerina al medi d'alimentació va ser de 10g/l en ambdós cultius continus a diferent velocitat de dilució. Els valors dels paràmetres més importants a l'estat estacionari són els següents:

Estat estacionari	Biomassa (g/l)	[glicerina] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5.73 g/l	0	0	n.d.
$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.86 g/l	3.01	0	n.d.

4.6.2. Anàlisi comparativa de les dades fisiològiques obtingudes en els cultius continus

Estat estacionari	Bio (g/l) i OD ₆₀₀	[gli] _{ferm} (g/l)	[met] _{ferm} (g/l)	Activitat lipasa (U/ml)	Composició elemental de les cèl·lules
100%glicerina $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5.6 g/l n.d.	0	no n'hi ha	0	CH _{1.83} N _{0.111} S _{0.002} O _{0.654} (7.61% cendres)
100%glicerina $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.6 g/l n.d.	3.75	no n'hi ha	0.006	CH _{1.76} N _{0.144} S _{0.002} O _{0.616} (9.01% cendres)
100%glicerina $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5.73 g/l n.d.	0	no n'hi ha	0	CH _{1.87} N _{0.109} S _{0.001} O _{0.695} (7.61% cendres)
100%glicerina $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.86 g/l n.d.	3.01	no n'hi ha	0	CH _{1.90} N _{0.141} S _{0.086} O _{0.474} (9.01% cendres)
<i>Cultius amb marcatge únic de la glicerina</i>					
80%glicerina 20%metanol $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5.39 g/l n.d.	0.03	0	0.9	CH _{1.87} N _{0.128} S _{0.002} O _{0.553} (12.08% cendres)
80%glicerina 20%metanol $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.81 g/l n.d.	n.d.	n.d.	0.03	CH _{1.90} N _{0.146} S _{0.008} O _{0.610} (10.80% cendres)
60%glicerina 40% metanol $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	3.96 g/l n.d.	0	0.04	9.0	CH _{1.89} N _{0.139} S _{0.002} O _{0.626} (7.59% cendres)
60% glicerina 40% metanol $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.75 g/l 33 OD ₆₀₀	0	3.41	0.1	CH _{1.97} N _{0.143} S _{0.002} O _{0.719} (8.73% cendres)
40%glicerina 60%metanol $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	3.88 g/l 9.69 OD ₆₀₀	0	0	16.0	CH _{1.83} N _{0.148} S _{0.002} O _{0.620} (10.59% cendres)
40%glicerina 60%metanol $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	2.58 g/l 6.38 OD ₆₀₀	0	3.93	1.70	CH _{1.86} N _{0.140} S _{0.002} O _{0.629} (13.44% cendres)
<i>Cultius amb marcatge simultani de la glicerina i el metanol</i>					
80%glicerina 20%metanol $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	5 g/l 23.65 OD ₆₀₀	0.03	0	1.5	CH _{1.79} N _{0.127} S _{0.002} O _{0.531} (12.08% cendres)
80%glicerina 20%metanol $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.55 g/l 15.4 OD ₆₀₀	2.2	1.86	0.06	CH _{1.82} N _{0.147} S _{0.002} O _{0.627} (10.80% cendres)
60%glicerina 40% metanol $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	4.26 g/l 19.44 OD ₆₀₀	0	0	6.67	CH _{2.00} N _{0.169} S _{0.023} O _{0.748} (7.59% cendres)
60%glicerina 40% metanol $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	3.92 g/l 17.46 OD ₆₀₀	0.02	2.94	0.06	CH _{1.83} N _{0.172} S ₀ O _{0.602} (8.78% cendres)
40%glicerina 60%metanol $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	3.52 g/l 17.0 OD ₆₀₀	0	0.09	17.74	CH _{1.76} N _{0.163} S _{0.003} O _{0.535} (8.35% cendres)
40%glicerina 60%metanol $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$	2.8 g/l 11.8 OD ₆₀₀	0	4.08	9.34	CH _{1.83} N _{0.179} S _{0.003} O _{0.576} (8.78% cendres)
<i>Cultius 100% metanol</i>					
100% metanol (1) $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	2.7 g/l 14.4 OD ₆₀₀	no n'hi ha	0.61	n.d.	CH _{1.83} N _{0.192} S _{0.017} O _{0.667} (11.2 % cendres)
100% metanol (2) $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$	2.95 g/l 15.1 OD ₆₀₀	no n'hi ha	0.11	203	CH _{1.74} N _{0.171} S _{0.004} O _{0.543} (11.2 % cendres)

A partir de les dades anteriors es pot observar com no hi ha grans diferències entre les composicions elementals de les cèl·lules, encara que es variïn la composició del medi de cultiu o la velocitat específica de creixement. Aquest fet és coherent amb l'absència de limitació per nitrogen que es va comprovar en cada cultiu continu.

En les següents taules es presenten el recull de dades fisiològiques de tots els cultius continus realitzats en el present treball. El càlcul dels rendiments es du a terme com s'explica a l'apartat 3.7 dels Materials i Mètodes.

paràmetre fisiològic	Paràmetres del creixement a D 0.05h ⁻¹				
	100% glicerina	80% glicerina	60% glicerina	40% glicerina	100% metanol
[biomassa] (g/l)	5.73	5.39	3.96	3.88	2.95
[substrat residual] (g/l)	0 (g)	0(m) 0.03(g)	0.04(m) 0(g)	0(m) 0(g)	0.11 (m)
CER (mmol CO ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)	n.d.	4.49	n.d.	8.37	7.60
OUR (mmol O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.	13.36	19.74
q _{CO2} (mmol g ⁻¹ h ⁻¹) CER/X	n.d.	0.83	n.d.	2.16	2.58
q _{O2} (mmol g ⁻¹ h ⁻¹) OUR/X	n.d.	n.d.	n.d.	3.44	6.69
RQ	n.d.	n.d.	n.d.	0.63	0.38
Y _{X/S} (g/g) experimental	0.63	0.54	0.43	0.44	0.31
Y _{X/S} (g/g) teòric	no es calcula	0.53	0.50	0.44	no es calcula
Activitat específica de lipasa (U g ⁻¹)	0.2	0.17	2.3	4.1	68.8

(m) metanol; (g) glicerina

paràmetre fisiològic	Paràmetres del creixement a D 0.16h ⁻¹				
	100% glicerina	80% glicerina	60% glicerina	40% glicerina	100% glucosa
[biomassa] (g/l)	3.85	3.55	3.75	2.58	5.36
[substrat residual] (g/l)	3.05(g)	2.2(g) 1.86(m)	0(g) 3.41(m)	0(g) 3.93(m)	0.5(glu)
CER (mmol CO ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)	9.84	n.d.	n.d.	8.69	17.03
OUR (mmol O ₂ l ⁻¹ h ⁻¹)	8.85	n.d.	n.d.	n.d.	14.63
q _{CO2} (mmol g ⁻¹ h ⁻¹) CER/X	2.55	n.d.	n.d.	3.37	3.18
q _{O2} (mmol g ⁻¹ h ⁻¹) OUR/X	2.29	n.d.	n.d.	n.d.	2.73
RQ	≈1.0	n.d.	n.d.	n.d.	≈1.0
Y _{X/S} (g/g) experimental	0.63	0.67	0.57	0.53	0.57
Y _{X/S} (g/g) teòric	no es calcula	0.62	0.57	0.53	no es calcula
Activitat específica de lipasa (U g ⁻¹)	0	0.008	0.03	0.66	0

(m) metanol; (g) glicerina; (glu) glucosa

Creixement amb substrat únics

Quan la glicerina es subministra com a font única de carboni a velocitats de dilució entre 0.05 h^{-1} i 0.16 h^{-1} el rendiment de creixement és aproximadament constant, tot i que a velocitats altes de creixement la glicerina s'acumula al medi (ja que es troba a una velocitat específica de creixement pròxima a la màxima). El creixement proper a la $\mu_{\text{màx}}$ podria fer pensar que hi ha generació d'etanol i acètic que podrien alterar aquest rendiment biomassa/substrat, però en cap dels cultius continus amb glicerina com a única font de carboni s'ha observat presència d'etanol ni acetat en quantitats detectables. En els cultius en *batch* realitzats a l'apartat 4.2 dels Resultats, en canvi, sí que es va detectar l'aparició de subproductes i per aquest motiu els rendiments que allà es calculen són més baixos que els trobats en cultius continus.

Al no disposar de dades de producció de CO_2 a D 0.05 h^{-1} no es pot assegurar que la velocitat específica de producció de CO_2 es mantingui. Els rendiments amb glucosa són una mica més baixos (i la producció específica de CO_2 superior), tot i que la concentració residual de substrat al medi és molt menor (està més lluny de la seva $\mu_{\text{màx}}$). Tampoc s'observen nivells detectables d'etanol i acetat. En ambdós casos, es mostra que *Pichia pastoris* té un metabolisme fonamentalment respiratori en les condicions estudiades.

Pel que fa al creixement en metanol, el rendiment és molt inferior. En aquest cas tampoc s'observa acumulació de subproductes del metabolisme del metanol com podrien ser el fòrmic, l'etanol o l'acetat. Aquestes dades estan d'acord (és a dir, són del mateix ordre) amb resultats publicats anteriorment amb altres llevats metilotròfics. Cal destacar l'elevada q_{O_2} , coherent amb els elevats requeriments d' O_2 del metabolisme del metanol.

Tal com era d'esperar, en el creixement amb glicerina i glucosa, el promotor P_{AOXI} està fortament reprimat (no es detecta activitat lipasa), mostrant també que la desrepressió del promotor, quan es redueix la concentració de glicerina a zero (cultiu glicerina a D 0.05 h^{-1} , quan la concentració de substrat és limitant), no és suficient per a induir l'expressió, i només s'observen valors basals d'activitat lipàsica en comparació als valors obtinguts en el cultiu en metanol.

Creixement amb barreges de metanol i glicerina

Les cèl·lules de *Pichia pastoris* crescudes en cultius en continu a velocitats de dilució fixades prèviament amb barreges de metanol:glicerina de diferent composició mostren les següents característiques:

A velocitat de dilució de 0.05 h^{-1} *Pichia pastoris* pot assimilar simultàniament els dos substrats completament, independentment de la composició del medi d'alimentació. Només en el cas del cultiu 80% glicerina i 20% metanol trobem que les concentracions residuals de glicerina són superiors (però properes) al límit de detecció. Pel que fa a l'activitat lipàsica específica, s'observa que aquesta es manté a nivells semblants en les diferents barreges de glicerina i metanol, i a la vegada, clarament inferior al cultiu de metanol com a única font de carboni. Per tant, es pot inferir que els nivells de transcripció a partir del P_{AOXI} (i per tant, nivells d'alcohol oxidasa en les cèl·lules) probablement segueixen la mateixa tendència. És un perfil lleugerament diferent a l'observat en altres llevats metilotròfics com *H. polymorpha* i *Kloeckera* sp (Egli *et al.*,

1982) on es mostra que, depenent de l'enzim de la via d'assimilació del metanol, el 10-40% de metanol en la barreja metanol:glucosa ja resulta en una inducció màxima dels enzims del metabolisme del metanol, amb activitats específiques equivalents a les que es mesuren en cèl·lules crescudes en metanol com a única font de carboni. Aquests autors mostren que a partir de 40% de metanol, ja no es detecten millores en les activitats específiques durant el creixement de *H. polymorpha* i *Kloeckera* en barreges que continguin més de 40% de metanol.

Contràriament, a velocitat de dilució de 0.16 h^{-1} , donat que hi ha acumulació de glicerina al medi, el metanol no és consumit i, òbviament, s'acumula a concentracions superiors a mida que la proporció de metanol en el medi d'alimentació s'incrementa (amb l'excepció del cultiu 40% glicerina, on la concentració de glicerina residual és zero i el metanol és parcialment consumit). Cal observar que les activitats de lipasa que es detecten, tot i ser molt baixes, tenen tendència a augmentar a mida que augmentem la proporció de metanol al medi d'alimentació. D'altra banda, en tots els cultius, a les dues velocitats de dilució, les concentracions d'acètic i d'etanol es troben per sota dels nivells de detecció.

Si s'observen els resultats a $D=0.05\text{h}^{-1}$ (situació de co-assimilació) de producció de CO_2 i consum d' O_2 , tot i que són incomplets es veu que són coherents amb els resultats publicats per Egli *et al.* (1982): Els canvis en la composició de la barreja metanol:glicerina resulta en un canvi en les velocitats específiques de consum d' O_2 i producció de CO_2 i el quocient respiratori de *Pichia pastoris*: En el cas de *H. polymorpha* i *Kloeckera*, Egli *et al.* (1982) van veure que, a l'incrementar les proporcions de metanol a la barreja, el RQ disminueix gradualment des d'aproximadament 1.0, quan les cèl·lules creixen en glucosa, fins a 0.45-0.55 característic del creixement en metanol com a única font de creixement. En el cas d'aquest treball, es troba un RQ de 0.38 per al cultiu de metanol; aquest s'incrementa a 0.63 en el cultiu de 60:40 metanol:glicerina i arriba a valors al voltant d'1 en el cultiu de glicerina (o glucosa) com a única font de carboni. Cal assenyalar que els balanços de carboni en aquests experiments tanquen amb un error entre el 3 i el 5% (càlculs no mostrats, realitzats per en Sergio Santos, UAB).

Pel que fa als rendiments de creixement, en els cultius a $D 0.16 \text{ h}^{-1}$, es troben uns rendiments del mateix ordre que els observats en un cultiu amb glicerina com a font única de carboni, tal i com era d'esperar pel fet que el metanol no és consumit. En canvi, en els cultius on hi ha co-assimilació de metanol i glicerina s'observen uns resultats anàlegs als descrits per Egli *et al.* 1981, quan fan cultius en continu de *H. polymorpha* i *Kloeckera* amb diferents barreges metanol:glucosa:

El rendiment de creixement obtingut és aproximadament igual a la suma dels rendiments teòricament possibles a partir de cada substrat, és a dir:

$$Y_{s/x} = f \cdot Y_{\text{met}/X} + (1-f) \cdot Y_{\text{gly}/x}$$

On, f és la fracció de metanol en el medi d'alimentació. Això també ho observen Gubbels *et al.* (1995) amb *Saccharomyces cerevisiae* creixent en barreges de glucosa:etanol.

Tot i que els resultats dels rendiments de creixement mostrats podrien portar a la conclusió que els rendiments de creixement individuals per a glicerina i metanol són els mateixos durant els cultius de barreges de metanol:glicerina que durant els cultius amb glicerina o metanol com a fonts úniques de carboni, no s'ha de descartar *a priori* la possibilitat que el metanol s'oxidi només a CO₂ durant el creixement sobre barreges metanol:glicerina i que l'energia resultant permeti assimilar més carboni de la glicerina (o viceversa). De fet, els estudis de cultius en continu de *H. polymorpha* i *Kloeckera* creixent en diferents barreges metanol:glucosa realitzats per Egli *et al.* (1982) també mostren experiments d'incorporació de ¹⁴C a partir de metanol marcat amb aquest isòtop. Els resultats d'aquests experiments indiquen que el rendiment de creixement respecte al metanol s'incrementa a mesura que la proporció de metanol en la barreja de substrat s'incrementa, és a dir, quan major és la proporció de metanol en el medi d'alimentació, la fracció de carboni del metanol que s'incorpora a biomassa va augmentant respecte a la que es disassimila a CO₂. Aquesta observació sembla que també s'observa en el aquest treball, tal i com mostren els resultats de l'anàlisi METAFoR dels cultius corresponents (veure apartat anterior).

L'estudi d'Egli *et al.* (1982) també recalca una observació molt interessant: el rendiment de creixement sobre metanol incrementa quan les proporcions de metanol en el medi s'incrementen. Ara, mentre que en *H. polymorpha*, quan es supera el 20% de metanol en la barreja del medi d'alimentació, ja es mesuren rendiments "màxims" de metanol (rendiment observat en cultius amb metanol com a font única de carboni), per a *Kloeckera* calen proporcions molt més elevades de metanol per arribar a aquest estat (al voltant del 50% de metanol en la barreja), és a dir el rendiment de creixement sobre metanol va augmentant de manera més progressiva a l'augmentar la fracció de metanol en la barreja de 5 a 95%.

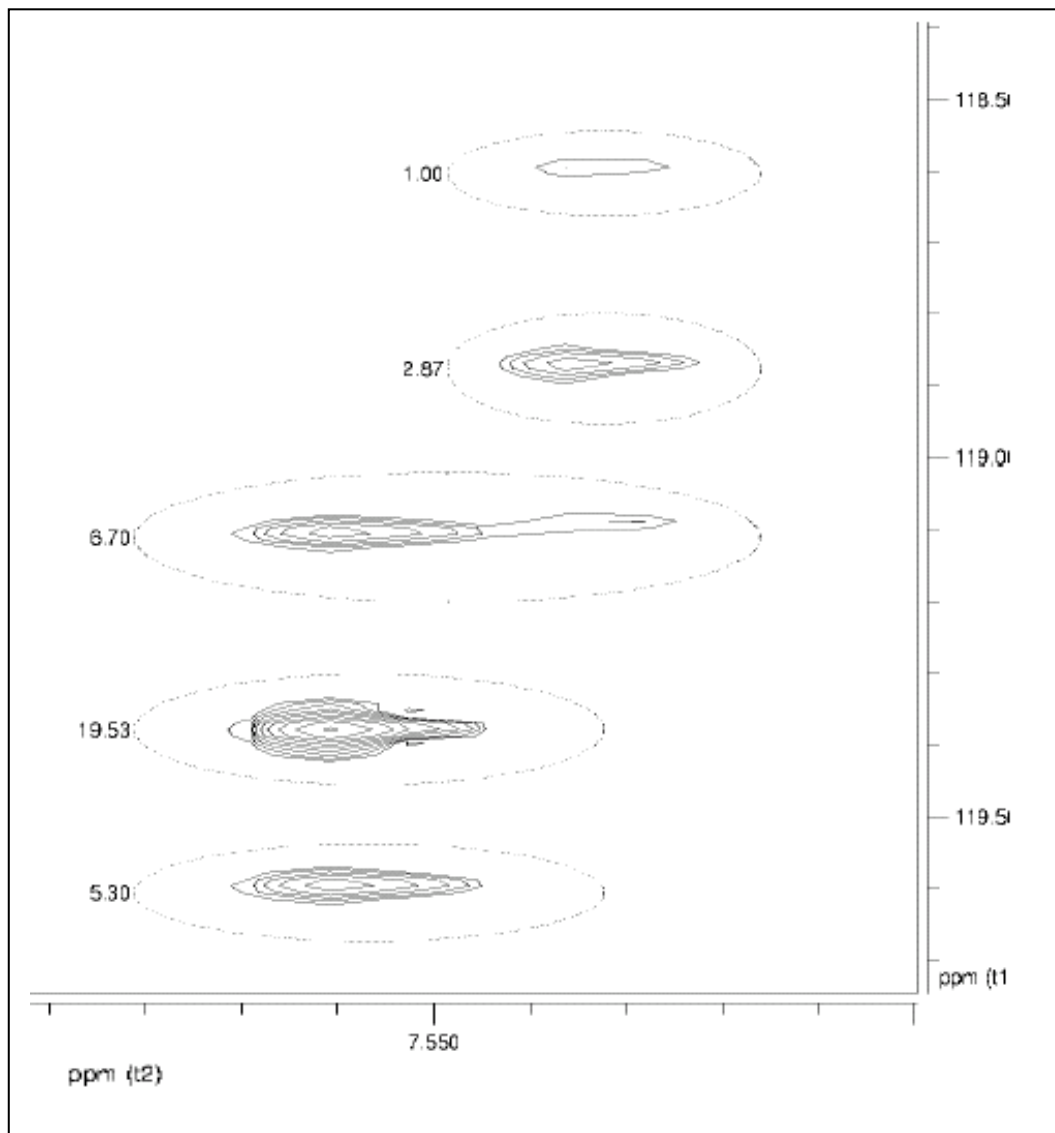
Aquesta observació sembla coherent amb la hipòtesi que els rendiments X/metanol van augmentant de manera progressiva, seguint un patró més semblant al de *Kloeckera*, i amb l'observació que els nivells de transcripció a partir del P_{AOX1} augmenten seguint una tendència anàloga.

En relació amb aquest fenomen, Gubbels *et al.* (1995) realitzen una sèrie de cultius de *Saccharomyces cerevisiae* creixent continu sobre diferents barreges glucosa+etanol, on mesuren activitats enzimàtiques intracel·lulars de les vies assimilatòries i dissimilatòries d'etanol. En aquests cultius, la glucosa s'utilitza preferentment com a substrat per a la biosíntesi i l'etanol preferentment com a substrat dissimilatori (però també com a font d'AcetilCoA per a biosíntesi). Només quan els requeriments d'ATP per a la síntesi de glucosa estan coberts mitjançant l'oxidació d'etanol, els enzims requerits per assimilar etanol a compostos de més de 2 carbonis es sintetitzen. Es podria especular que pel cas metanol:glicerina i metanol:glucosa podria succeir un fenomen semblant.

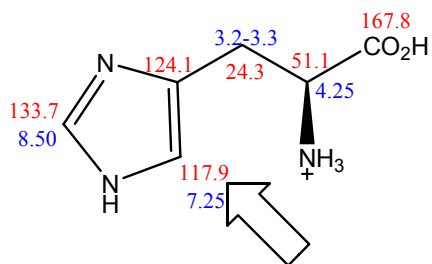
En aquest context, la relació variable de fracció de carboni del metanol assimilat a biomassa vers fracció de carboni del metanol disassimilat a CO₂ sembla tenir un impacte clar en el metabolisme energètic de *Pichia pastoris*, tal i com mostren les variacions en els quocients de fluxos metabòlics observats al nivell de reaccions anapleròtiques i fluxos intercompartimentals (veure taules-resum corresponents).

4.7. Anàlisi del senyal RMN del carboni $\delta 2$ de la Histidina

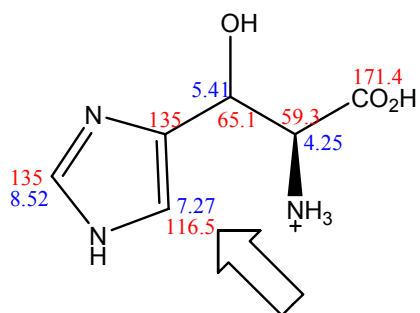
En els espectres RMN 2D [^{13}C , ^1H]-COSY dels cultius tant amb glicerina com amb barreja d'aquesta amb metanol, el senyal del carboni His- $\delta 2$ apareixia duplicada, com es pot observar en la següent imatge:



Seguidament es mostra una comparativa dels espectres de protó i carboni del compost β -hidroxihistidina i de la histidina normal, en la qual es mostren els desplaçaments químics de protó (en blau) i els de carboni (en vermell). Com es pot observar, els carbonis assenyalats amb la fletxa presenten valors de desplaçament químic molt similars, de manera que podria ser que el metabòlit desconegut que fa doblar el senyal d'aquest carboni sigui, efectivament, β -hidroxihistidina (*erythro* o *threo*, no es pot saber mirant simplement espectres).



Dades obtingudes a la UAB amb una mostra d'histidina en D₂O/TFA.



Dades de l'isòmer *Threo* (hidroxil endavant) publicades a l'article *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 4759.

Per l'isòmer *erythro* (hidroxil endarrera) cal esperar canvis mínims, especialment per la posició indicada amb la fletxa.

La β -hidroxihistidina és un dels molts aminoàcids naturals no proteïnogènics presents en pèptids naturals, en especial en antibiòtics peptídics que, com la Bleomicina i la Nikkomicina, presenten activitat anticancerosa. Una possible explicació a l'aparició d'aquest senyal duplicat de la His- δ 2 seria que *Pichia pastoris* sintetitzi β -hidroxihistidina, observació no documentada anteriorment en aquest llevat però sí en canvi en altres microorganismes (síntesi d'antibiòtics que són petits pèptids en *Streptomyces*, per exemple).

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS FINALS

- S'ha implementat un sistema de cultiu en quimiostat robust i reproducible, el qual permet créixer cèl·lules del llevat *Pichia pastoris* sota condicions ambientals ben definides i controlades, adequat per realitzar estudis de caracterització dels fluxos metabòlics d'aquest organisme sota diferents condicions ambientals. Potencialment, aquest sistema es pot estendre a estudis del mateix tipus amb altres condicions ambientals i/o soques amb diferents modificacions genètiques.
- A més, el sistema de cultiu pot adaptar-se a diferents estratègies o protocols de marcatge isotòpic i és susceptible de ser miniaturitzat, permetent així un estalvi en quant a font de carboni o nitrogen marcada isotòpicament, i la seva possible paral·lelització i automatització. D'aquesta manera, es podrien realitzar estudis d'alt rendiment (*high throughput*) d'un elevat nombre de condicions ambientals i/o modificacions genètiques, o permutacions diferents de les mateixes a un cost assequible per a estudis de genòmica funcional (anàlisi del fenotip metabòlic de col·leccions de mutants) quan el genoma de *Pichia pastoris* estigui disponible, estudis d'optimització ràpida de condicions de cultiu en processos de producció de proteïnes recombinants, etc.
- S'ha explorat per primera vegada l'aplicació de la metodologia de BDF de marcatge ^{13}C dels aminoàcids proteics, una eina analítica per caracteritzar el metabolisme intermediari, al llevat *Pichia pastoris* creixent en glucosa, glicerina i barreges de glicerina amb metanol. Concretament, s'ha adaptat i validat el formulisme d'aquesta metodologia, la qual havia estat desenvolupada prèviament per a estudiar el llevat *Saccharomyces cerevisiae* creixent sobre glucosa com a model d'organisme eucariòtic.
- L'adaptació d'aquesta metodologia ha permès per primer cop (i) caracteritzar les rutes de biosíntesi d'aminoàcids de *Pichia pastoris*, provant que són bàsicament equivalents a les descrites per *Saccharomyces cerevisiae* creixent sobre glucosa, tot i que s'observen petites desviacions significatives quan *Pichia pastoris* creix sobre glicerina i glicerina/metanol (ii) esbrinar característiques significatives de la xarxa de reaccions metabòliques localitzades al citosol i a la mitocondria actives quan les cèl·lules de *Pichia pastoris* creixen en glucosa, glicerina, i glicerina i metanol (topologia de la xarxa metabòlica), (ii) determinació de diversos quocients de fluxos metabòlics en els dos compartiments cel·lulars, i (iii) caracterització de diversos fluxos intercompartimentals. A més, aquest estudi ha permès detectar diferències significatives a nivell del cicle TCA i de les reaccions anapleròtiques quan es compara el creixement cel·lular a velocitats de creixement limitants vers creixement cel·lular a elevada velocitat específica de creixement amb glicerina com a única font de carboni, així com amb glucosa.
- No obstant, la metodologia que s'ha aplicat en aquest estudi ha posat de manifest algunes limitacions importants pel fet que s'ha usat una font de carboni C3, la glicerina. La informació que es pot extreure sobre la ruta de la pentosa fostat en aquest cas és molt limitada, ja que no es poden calcular els quocients de fluxos de les branques oxidatives i no oxidatives. Per determinar aquest repartiment de fluxos caldria dur a terme experiments amb altres estratègies de marcatge ^{13}C .
- La combinació de dades fisiològiques i dades d'estimació de quocients de fluxos metabòlics possibilitarà el càlcul de fluxos metabòlics i la modelització del

metabolisme central del carboni de *Pichia pastoris*, proporcionant així una valuosa eina per a la comprensió del metabolisme de *Pichia pastoris*, pas previ al disseny racional de processos de cultiu per a aquest organisme (disseny del medi de cultiu, selecció de paràmetres del cultiu, etc.). D'altra banda, es creu convenient desenvolupar eines computacionals de simulació d'experiments de marcatge que permetin esbrinar els quocients de fluxos metabòlics que el present protocol no ha permès. Actualment, ja hi ha alguns exemples prometedors (Zhu T. *et al.*, 2003; Phalakornkule C. *et al.*, 2001).

- Aquests estudis quantitius de caracterització del metabolisme podrien ser complementats amb dades obtingudes de l'anàlisi a nivell global dels nivells d'expressió de cada un dels gens involucrats en el metabolisme central del carboni. En aquest sentit, la disponibilitat de la seqüència complerta del genoma de *Pichia* permetrà la reconstrucció de la xarxa metabòlica d'aquest organisme, tal i com s'ha fet per a *Saccharomyces cerevisiae* (Förster J. *et al.*, 2003; www.genome.org; www.cpb.dtu.dk/models/yeastmodel.html). D'aquesta manera, per exemple, es podrien esbrinar *a priori* si poden existir rutes de biosíntesi alternatives d'aminoàcids (com per exemple per a la Lys).

APÈNDIX

6. APÈNDIX

6.1. Definicions del mètode METAFoR

6.1.1. Definició de les probabilitats utilitzades en les equacions del mètode METAFoR

Hi ha tres probabilitats bàsiques que cal introduir. Abans, però, és necessari recordar que les cèl·lules han estat alimentades amb dos medis diferents. En els primers cinc temps de residència, aproximadament, el medi d'alimentació ha estat únicament font de carboni sense marcar, és a dir, amb un contingut de ^{13}C a l'abundància natural (P_n). Aquest medi l'anomenarem medi-1. Després d'aquests 5 temps de residència, es considera que s'ha assolit l'estat estacionari i que, per tant, tot el medi a l'interior del reactor serà aquest medi-1.

Després d'aquests 5 temps de residència, l'aliment es substitueix per un segon medi, que anomenarem medi-2, el qual està compost per font de carboni a abundància natural i un percentatge (P_f , en tant per u) de font de carboni marcada uniformement amb ^{13}C . Aquest tant per u, P_f , estarà referenciat, doncs, al total de font de carboni al medi-2.

Així, es poden definir les tres probabilitats bàsiques de la següent manera:

1) El grau de marcatge en ^{13}C a l'abundància natural (P_n)

$P_n = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ de les molècules de font de carboni a l'abundància natural} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni a l'abundància natural}$

A més, aquest P_n és també el quocient entre el nombre total d'àtoms ^{13}C en cada una de les molècules (aminoàcids, altres metabòlits, deixalles, etc) presents en el reactor en qualsevol moment anterior a la introducció del medi-2 i el total d'àtoms de carboni a cada una d'aquestes molècules. També per a la suma de totes les molècules, o per a cada una de les posicions (amb correcció per la simetria, si n'hi ha) en cada molècula, inclosa la glicerina. I sempre tenim $P_n = 0.011$. I el mateix per a la proporció de molècules que no deriven de la glicerina trimarcada del medi-2.

Aquest grau de marcatge és vàlid per al medi-1, de manera que,

$P_n = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ de les molècules de font de carboni a l'abundància natural del medi-1} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni a l'abundància natural del medi-1}$

A més, també serà vàlid per a la fracció del medi-2 que no és font de carboni marcada uniformement amb ^{13}C :

$P_n = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ de les molècules de font de carboni a l'abundància natural de la fracció del medi-2 no marcada} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni a l'abundància natural de la fracció del medi-2 no marcada}$

2) La fracció de font de carboni uniformement marcada amb ^{13}C relativa a la quantitat total de font de carboni introduïda en el medi mínim de fermentació (P_f), és a dir, en el medi-2

$P_f = \text{carbonis } ^{13}\text{C}+^{12}\text{C} \text{ de les molècules de font de carboni uniformement marcada amb } ^{13}\text{C} \text{ al medi-2} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni natural i font de carboni uniformement marcada amb } ^{13}\text{C} \text{ al medi-2}$

Suposant que la puresa de la font de carboni marcada uniformement amb ^{13}C és del 100%, aquest P_f serà equivalent a:

$P_f = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ de les molècules de font de carboni uniformement marcada amb } ^{13}\text{C} \text{ al medi-2} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni natural i font de carboni uniformement marcada amb } ^{13}\text{C} \text{ al medi-2}$

La resta, serà la quantitat de carbonis de font de carboni no marcada al medi-2:

$(1-P_f) = \text{carbonis } ^{13}\text{C}+^{12}\text{C} \text{ de les molècules de font de carboni natural al medi-2} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni natural i font de carboni uniformement marcada amb } ^{13}\text{C} \text{ al medi-2}$

3) El grau de marcatge total en ^{13}C (P_1)

$P_1 = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ totals de totes les molècules de font de carboni} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni natural i font de carboni uniformement marcada amb } ^{13}\text{C} \text{ al medi-1 i medi-2}$

Per poder calcular aquest grau de marcatge P_1 en funció de les altres probabilitats definides, P_n i P_f , cal considerar la situació dins del reactor després d'un temps determinat d'alimentació amb el medi-2 (quan abans s'havia assolit l'estat estacionari amb el medi-1).

Tenint en compte que l'alimentació del cultiu continu amb barreja de font de carboni marcada i no marcada (medi-2) només dura un temps de residència, aproximadament, no tota la font de carboni dins del fermentador estarà marcada en aquesta proporció P_f .

Com es demostra a l'apartat 6.1.2 d'aquest apèndix, F_m representa la fracció del volum total del medi dins del fermentador en un moment determinat que correspon a medi-2, mentre que $(1-F_m)$ és la fracció del volum total del medi dins del fermentador en un moment determinat que serà medi-1, de manera que:

$F_m = \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ del medi-2} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ al medi del reactor (medi-1 i medi-2)}$.

$(1-F_m) = \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ del medi-1} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C}+^{12}\text{C}) \text{ al medi del reactor (medi-1 i medi-2)}$.

Únicament la fracció de font de carboni F_m tindrà aquesta proporció P_f de font de carboni uniformement marcada amb ^{13}C , mentre que l'aliment restant $(1-F_m)$ contindrà marcatge ^{13}C a l'abundància natural.

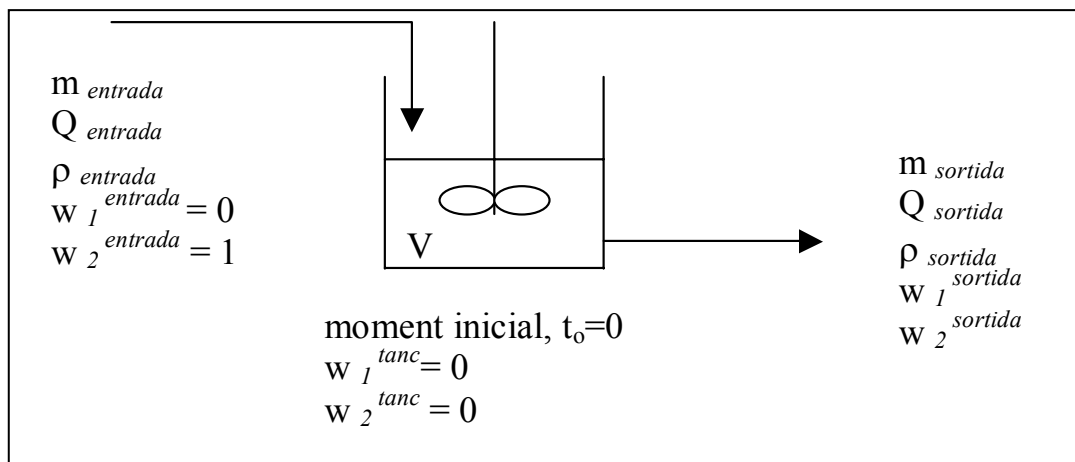
Així,

$$P_1 = (1-F_m) \cdot P_n + F_m \cdot P_f \cdot 1 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n$$

6.1.2. Càlcul de la fracció d'aliment marcat dins del reactor en un temps determinat (F_m)

Considerem que tenim un Reactor Continu de Tanc Agitat ideal. Emprant la mateixa nomenclatura que en l'apartat 6.1.1 de l'apèndix, anomenarem medi-1 al medi amb glicerina natural que s'alimenta durant 5 temps de residència fins que s'assoleix l'estat estacionari. De la mateixa manera, el medi-1 serà el medi amb barreja de glicerina natural i $[^{13}\text{C}_3]$ -glicerina que s'alimenta posteriorment durant un temps de residència abans de prendre la mostra.

Així, per poder realitzar el balanç de matèria al reactor, el medi-1 serà tractat com el component 1 del sistema i el medi-2 el component 2. Considerem el moment inicial quan ja s'ha assolit l'estat estacionari després d'alimentar durant 5 temps de residència amb el medi-1 i just abans de començar la nova alimentació del medi-2. De manera que:



On,

w_i^j = fracció màssica del component i al corrent j

m_j = cabal màssica total del corrent j (massa/temps)

Q_j = cabal volumètric total del corrent j (volum/temps)

ρ_j = densitat del corrent j o del tanc (massa/volum) que es considerarà constant per a tot el sistema (ρ)

V = volum del reactor

Aplicant el balanç de matèria per al component 2 (medi-2):

$$m_{entrada} \cdot w_2^{entrada} - m_{sortida} \cdot w_2^{sortida} = d(M \cdot w_2^{tanc}) / dt$$

On M és la massa total al reactor.

Considerant mescla perfecta,

$$w_{1 \text{ sortida}} = w_{1 \text{ tanc}}$$

$$w_{2 \text{ sortida}} = w_{2 \text{ tanc}}$$

$$m_{\text{entrada}} \cdot w_{2 \text{ entrada}} - m_{\text{sortida}} \cdot w_{2 \text{ sortida}} = d(M \cdot w_{2 \text{ sortida}}) / dt$$

Considerant que s'està operant en estat estacionari respecte al balanç de matèria total, és a dir, que la massa que entra al sistema és igual a la que surt, $m_{\text{entrada}} = m_{\text{sortida}} = m$,

$$m \cdot (w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}) = d(M \cdot w_{2 \text{ sortida}}) / dt$$

$$Q \cdot \rho (w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}) = d(V \cdot \rho \cdot w_{2 \text{ sortida}}) / dt$$

El volum i la densitat es mantenen constant i, per tant,

$$Q \cdot (w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}) = V d(w_{2 \text{ sortida}}) / dt$$

$$(Q/V) \cdot (w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}) = d(w_{2 \text{ sortida}}) / dt$$

$$D \cdot (w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}) = d(w_{2 \text{ sortida}}) / dt$$

On D és la velocitat de dilució al reactor (temps^{-1}). Separant variables i integrant,

$$\int_0^{w_{2 \text{ sortida}}} \frac{d(w_{2 \text{ sortida}})}{(w_{2 \text{ sortida}} - w_{2 \text{ entrada}})} = \int_0^t D dt$$

$$\ln\left(\frac{w_{2 \text{ entrada}}}{w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}}\right) = D t$$

$$\ln\left(\frac{w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}}{w_{2 \text{ entrada}}}\right) = -D t$$

$$\left(\frac{w_{2 \text{ entrada}} - w_{2 \text{ sortida}}}{w_{2 \text{ entrada}}}\right) = \exp(-D t)$$

$$w_2^{entrada} - w_2^{sortida} = w_2^{entrada} \cdot \exp(-Dt)$$

$$w_2^{entrada} - w_2^{entrada} \cdot \exp(-Dt) = w_2^{sortida}$$

$$w_2^{entrada} [1 - \exp(-Dt)] = w_2^{sortida}$$

Sabem que $w_2^{entrada} = 1$, i així,

$$w_2^{sortida} = [1 - \exp(-Dt)]$$

La definició de $w_2^{sortida}$ és:

$w_2^{sortida}$ = massa de medi-2 / massa de medi total (medi-1 + medi-2) = fracció màssica del medi total de dins del reactor en un moment determinat que correspon al medi-2 (el que conté barreja de glicerina natural i [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina)

Segons la definició de F_m en l'apartat de l'apèndix 6.1.1,

F_m = carbonis totals ($^{13}\text{C}+^{12}\text{C}$) del medi-2 / carbonis totals ($^{13}\text{C}+^{12}\text{C}$) al medi del reactor (medi-1 i medi-2).

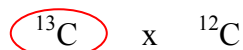
Si la concentració de glicerina total al medi-1 és la mateixa que la concentració de glicerina total (glicerina natural + [$^{13}\text{C}_3$]-glicerina), i si es considera que la densitat es manté constant, a partir del $\text{PM}_{\text{glicerina}}$ i del número d'avogadro, es pot passar de fraccions màssiques a F_m i comprovar que

$$F_m = [1 - \exp(-Dt)]$$

6.1.3. Deducció de les equacions de probabilitat (per a un experiment de marcatge fraccional biosintètic)

Per a un **carboni terminal** (carboni encerclat):

$\mathbf{K}^{(1)}_s$: fracció de molècules que tenen l'enllaç trencat (marcat amb una creu), és a dir que provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet:



El carboni observat, ^{13}C , pot provenir d'una molècula de font de carboni natural o bé d'una molècula de [$^{13}\text{C}_i$]-font de carboni. La probabilitat de trobar un carboni ^{13}C sobre el total de carbonis és P_1 .

El carboni enllaçat al carboni terminal observat, ^{12}C , només pot provenir d'una molècula de font de carboni natural. La probabilitat de trobar un carboni ^{12}C sobre el total de carbonis és $(1-P_1)$.

Així,

$$K^{(1)}_S = P_1 \cdot (1-P_1)$$

$K^{(2)}_S$: fracció de molècules que tenen l'enllaç intacte (indicat amb un guió), és a dir que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.



Aquesta molècula només pot provenir de la font de carboni natural, la qual es troba, d'una banda, en la fracció $(1-F_m)$ del medi de dins del reactor en un moment determinat (fracció de medi-1, seguint les definicions dels altres apartats de l'apèndix), i de l'altra, en la fracció $(1-P_f)$ de la part F_m del medi de dins del reactor (on F_m és la fracció del medi de dins del fermentador corresponent al medi-2, segons les definicions dels altres apartats de l'apèndix).

Per a la fracció de carbonis $(1-F_m)$, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C és P_n . Segons la definició de P_n en els altres apartats de l'apèndix, per al medi-1:

$$P_n = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ de les molècules a l'abundància natural del medi-1} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni a l'abundància natural del medi-1}$$

Per a aquesta mateixa fracció de carbonis $(1-F_m)$ la probabilitat de trobar un carboni ^{12}C és $(1-P_n)$:

$$(1-P_n) = \text{carbonis } ^{12}\text{C} \text{ de les molècules a l'abundància natural del medi-1} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni a l'abundància natural del medi-1}$$

Així, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C (l'observat) al costat d'un altre, en aquest cas ^{12}C , per a una mateixa molècula de font de carboni natural de la fracció de medi $(1-F_m)$ serà:

$$(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

Per a la fracció de carbonis $F_m \cdot (1-P_f)$, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C també és P_n . Segons la definició de P_n en els altres apartats de l'apèndix, per al medi-2:

$$P_n = \text{carbonis } ^{13}\text{C} \text{ de les molècules a l'abundància natural de la fracció del medi-2 no marcada} / \text{carbonis totals } (^{13}\text{C} + ^{12}\text{C}) \text{ a les molècules de font de carboni a l'abundància natural de la fracció del medi-2 no marcada}$$

Per a aquesta mateixa fracció de carbonis $F_m \cdot (1-P_f)$ la probabilitat de trobar un carboni ^{12}C és $(1-P_n)$:

$(1-P_n)$ = carbonis ^{12}C de les molècules a l'abundància natural de la fracció del medi-2 no marcada / carbonis totals ($^{13}\text{C}+^{12}\text{C}$) a les molècules de font de carboni a l'abundància natural de la fracció del medi-2 no marcada

Així, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C (l'observat) al costat d'un altre, en aquest cas ^{12}C , per a una mateixa molècula font de carboni natural de la fracció de medi $F_m \cdot (1-P_f)$ serà:

$$F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

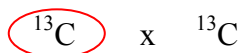
En conclusió, la probabilitat de trobar un singlet corresponent a un carboni ^{13}C enllaçat a un carboni ^{12}C que prové d'una mateixa molècula de font de carboni serà la suma de les dues probabilitats anteriors. De manera que,

$$K_S^{(2)} = (1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

En el cas que $F_m = 1$ (és a dir que tot el medi de dins del reactor és el medi-2, el medi amb barreja de font de carboni marcada i a abundància natural),

$$K_S^{(2)} = (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

$K_d^{(1)}$: fracció de molècules que tenen l'enllaç trencat (indicat amb una creu), és a dir que provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.



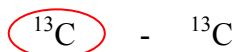
El carboni observat, ^{13}C , pot provenir d'una molècula de font de carboni natural o bé d'una molècula de [$^{13}\text{C}_i$]-font de carboni. La probabilitat de trobar un carboni ^{13}C sobre el total de carbonis és P_1 .

El carboni enllaçat al carboni terminal observat, també ^{13}C , pot provenir d'una molècula de font de carboni natural o bé d'una molècula de [$^{13}\text{C}_i$]-font de carboni. La probabilitat de trobar un carboni ^{13}C sobre el total de carbonis torna a ser P_1 .

Així,

$$K_d^{(1)} = P_1 \cdot P_1$$

$K_a^{(2)}$: fracció de molècules que tenen l'enllaç intacte (indicat per un guió), és a dir que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.



Aquesta molècula pot provenir de la [$^{13}\text{C}_i$]-font de carboni natural o bé de la font de carboni natural. La [$^{13}\text{C}_i$]-font de carboni es troba en la fracció $F_m \cdot P_f$ del medi de dins del reactor en el moment de prendre la mostra. La probabilitat de trobar un carboni ^{13}C en aquesta fracció de molècules de font de carboni és 1, de manera que la probabilitat de trobar els dos carbonis ^{13}C enllaçats per a aquesta fracció de molècules de font de carboni serà:

$$F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 = F_m \cdot P_f$$

D'altra banda, les molècules de font de carboni natural es troben, en la fracció $(1-F_m)$ del medi de dins del reactor i en la fracció $(1-P_f)$ de la part F_m del medi de dins del reactor (on F_m és la fracció del medi de dins del fermentador corresponent al medi-2, segons les definicions dels altres apartats de l'apèndix).

Per a la fracció de carbonis $(1-F_m)$, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C és P_n . Així, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C (l'observat) al costat d'un altre, en aquest cas també ^{13}C , per a una mateixa molècula de font de carboni natural de la fracció de medi $(1-F_m)$ serà:

$$(1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n$$

Per a la fracció de carbonis $F_m \cdot (1-P_f)$, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C també és P_n . Així, la probabilitat de trobar un carboni ^{13}C (l'observat) al costat d'un altre, en aquest cas també ^{13}C , per a una mateixa molècula font de carboni natural de la fracció de medi $F_m \cdot (1-P_f)$ serà:

$$F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n$$

En conclusió, la probabilitat de trobar un doblet corresponent a un carboni ^{13}C enllaçat a un carboni ^{13}C que prové d'una mateixa molècula de font de carboni serà la suma de les tres probabilitats anteriors. De manera que,

$$K_d^{(2)} = F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n$$

En el cas que $F_m = 1$ (és a dir que tot el medi de dins del reactor és el medi-2, el medi amb barreja de font de carboni marcada i a abundància natural),

$$K_d^{(2)} = P_f + (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n = P_n^2(1-P_f) + P_f$$

Per a un **carboni central** en un fragment C_3 (amb la mateixa constant d'acoblament):

$K_s^{(1)}$: fracció de molècules que tenen els dos enllaços trencats (marcats amb una creu), és a dir que provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet:



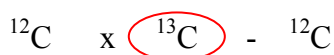
El carboni observat, ^{13}C , pot provenir d'una molècula de font de carboni natural o bé d'una molècula de $[^{13}\text{C}_i]$ -font de carboni. La probabilitat de trobar un carboni ^{13}C sobre el total de carbonis és P_1 .

Els carbonis enllaçats al carboni central observat, tots dos ^{12}C , només poden provenir de molècules de font de carboni natural. La probabilitat de trobar un carboni ^{12}C sobre el total de carbonis és $(1-P_1)$.

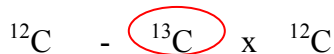
Així,

$$K^{(1)}_S = P_1 \cdot (1-P_1) \cdot (1-P_1)$$

$K^{(2)}_S$: fracció de molècules que tenen només un dels dos enllaços trencats (marcat amb una creu) i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet. En aquest cas, el carboni observat i un dels carbonis enllaçats provenen de la mateixa molècula de font de carboni mentre que l'altre carboni veí al carboni observat prové d'una altra molècula de font de carboni:



o



El carboni observat, ^{13}C , només pot provenir d'una molècula de font de carboni natural ja que està enllaçat a un carboni ^{12}C de la mateixa molècula. La probabilitat de trobar un carboni ^{13}C en una molècula de font de carboni natural i un carboni ^{12}C al seu costat és (com ja s'ha deduït anteriorment):

$$(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

L'altre carboni ^{12}C enllaçat al carboni central observat prové d'una altra molècula de font de carboni natural. La probabilitat de trobar aquest carboni ^{12}C és $(1-P_1)$.

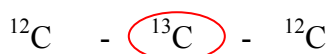
Així,

$$K^{(2)}_S = (1-P_1) \cdot [(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

Per a $F_m = 1$,

$$K^{(2)}_S = (1-P_1) \cdot [(1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

$K^{(3)}_S$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni (indicat per guions), i contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.



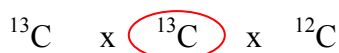
En aquest cas la molècula de font de carboni ha de ser font de carboni natural, així, la probabilitat de trobar el carboni ^{13}C observat, dins de la fracció de molècules de font de carboni natural, és P_n , mentre que la probabilitat que els altres dos siguin ^{12}C és $(1-P_n) \cdot (1-P_n)$:

$$K_S^{(3)} = (1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n) \cdot (1-P_n)$$

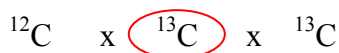
Per a $F_m = 1$,

$$K_S^{(3)} = (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n) \cdot (1-P_n)$$

$K_d^{(1)}$: fracció de molècules que provenen de diferents molècules de font de carboni, és a dir que tenen els dos enllaços de carbonis trencats (indicats amb una creu), i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.



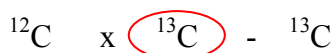
o



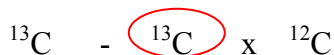
En aquest cas la probabilitat de trobar el carboni observat, ^{13}C , serà P_1 . La probabilitat que un dels carbonis enllaçats sigui ^{13}C també serà P_1 mentre que la probabilitat que l'altre sigui ^{12}C serà $(1-P_1)$. Així,

$$K_d^{(1)} = P_1 \cdot P_1 \cdot (1-P_1)$$

$K_d^{(2)}$: fracció de molècules que tenen només un dels dos enllaços trencats (marcat amb una creu) i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet. En aquest cas, el carboni observat i un dels carbonis enllaçats provenen de la mateixa molècula de font de carboni mentre que l'altre carboni veí al carboni observat prové d'una altra molècula de font de carboni:



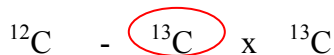
o



i



o



La probabilitat de trobar les dues primeres possibilitats és la de trobar un carboni ^{12}C sobre el total de carbonis i la de trobar dos carbonis enllaçats que provenen d'una molècula de $[^{13}\text{C}_i]$ -font de carboni o bé d'una molècula de font de carboni natural que té els dos carbonis marcats ^{13}C :

$$(1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n] = \\ = (1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^2 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

La probabilitat de trobar les dues últimes possibilitats és, en canvi:

$$P_1 \cdot [(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

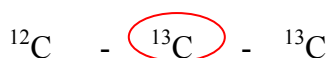
Així,

$$K_d^{(2)} = (1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^2 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^2] + P_1 \cdot [(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

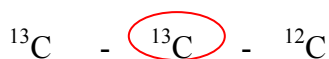
Per a $F_m=1$,

$$K_d^{(2)} = (1-P_1) \cdot [P_f + (1-P_f) \cdot P_n^2] + P_1 \cdot [(1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

$K_d^{(3)}$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir conserven intactes els dos enllaços de carboni (indicats per un guió), i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet.



o



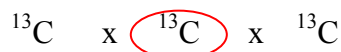
Aquestes molècules només poden ser de font de carboni natural, de manera que:

$$K_d^{(3)} = (1-F_m) \cdot P_n^2 \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^2 \cdot (1-P_n)$$

Per a $F_m=1$,

$$K^{(3)}_d = (1-P_f) \cdot P_n^2 \cdot (1-P_n)$$

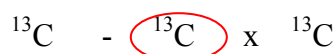
$K^{(1)}_t$: fracció de molècules que provenen de diferents molècules de font de carboni, és a dir, que tenen els dos enllaços de carbonis trencats (indicats per una creu), i que contribueixen a la intensitat del senyal del triplet.



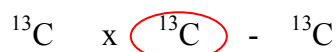
Es pot deduir fàcilment que:

$$K^{(1)}_t = P_1^3$$

$K^{(2)}_t$: fracció de molècules que tenen només un dels dos enllaços trencats (marcat amb una creu), i que contribueixen a la intensitat del senyal del triplet.



o



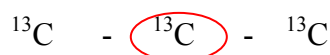
Es pot deduir que la probabilitat de trobar alguna de les dues situacions equivalents anteriors és:

$$K^{(2)}_t = P_1 \cdot [F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n]$$

Per a $F_m = 1$,

$$K^{(2)}_t = P_1 \cdot [P_f + (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

$K^{(3)}_t$: fracció de molècules que provenen de la mateixa molècula de font de carboni, és a dir que tenen els dos enllaços intactes (marcats amb un guió), i que contribueixen a la intensitat del senyal del triplet.



Es pot deduir que la probabilitat de trobar la situació anterior és:

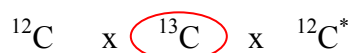
$$K^{(3)}_t = F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 \cdot 1 + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n \cdot P_n = \\ = F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^3 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^3$$

Per a $F_m = 1$,

$$K_t^{(3)} = P_f + (1-P_f) \cdot P_n^3$$

Per a un **carboni central** en un fragment C₃ (**amb diferent constant d'acoblament**) (el carboni marcat amb un asterisc és el que té una constant d'acoblament major amb el carboni observat):

K⁽¹⁾_s : fracció de molècules que tenen els dos enllaços trencats (marcats amb una creu), és a dir que provenen de diferents molècules de font de carboni, i que contribueixen a la intensitat del senyal del singlet:



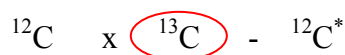
El carboni observat, ¹³C, pot provenir d'una molècula de font de carboni natural o bé d'una molècula de [¹³C_i]-font de carboni. La probabilitat de trobar un carboni ¹³C sobre el total de carbonis és P₁.

Els carbonis enllaçats al carboni central observat, tots dos ¹²C, només poden provenir de molècules de font de carboni natural. La probabilitat de trobar un carboni ¹²C sobre el total de carbonis és (1-P₁).

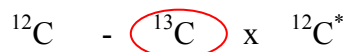
Així,

$$K_s^{(1)} = P_1 \cdot (1-P_1) \cdot (1-P_1)$$

K^(2b)_s i K^(2a)_s : fracció de molècules que tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament i major constant d'acoblament, respectivament**, intacte, mentre que l'altre carboni veí del carboni observat prové d'una altra molècula de font de carboni, i que també contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.



i



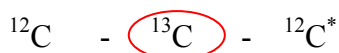
Es pot comprovar fàcilment que $K_s^{(2b)} = K_s^{(2a)}$ i, a més, coincideixen amb la probabilitat $K_s^{(2)}$ per al cas d'un carboni observat central en un fragment C₃ amb igual constant d'acoblament. De manera que,

$$K_s^{(2b)} = K_s^{(2a)} = (1-P_1) \cdot [(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

Per a $F_m = 1$,

$$K^{(2b)}_S = K^{(2a)}_S = (1-P_1) \cdot [(1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

$K^{(3)}_S$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni (indicat per guions), i contribueixen a la intensitat del senyal del singlet.



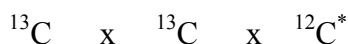
En aquest cas la molècula de font de carboni ha de ser font de carboni natural, així, la probabilitat de trobar el carboni ^{13}C observat, dins de la fracció de molècules de font de carboni natural, és P_n , mentre que la probabilitat que els altres dos siguin ^{12}C és $(1-P_n) \cdot (1-P_n)$:

$$K^{(3)}_S = (1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n) \cdot (1-P_n)$$

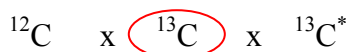
Per a $F_m = 1$,

$$K^{(3)}_S = (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n) \cdot (1-P_n)$$

$K^{(1)}_{db}$ i $K^{(1)}_{da}$: fracció de molècules que provenen de diferents molècules de font de carboni, és a dir que tenen els dos enllaços de carboni trencats (indicats per creus), i contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de major i menor constant d'acoblament, respectivament.



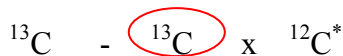
i



Es pot observar que aquesta situació és equivalent al cas de $K^{(1)}_d$ per a un carboni situat en un fragment C3 amb igual constant d'acoblament, de manera que:

$$K^{(1)}_{db} = K^{(1)}_{da} = P_1 \cdot P_1 \cdot (1-P_1)$$

$K^{(2a)}_{da}$: fracció de molècules que només tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament** intacte (indicat per un guió) i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de **menor constant d'acoblament**.



La probabilitat de trobar aquesta situació és la de trobar un carboni ^{12}C sobre el total de carbonis i la de trobar dos carbonis enllaçats que provenen d'una molècula de [$^{13}\text{C}_i$]-font de carboni o bé d'una molècula de font de carboni natural que té els dos carbonis marcats ^{13}C :

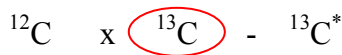
$$(1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n] = \\ = (1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^2 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

$$K^{(2a)}_{da} = (1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^2 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

Per a $F_m=1$,

$$K^{(2a)}_{da} = (1-P_1) \cdot [P_f + (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

$K^{(2b)}_{db}$: fracció de molècules que només tenen l'enllaç amb **major constant d'acoblament** intacte (indicat per un guió) i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de **major constant d'acoblament**.



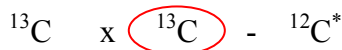
Es pot veure que $K^{(2b)}_{db} = K^{(2a)}_{da}$ i, per tant,

$$K^{(2b)}_{db} = (1-P_1) \cdot [F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^2 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

Per a $F_m=1$,

$$K^{(2b)}_{db} = (1-P_1) \cdot [P_f + (1-P_f) \cdot P_n^2]$$

$K^{(2b)}_{da}$: fracció de molècules que només tenen l'enllaç amb **major constant d'acoblament** intacte (indicat per un guió) i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de **menor constant d'acoblament**.



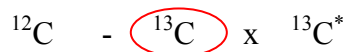
La probabilitat de trobar aquesta situació és la de trobar un carboni ^{13}C sobre el total de carbonis i la de trobar dos carbonis enllaçats que provenen d'una molècula de font de carboni natural que té només un dels dos carbonis marcats:

$$K^{(2b)}_{da} = P_1 \cdot [(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

Per a $F_m=1$,

$$K^{(2b)}_{da} = P_1 \cdot [(1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

$K^{(2a)}_{db}$: fracció de molècules que només tenen l'enllaç amb **menor constant d'acoblament** intacte (indicat per un guió) i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de **major constant d'acoblament**.



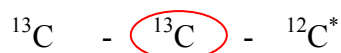
Es pot veure fàcilment que $K^{(2a)}_{db} = K^{(2b)}_{da}$, de manera que:

$$K^{(2a)}_{db} = P_1 \cdot [(1-F_m) \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

Per a $F_m=1$,

$$K^{(2a)}_{db} = P_1 \cdot [(1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$$

$K^{(3)}_{da}$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni (indicats per un guió), i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de menor constant d'acoblament.



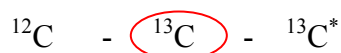
En aquest cas la molècula de font de carboni ha de ser font de carboni natural, així, la probabilitat de trobar el carboni ^{13}C observat i el segon carboni ^{13}C , dins de la fracció de molècules de font de carboni natural, és P_n per a cada un d'ells, mentre que la probabilitat que el tercer carboni sigui ^{13}C és $(1-P_n)$. Així,

$$K^{(3)}_{da} = (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

Per a $F_m=1$,

$$K^{(3)}_{da} = (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

$K^{(3)}_{db}$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir que conserven intactes els dos enllaços de carboni (indicats per un guió), i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de major constant d'acoblament.



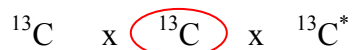
Es pot observar fàcilment que $K^{(3)}_{db} = K^{(3)}_{da}$, de manera que:

$$K^{(3)}_{db} = (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n \cdot (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

Per a $F_m=1$,

$$K_{db}^{(3)} = (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n \cdot (1-P_n)$$

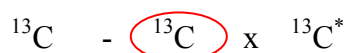
$K_{dd}^{(1)}$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir, que tenen els dos enllaços de carbonis trencats (indicats per una creu), i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblats.



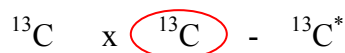
Es pot deduir fàcilment que:

$$K_{dd}^{(1)} = P_1^3$$

$K_{dd}^{(2a)}$ i $K_{dd}^{(2b)}$: fracció de molècules que només tenen l'enllaç amb **menor i major constant d'acoblament, respectivament**, intacte (indicat per un guió), i que també contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblats.



i



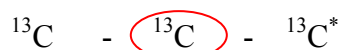
La probabilitat de trobar una de les dues situacions anteriors és:

$$K_{dd}^{(2a)} = K_{dd}^{(2b)} = P_1 \cdot [F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n]$$

Per a $F_m = 1$,

$$K_{dd}^{(2a)} = K_{dd}^{(2b)} = P_1 \cdot [P_f + (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n]$$

$K_{dd}^{(3)}$: fracció de molècules que provenen d'una mateixa molècula de font de carboni, és a dir, que conserven intactes els dos enllaços de carboni (indicats per guions), i que contribueixen a la intensitat del senyal del doblet de doblats.



$$\begin{aligned} K_{dd}^{(3)} &= F_m \cdot P_f \cdot 1 \cdot 1 \cdot 1 + (1-F_m) \cdot P_n \cdot P_n \cdot P_n + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n \cdot P_n \cdot P_n = \\ &= F_m \cdot P_f + (1-F_m) \cdot P_n^3 + F_m \cdot (1-P_f) \cdot P_n^3 \end{aligned}$$

Per a $F_m = 1$,

$$K_{dd}^{(3)} = P_f + (1-P_f) \cdot P_n^3$$

La següent taula mostra les totes les equacions anteriors:

àtom de carboni	K	Equacions	
terminal	$K^{(1)}$	$K_{S}^{(1)} = P_1 (1-P_1)$	$K_{d}^{(1)} = P_1 P_1$
	$K^{(2)}$	$K_{S}^{(2)} = (1-F_m) P_n (1-P_n) + F_m \cdot (1-P_f) P_n (1-P_n)$	$K_{d}^{(2)} = F_m P_f + (1-F_m) P_n^2 + F_m (1-P_f) P_n^2$
central en un fragment C_3 (amb diferent constant d'acoblament)	$K^{(1)}$	$K_{S}^{(1)} = P_1 (1-P_1)^2$	$K_{da}^{(1)} = P_1 P_1 (1-P_1)$
		$K_{db}^{(1)} = K_{da}^{(1)}$	$K_{dd}^{(1)} = P_1^3$
	$K^{(2a)}$	$K_{S}^{(2a)} = (1-P_1)[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$	$K_{da}^{(2a)} = (1-P_1)[F_m P_f + (1-F_m) P_n^2 + F_m(1-P_f) P_n^2]$
		$K_{db}^{(2a)} = P_1[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$	$K_{dd}^{(2a)} = P_1[F_m P_f + (1-F_m)P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2]$
	$K^{(2b)}$	$K_{S}^{(2b)} = K_{S}^{(2a)}$	$K_{da}^{(2b)} = K_{da}^{(2a)}$
		$K_{db}^{(2b)} = K_{da}^{(2a)}$	$K_{dd}^{(2b)} = K_{dd}^{(2a)}$
$K^{(3)}$	$K_{S}^{(3)} = (1-F_m)P_n(1-P_n)^2 + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)^2$	$K_{da}^{(3)} = (1-F_m)P_n^2(1-P_n) + F_m(1-P_f) \cdot P_n^2(1-P_n)$	
	$K_{db}^{(3)} = K_{da}^{(3)}$	$K_{dd}^{(3)} = F_m P_f + (1-F_m)P_n^3 + F_m(1-P_f)P_n^3$	
central en un fragment C_3 (amb igual constant d'acoblament)	$K^{(1)}$	$K_{S}^{(1)} = P_1 (1-P_1)^2$	$K_{d}^{(1)} = P_1 P_1 (1-P_1)$
		$K_{t}^{(1)} = P_1^3$	
	$K^{(2)}$	$K_{S}^{(2)} = (1-P_1)[(1-F_m)P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f)P_n(1-P_n)]$	$K_{d}^{(2)} = (1-P_1)[F_m P_f + (1-F_m) P_n^2 + F_m(1-P_f)P_n^2] + P_1[(1-F_m) P_n(1-P_n) + F_m(1-P_f) P_n (1-P_n)]$
		$K_{t}^{(2)} = P_1 [F_m P_f + (1-F_m) P_n^2 + F_m (1-P_f) P_n^2]$	
	$K^{(3)}$	$K_{S}^{(3)} = (1-F_m)P_n(1-P_n)(1-P_n) + F_m(1-P_f) P_n (1-P_n)(1-P_n)$	$K_{d}^{(3)} = (1-F_m) P_n^2 (1-P_n) + F_m (1-P_f) P_n^2 (1-P_n)$
		$K_{t}^{(3)} = F_m P_f + (1-F_m)P_n^3 + F_m(1-P_f)P_n^3$	

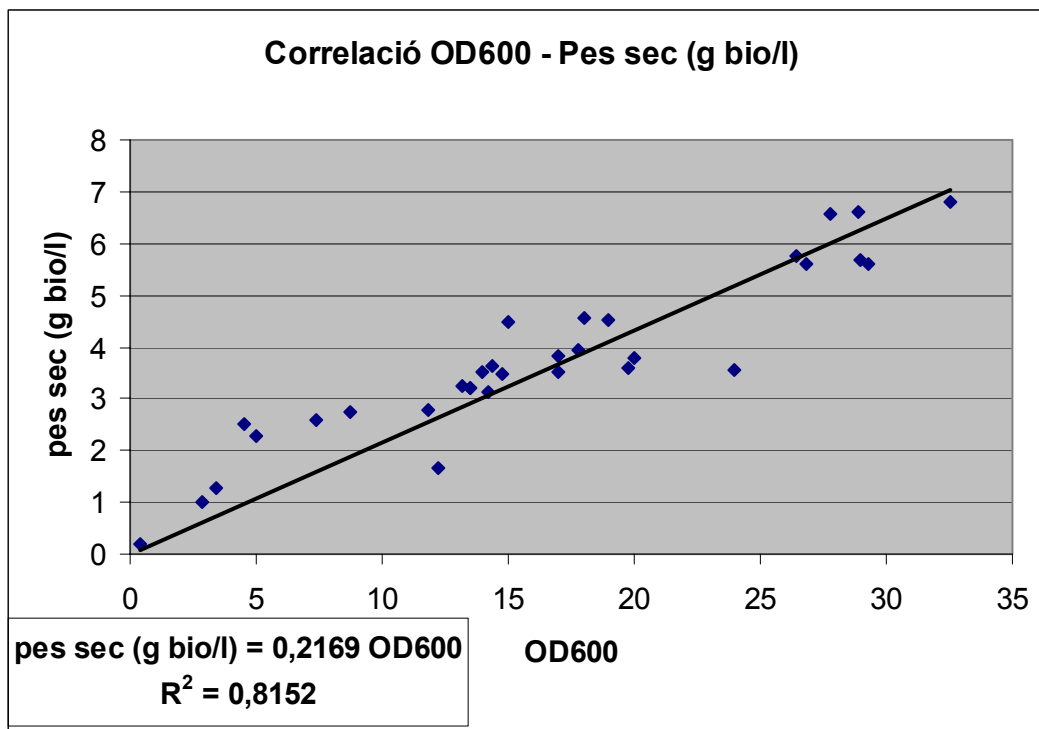
La següent taula mostra les totes les equacions anteriors per al cas en què $F_m=1$.

àtom de carboni	K	Equacions per a $F_m=1$ (normalitzades per a P_1)	
terminal	$K^{(1)}$	$K^{(1)}_S = 1-P_1$	$K^{(1)}_d = P_1$
	$K^{(2)}$	$K^{(2)}_S = [P_n(1-P_n)(1-P_f)]/P_1$	$K^{(2)}_d = [P_n^2(1-P_f)+P_f]/P_1$
central en un fragment C_3 (amb diferent constant d'acoblament)	$K^{(1)}$	$K^{(1)}_S = (1-P_1)^2$	$K^{(1)}_{da} = P_1(1-P_1)$
		$K^{(1)}_{db} = K^{(1)}_{da}$	$K^{(1)}_{dd} = P_1^2$
	$K^{(2a)}$	$K^{(2a)}_S = [P_n(1-P_n)(1-P_1)(1-P_f)]/P_1$	$K^{(2a)}_{da} = [P_n^2(1-P_1)(1-P_f)+P_f(1-P_1)]/P_1$
		$K^{(2a)}_{db} = P_n(1-P_n)(1-P_f)$	$K^{(2a)}_{dd} = P_n^2(1-P_f)+P_f$
	$K^{(2b)}$	$K^{(2b)}_S = K^{(2a)}_S$	$K^{(2b)}_{da} = K^{(2a)}_{db}$
		$K^{(2b)}_{db} = K^{(2a)}_{da}$	$K^{(2b)}_{dd} = K^{(2a)}_{dd}$
$K^{(3)}$	$K^{(3)}_S = [P_n(1-P_n)^2(1-P_f)]/P_1$	$K^{(3)}_{da} = [P_n^2(1-P_n)(1-P_f)]/P_1$	
	$K^{(3)}_{db} = K^{(3)}_{da}$	$K^{(3)}_{dd} = [P_n^3(1-P_f)+P_f]/P_1$	
central en un fragment C_3 (amb igual constant d'acoblament)	$K^{(1)}$	$K^{(1)}_S = (1-P_1)^2$	$K^{(1)}_d = P_1(1-P_1)$
		$K^{(1)}_t = P_1^2$	
	$K^{(2)}$	$K^{(2)}_S = [P_n(1-P_n)(1-P_1)(1-P_f)]/P_1$	$K^{(2)}_d = (1-P_1) \cdot [P_f + (1-P_f) \cdot P_n^2]/P_1 + [(1-P_f) \cdot P_n \cdot (1-P_n)]$
		$K^{(2)}_t = P_f + (1-P_f) \cdot P_n^2$	
	$K^{(3)}$	$K^{(3)}_S = [P_n(1-P_n)^2(1-P_f)]/P_1$	$K^{(3)}_d = (1-P_f) \cdot P_n^2 \cdot (1-P_n)/P_1$
		$K^{(3)}_t = [P_f + (1-P_f) \cdot P_n^3]/P_1$	

6.2. Composició de la *Yeast Nitrogen Base* (Difco)

	<i>Yeast Nitrogen Base</i>	<i>Yeast Nitrogen Base</i> sense aminoàcids ni sulfat amoni
ingredients per litre		
Fonts de nitrogen		
sulfat amoni	5 g	-
Aminoàcids		
monoclorhidrat d'L-histidina	10 mg	-
LD-metionina	20 mg	-
LD-triptòfan	20 mg	-
Vitamines		
biotina	2 µg	2 µg
pantotenat càlcic	400 µg	400 µg
àcid fòlic	2 µg	2 µg
inositol	2000 µg	2000 µg
àcid nicotínic	400 µg	400 µg
àcid p-aminobenzoic, Difco	200 µg	200 µg
clorhidrat de piridoxina	400 µg	400 µg
riboflavina	200 µg	200 µg
clorhidrat de tiamina	400 µg	400 µg
Oligoelements		
àcid bòric	500 µg	500 µg
sulfat de coure	40 µg	40 µg
iodur potàssic	100 µg	100 µg
clorur fèrric	200 µg	200 µg
sulfat de manganès	400 µg	400 µg
molibdat sòdic	200 µg	200 µg
sulfat de zinc	400 µg	400 µg
Sals		
fosfat potàssic monobàsic	1 g	1 g
sulfat de magnesi	0.5 g	0.5 g
clorur sòdic	0.1 g	0.1 g
clorur càlcic	0.1 g	0.1 g
pH final ± 0.2 a 25°C	5.4	4.5

6.3. Correlació OD₆₀₀-Pes sec



6.4. Taules d'intensitats dels multiplets i fragmentòmers

6.4.1 Cultiu continu amb glicerina com a única font de carboni a la velocitat de dilució 0.05h⁻¹

CARBONIS TERMINALS				
cultiu continu amb glicerina $\mu=0.05h^{-1}$				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I _s	I _d	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾
Ala-β	0.164	0.836	0.0509	0.949
Arg-δ	0.183	0.817	0.0759	0.924
Gly-α	0.171	0.829	0.0608	0.939
His-δ2	0.606	0.394	0.64/0.554	0.36/0.446
Ile-γ2	0.18	0.82	0.0722	0.928
Ile-δ	0.516	0.484	0.519	0.481
Leu-δ1	0.18	0.82	0.0715	0.928
Leu-δ2	0.869	0.131	0.989	0.0107
Lys-ε	0.194	0.806	0.0908/0.0206	0.909/0.979
Pro-δ	0.239	0.761	0.15	0.85
Ser-β	0.469	0.531	0.457	0.543
Thr-γ2	0.492	0.508	0.487	0.513
Val-γ1	0.158	0.842	0.0425	0.957
Val-γ2	0.848	0.152	0.961	0.0387

CARBONIS CENTRALS en un fragment C ₃ (amb acoblament escalar diferent)								
cultiu continu amb glicerina $\mu=0.05h^{-1}$								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I _s	I _{da}	I _{db}	I _{dd}	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾	f ^(2*)	f ⁽³⁾
Ala-α	0.124	0.0674	0.0139	0.795	0.0233	0.0616	0	0.915
Asp-α	0.283	0.104	0.355	0.259	0.26	0.087	0.422	0.231
Asp-β	0.282	0.209	0.353	0.155	0.258	0.229	0.421	0.0922
Glu-α	0.274	0.191	0.372	0.163	0.245	0.207	0.447	0.101
Glu-γ	0.112	0	0.769	0.119	0	0	0.996	0.004
His-α	0.137	0.0027	0.0208	0.84	0.04	0	0	0.96
His-β	0.1521	0.714	0.0343	0.0998	0.057	0.925	0.0178	0
Ile-α	0.374	0.0319	0.531	0.063	0.379	0	0.621	0
Leu-α	0.165	0.007	0.762	0.0654	0.06	0	0.94	0
Met-α	0.263	0.134	0.33	0.273	0.229	0.131	0.392	0.247
Phe-α	0.132	0.0154	0.0248	0.828	0.0368	0	0.00353	0.96
Phe-β	0.142	0.771	0	0.0982	0.0333	0.967	0	0
Pro-α	0.306	0.153	0.355	0.186	0.294	0.149	0.419	0.138
Ser-α	0.12	0.00609	0.334	0.54	0.0122	0	0.418	0.57
Thr-α	0.286	0.107	0.342	0.265	0.265	0.0912	0.403	0.24
Tyr-α	0.148	0.00843	0.037	0.807	0.0578	0	0.0142	0.928
Tyr-β	0.136	0.764	0	0.101	0.0247	0.975	0	0
Val-α	0.14	0.02	0.747	0.0926	0.0371	0	0.963	0

CARBONIS CENTRALS en un fragment C ₃ (amb igual acoblament escalar) cultiu continu amb glicerina $\mu=0.05h^{-1}$						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I _s	I _d	I _t	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾	f ⁽³⁾
Arg-β	0.595	0.3841	0.0207	0.712	0.288	0
Glu-β	0.569	0.398	0.0324	0.682	0.318	0
Ile-γ1	0.415	0.498	0.0871	0.459	0.514	0.0266
Leu-β	0.752	0.1991	0.0483	0.924	0.0229	0.0535
Lys-β	0.615	0.35	0.034	0.76	0.24	0
Lys-γ	0.561	0.3734	0.0655	0.682	0.292	0.0262
Lys-δ	0.148	0.7506	0.101	0.048	0.952	0
Pro-β	0.618	0.3865	0	0.718	0.282	0
Pro-γ	0.154	0.708	0.138	0.0618	0.895	0.0435
Thr-β	0.272	0.563	0.166	0.242	0.654	0.104
Tyr-δ _x	0.1358	0.793	0.106	0.0355	0.965	0
Tyr-ε _x	0.482	0.116	0.402	0.559	0	0.441

6.4.2. Cultiu continu amb glicerina com a única font de carboni a la velocitat de dilució 0.16h⁻¹

CARBONIS TERMINALS cultiu continu amb glicerina $\mu=0.16h^{-1}$				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I _s	I _d	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾
Ala-β	0.167	0.833	0.0243	0.976
Arg-δ	0.227	0.773	0.104	0.896
Gly-α	0.21	0.79	0.0814	0.919
His-δ2	0.57	0.43	0.564/0.551	0.436/0.449
Ile-γ2	0.195	0.805	0.0616	0.938
Ile-δ	0.738	0.262	0.788	0.212
Leu-δ1	0.202	0.798	0.0703	0.93
Leu-δ2	0.904	0.0957	1.01	-0.01
Lys-ε	0.23	0.77	0.108/0.0448	0.892/0.955
Pro-δ	0.264	0.736	0.154	0.846
Ser-β	0.488	0.512	0.453	0.547
Thr-γ2	0.714	0.286	0.757	0.243
Val-γ1	0.178	0.822	0.0391	0.961
Val-γ2	0.887	0.113	0.989	0.0111

CARBONIS CENTRAL en un fragment C ₃ (amb diferent acoblament escalar) cultiu continu amb glicerina $\mu=0.16h^{-1}$								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I _s	I _{da}	I _{db}	I _{dd}	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾	f ^(2*)	f ⁽³⁾
Ala- α	0.14	0.0726	0.00303	0.784	0.0099	0.0693	0	0.921
Asp- α	0.225	0.0584	0.164	0.553	0.137	0.0418	0.183	0.637
Asp- β	0.23	0.513	0.149	0.108	0.14	0.656	0.168	0.0364
Glu- α	0.235	0.266	0.312	0.186	0.149	0.323	0.385	0.143
Glu- γ	0.123	0	0.788	0.0962	0	0	1	0
His- α	0.173	0	0.0268	0.807	0.055	0	0.0045	0.94
His- β	0.185	0.734	0.015	0.067	0.0631	0.937	0	0
Ile- α	0.287	0.0104	0.64	0.0627	0.208	0	0.792	0
Leu- α	0.179	0	0.761	0.0619	0.0455	0	0.954	0
Met- α	0.214	0.0889	0.188	0.509	0.121	0.085	0.218	0.576
Phe- α	0.152	0.00885	0.0246	0.814	0.0308	0	0.00446	0.965
Phe- β	0.179	0.776	0	0.0473	0.0354	0.965	0	0
Pro- α	0.317	0.253	0.232	0.198	0.271	0.292	0.265	0.172
Ser- α	0.157	0.00168	0.323	0.519	0.031	0	0.402	0.567
Thr- α	0.224	0.0637	0.152	0.56	0.137	0.0489	0.168	0.647
Tyr- α	0.172	0	0.0352	0.794	0.0576	0	0.0156	0.927
Tyr- β	0.189	0.786	0	0.0315	0.0436	0.956	0	0
Val- α	0.175	0.00968	0.738	0.0773	0.0508	0	0.949	0

CARBONIS CENTRALS en un fragment C ₃ (amb igual acoblament escalar) cultiu continu amb glicerina $\mu=0.16h^{-1}$						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I _s	I _d	I _t	f ⁽¹⁾	f ⁽²⁾	f ⁽³⁾
Arg- β	0.507	0.4365	0.0572	0.555	0.432	0.0132
Glu- β	0.472	0.478	0.0492	0.501	0.499	0
Ile- γ_1	0.64	0.303	0.0573	0.756	0.208	0.0354
Leu- β	0.816	0.1523	0.0312	0.954	0	0.0457
Lys- β	0.513	0.429	0.0582	0.565	0.42	0.0156
Lys- γ	0.511	0.4392	0.0501	0.561	0.435	0.00419
Lys- δ	0.195	0.7401	0.0647	0.07	0.93	0
Pro- β	0.514	0.4386	0.047	0.566	0.433	0.000514
Pro- γ	0.227	0.678	0.0953	0.135	0.847	0.0185
Thr- β	0.218	0.668	0.114	0.122	0.836	0.0425
Tyr- δ_x	0.1721	0.750	0.0781	0.0473	0.953	0
Tyr- ϵ_x	0.511	0.0888	0.401	0.538	0	0.462

6.4.3. Cultiu continu amb glucosa com a única font de carboni a la velocitat de dilució $0.16h^{-1}$

Cultiu 100% glucosa ($\mu = 0.16h^{-1}$)				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.157	0.843	0.011	0.989
Arg- δ	0.216	0.784	0.089	0.911
Gly- α	0.275	0.725	0.168	0.832
His- δ_2	0.317	0.683	0.226	0.774
Ile- γ_2	0.197	0.803	0.064	0.936
Ile- δ	0.780	0.220	0.844	0.156
Leu- δ_1	0.679	0.321	0.709	0.291
Leu- δ_2		n.d.	1	0
Lys- ϵ	0.223	0.777	0.10	0.90
Pro- δ	0.232	0.768	0.112	0.888
Ser- β	0.499	0.501	0.469	0.531
Thr- γ_2	0.76	0.24	0.817	0.183
Val- γ_1	0.874	0.126	0.970	0.030
Val- γ_2	0.184	0.816	0.047	0.953

Cultiu 100% glucosa ($\mu = 0.16h^{-1}$)								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α			n.d.		0	0.139	0.010	0.851
Arg- γ			n.d.		0.051	0.658	0.291	0
Asp- α	0.218	0.113	0.138	0.531	0.120	0.124	0.157	0.599
Asp- β	0.224	0.551	0.127	0.098	0.128	0.709	0.142	0.021
Glu- α	0.283	0.233	0.338	0.146	0.217	0.274	0.414	0.095
Glu- γ			n.d.		0	0.022	0.955	0.023
His- α			n.d.		0.055	0	0.043	0.902
His- β			n.d.		0.126	0.531	0	0.343
Ile- α			n.d.		0.227	0	0.773	0
Leu- α			n.d.		0.060	0	0.940	0
Lys- α	0.175	0.016	0.706	0.103	0.055	0.002	0.923	0.020
Met- α			n.d.		0.14	0	0.21	0.65
Phe- α	0.162	0.090	0.019	0.729	0.034	0.103	0.009	0.854
Phe- β			n.d.		0.059	0.799	0.142	0
Pro- α	0.328	0.246	0.310	0.116	0.285	0.283	0.370	0.062
Ser- α	0.225	0.048	0.292	0.435	0.130	0.036	0.363	0.471
Thr- α	0.245	0.090	0.122	0.543	0.159	0.089	0.132	0.620
Tyr- α	0.161	0.096	0.019	0.724	0.034	0.111	0.008	0.847
Tyr- β			n.d.		0.051	0.949	0	0
Val- α			n.d.		0.132	0	0.868	0

Cultiu 100% glucosa ($\mu = 0.16\text{h}^{-1}$)						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Arg- β	0.535	0.414	0.051	0.596	0.394	0.010
Glu- β		n.d.		0.608	0.392	0
Ile- γ_1	0.632	0.285	0.083	0.742	0.191	0.067
Leu- β		n.d.		0.935	0.065	0
Lys- β		n.d.		0.627	0.373	0
Lys- γ		n.d.		0.660	0.34	0
Lys- δ		n.d.		0.061	0.939	0
Pro- β		n.d.		0.649	0.351	0
Pro- γ	0.214	0.686	0.100	0.115	0.863	0.022
Thr- β	0.228	0.681	0.091	0.135	0.853	0.012
Tyr- δ_x		n.d.		-	-	-
Tyr- ϵ_x	0.357	0.228	0.415	0.328	0.207	0.465

6.4.4. Cultius continus amb glicerina i metanol com a fonts de carboni i marcatge simultani d'ambdós substrats.

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.05\text{ h}^{-1}$

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.05\text{ h}^{-1}$				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.292	0.708	0.241	0.759
Arg- δ	0.254	0.746	0.19	0.81
Gly- α	0.331	0.669	0.295	0.705
His- δ_2	0.63	0.37	0.701	0.299
Ile- γ_2	0.29	0.71	0.239	0.761
Ile- δ	0.605	0.395	0.667	0.333
Leu- δ_1	0.326	0.674	0.287	0.713
Leu- δ_2	0.875	0.125	1	0
Lys- ϵ	0.308	0.692	0.263	0.737
Pro- δ	0.292	0.708	0.241	0.759
Ser- β	0.529	0.471	0.563	0.437
Thr- γ_2	0.585	0.415	0.639	0.361
Val- γ_1	0.286	0.714	0.234	0.766
Val- γ_2		n.d.	1	0

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.247	0.080	0.044	0.629	0.241	0.047	0	0.712
Arg- β	0.568	0.312	0.0718	0.048	0.729	0.271	0	0
Asp- α	0.364	0.086	0.299	0.251	0.423	0.034	0.322	0.221
Asp- β	0.380	0.220	0.273	0.127	0.448	0.212	0.285	0.055
Glu- α	0.294	0.062	0.272	0.372	0.312	0.016	0.301	0.371
Glu- β	0.596	0.188	0.177	0.039	0.785	0.115	0.0992	0
Glu- γ	0.243	0.022	0.642	0.093	0.21	0	0.79	0
His- α	0.270	0.026	0.028	0.676	0.255	0	0	0.745
His- β	0.276	0.635	0.013	0.076	0.239	0.761	0	0
Ile- α		n.d.			n.d.			
Leu- α	0.275	0.007	0.659	0.059	0.234	0	0.766	0
Lys- α	0.228	0.051	0.610	0.111	0.202	0.025	0.773	0
Lys- γ	0.659	0.084	0.249	0.008	0.842	0	0.158	0
Met- α	0.378	0.112	0.271	0.239	0.446	0.065	0.280	0.209
Phe- α	0.264	0.049	0.046	0.641	0.267	0.002	0	0.731
Phe- β	0.283	0.630	0.019	0.068	0.254	0.746	0	0
Pro- α	0.397	0.177	0.320	0.106	0.475	0.150	0.343	0.032
Ser- α	0.263	0.032	0.273	0.432	0.258	0	0.306	0.436
Thr- α	0.353	0.090	0.294	0.263	0.405	0.042	0.318	0.235
Thr- β	0.362	0.364	0.166	0.108	0.418	0.413	0.144	0.025
Tyr- α	0.271	0.061	0.048	0.620	0.278	0.018	0	0.704
Tyr- β	0.299	0.614	0.035	0.052	0.272	0.728	0	0
Tyr- δ_x	0.556	0.086	0.057	0.310	0.683	0	0	0.317
Val- α	0.257	0.023	0.611	0.109	0.239	0	0.761	0

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Ile- γ_1	0.549	0.436	0.015	0.673	0.327	0
Leu- β	0.777	0.209	0.014	1	0	0
Lys- β	0.667	0.324	0.009	0.875	0.125	0
Lys- δ	0.264	0.660	0.076	0.228	0.772	0
Pro- β	0.574	0.377	0.049	0.713	0.264	0.023
Pro- γ	0.248	0.639	0.113	0.236	0.761	0.003
Tyr- ϵ_x		n.d.		0.699	0	0.310

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	f⁽¹⁾	f⁽²⁾
Ala-β	0.175	0.825	0.098	0.902
Arg-δ	0.291	0.709	0.253	0.747
Gly-α	0.20	0.80	0.132	0.868
His-δ2	0.583	0.417	0.637	0.363
Ile-γ2	0.173	0.827	0.096	0.904
Ile-δ	0.856	0.144	1	0
Leu-δ1	0.191	0.809	0.121	0.879
Leu-δ2	0.887	0.113	1	0
Lys-ε	0.275	0.725	0.233	0.767
Pro-δ	0.27	0.73	0.226	0.774
Ser-β	0.432	0.568	0.443	0.557
Thr-γ2	0.797	0.203	0.931	0.069
Val-γ1	0.149	0.851	0.064	0.936
Val-γ2	0.874	0.126	1	0

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C₃ (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	f⁽¹⁾	f⁽²⁾	f^(2*)	f⁽³⁾
Ala-α	0.147	0.057	0.005	0.791	0.093	0.035	0	0.872
Arg-β	0.437	0.34	0.123	0.100	0.552	0.353	0.062	0.033
Asp-α	0.174	0.055	0.085	0.686	0.142	0.028	0.069	0.761
Asp-β	0.186	0.619	0.077	0.118	0.153	0.786	0.061	0
Glu-α	0.250	0.271	0.286	0.193	0.256	0.306	0.326	0.112
Glu-γ	0.165	0.009	0.748	0.078	0.105	0	0.895	0
His-α	0.187	0.030	0	0.783	0.145	0	0	0.855
His-β	0.175	0.695	0.005	0.125	0.125	0.875	0	0
Ile-α	0.234	0.008	0.682	0.076	0.183	0	0.817	0
Leu-α	0.216	0	0.730	0.054	0.16	0	0.84	0
Lys-α	0.238	0.050	0.658	0.054	0.213	0	0.787	0
Lys-β	0.510	0.091	0.362	0.037	0.642	0.001	0.357	0
Lys-γ	0.476	0.441	0.003	0.080	0.590	0.398	0	0.012
Lys-δ	0.262	0.057	0.636	0.045	0.210	0.021	0.769	0
Met-α	0.179	0.098	0.078	0.645	0.150	0.085	0.059	0.706
Phe-α	0.152	0.007	0.017	0.824	0.10	0	0	0.90
Phe-β	0.167	0.768	0	0.065	0.076	0.924	0	0
Pro-α	0.298	0.255	0.269	0.178	0.332	0.273	0.291	0.104
Pro-β	0.486	0.230	0.258	0.026	0.591	0.151	0.258	0
Ser-α	0.145	0.019	0.271	0.565	0.093	0	0.324	0.583
Thr-α	0.179	0.045	0.084	0.692	0.151	0.014	0.065	0.770
Thr-β	0.192	0.440	0.264	0.104	0.154	0.538	0.308	0
Tyr-α	0.157	0.013	0.021	0.809	0.11	0	0	0.89
Tyr-β	0.163	0.757	0.001	0.079	0.091	0.909	0	0
Tyr-ε _x	0.479	0.064	0.028	0.429	0.573	0	0	0.427
Val-α	0.155	0.004	0.733	0.108	0.09	0	0.91	0

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 1), a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Glu- β	0.494	0.506	0	0.584	0.416	0
Ile- γ_1	0.698	0.263	0.039	0.965	0.019	0.016
Leu- β	0.816	0.178	0.006	1	0	0
Pro- γ	0.229	0.661	0.110	0.219	0.781	0
Tyr- δ_x		n.d.			n.d.	

Cultiu continu del 80% glicerina + 20% metanol (MOSTRA 2), a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$

Cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (MOSTRA 2), $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.314	0.686	0.272	0.728
Arg- δ	0.25	0.75	0.185	0.815
Gly- α	0.352	0.648	0.323	0.677
His- δ_2	0.662	0.338	0.744	0.256
Ile- γ_2	0.295	0.795	0.245	0.755
Ile- δ	0.587	0.413	0.642	0.358
Leu- δ_1	0.302	0.698	0.255	0.745
Leu- δ_2	0.91	0.09	1	0
Lys- ϵ	0.289	0.711	0.238	0.762
Pro- δ	0.279	0.721	0.224	0.776
Ser- β	0.501	0.499	0.525	0.475
Thr- γ_2	0.578	0.422	0.631	0.369
Val- γ_1	0.29	0.71	0.238	0.762
Val- γ_2	0.851	0.149	1	0

Cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (MOSTRA 2), $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.269	0.099	0.021	0.611	0.262	0.065	0	0.673
Arg- β	0.552	0.263	0.127	0.058	0.724	0.228	0.044	0.004
Asp- α	0.401	0.094	0.297	0.208	0.483	0.034	0.311	0.172
Asp- β	0.388	0.219	0.288	0.105	0.460	0.209	0.303	0.028
Glu- α	0.427	0.176	0.365	0.032	0.50	0.118	0.382	0
Glu- γ	0.261	0.006	0.657	0.076	0.22	0	0.78	0
His- α	0.256	0.069	0	0.675	0.234	0.028	0	0.738
His- β	0.267	0.637	0.020	0.076	0.256	0.744	0	0
Ile- α	0.440	0.065	0.495	0	0.487	0	0.513	0
Leu- α	0.299	0.011	0.691	0	0.245	0	0.755	0

Lys- α	0.268	0.123	0.609	0	0.244	0.033	0.723	0
Met- α	0.383	0.060	0.294	0.263	0.452	0	0.310	0.238
Phe- α	0.276	0.066	0.002	0.656	0.265	0.022	0	0.713
Phe- β	0.292	0.638	0.039	0.031	0.249	0.751	0	0
Pro- α	0.419	0.233	0.348	0	0.491	0.152	0.357	0
Pro- β	0.422	0.0798	0.280	0.218	0.518	0.0098	0.282	0.190
Ser- α	0.255	0.033	0.271	0.441	0.245	0	0.308	0.447
Thr- α	0.388	0.094	0.309	0.209	0.460	0.038	0.331	0.171
Tyr- α	0.282	0.049	0.008	0.661	0.274	0.002	0	0.724
Tyr- ϵ_x	0.532	0.0828	0.0508	0.334	0.642	0	0	0.358
Val- α	0.299	0.056	0.645	0	0.261	0	0.739	0

Cultiu continu a 80% de glicerina i 20% de metanol (MOSTRA 2), $\mu = 0.05\text{h}^{-1}$						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Glu- β	0.616	0.356	0.028	0.805	0.195	0
Ile- γ_1	0.599	0.401	0	0.743	0.257	0
Leu- β	0.724	0.142	0.134	0.877	0	0.123
Lys- β	0.643	0.315	0.042	0.870	0.125	0.005
Lys- γ	0.591	0.318	0.091	0.788	0.153	0.059
Lys- δ	0.273	0.656	0.071	0.246	0.754	0
Pro- γ	0.25	0.65	0.10	0.229	0.771	0
Thr- β	0.343	0.519	0.138	0.388	0.551	0.061
Tyr- β	0.302	0.671	0.027	0.277	0.723	0
Tyr- δ_x		n.d.			n.d.	

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.05\text{ h}^{-1}$

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.05\text{ h}^{-1}$				
(marcatge simultani de glicerina i metanol)				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.979	0.021	1	0
Arg- δ	0.932	0.068	1	0
Gly- α	0.976	0.024	1	0
His- δ_2	1	0	1	0
Ile- γ_2		n.d.		n.d.
Ile- δ	0.976	0.024	1	0
Leu- δ_1	0.975	0.025	1	0
Leu- δ_2	0.986	0.014	1	0
Lys- ϵ	0.841	0.159	0.962	0.038
Pro- δ		n.d.		n.d.
Ser- β	0.982	0.018	1	0
Thr- γ_2	0.982	0.018	1	0
Val- γ_1	0.988	0.012	1	0
Val- γ_2	0.976	0.024	1	0

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.946	0.025	0.029	0	1	0	0	0
Arg- β	0.901	0.055	0.044	0	1	0	0	0
Asp- α	0.954	0.018	0.016	0.012	1	0	0	0
Asp- β	0.979	0.008	0.013	0	0.990	0	0	0.010
Glu- α	0.948	0.025	0.027	0	1	0	0	0
Glu- β	0.941	0.005	0.035	0.019	0.960	0	0	0.040
Glu- γ	0.972	0.014	0.010	0.004	1	0	0	0
His- α	0.950	0.012	0.022	0.016	1	0	0	0
His- β	0.945	0.011	0.025	0.019	0.961	0	0	0.039
Ile- α	0.982	0.016	0.002	0	1	0	0	0
Ile- γ_1	0.944	0.004	0.019	0.033	0.928	0	0	0.072
Leu- α	0.977	0.006	0.017	0	1	0	0	0
Leu- β	0.914	0.032	0.025	0.029	0.982	0	0	0.018
Lys- α			n.d.				n.d.	
Lys- β	0.970	0.017	0.003	0.010	0.964	0	0	0.036
Lys- γ	0.913	0.024	0.035	0.028	0.973	0	0	0.027
Lys- δ	0.966	0.008	0.029	0	0.99	0	0	0.010
Met- α	0.965	0	0.006	0.029	1	0	0	0
Phe- α	0.918	0.063	0.019	0	1	0	0	0
Phe- β	0.966	0.019	0.010	0.005	1	0	0	0
Pro- α	1	0	0	0	1	0	0	0
Ser- α	0.953	0.025	0.022	0	1	0	0	0
Thr- α	0.980	0.006	0.014	0	1	0	0	0
Thr- β	0.981	0	0.019	0	1	0	0	0
Tyr- α	0.913	0.025	0.014	0.048	1	0	0	0
Tyr- β	1	0	0	0	1	0	0	0
Tyr- ϵ_x	0.993	0.007	0	0	0.987	0	0	0.013
Val- α	0.909	0.055	0.016	0.020	1	0	0	0

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Pro- β	0.962	0.038	0	1	0	0
Pro- γ	0.941	0.059	0	1	0	0
Tyr- δ_x			n.d.			n.d.

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.141	0.859	0.010	0.990
Arg- δ	0.204	0.796	0.096	0.904
Gly- α	0.176	0.824	0.060	0.940
His- δ_2	0.565	0.435	0.587	0.413
Ile- γ_2	0.714	0.286	0.788	0.212
Ile- δ	0.733	0.267	0.814	0.186
Leu- δ_1	0.160	0.840	0.037	0.963
Leu- δ_2	0.862	0.138	0.990	0.010
Lys- ϵ	0.203	0.797	0.097	0.903
Pro- δ	0.230	0.770	0.131	0.869
Ser- β	0.390	0.610	0.350	0.650
Thr- γ_2	0.723	0.277	0.802	0.198
Val- γ_1	0.144	0.856	0.015	0.985
Val- γ_2	0.847	0.153	0.969	0.031

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.111	0.050	0.009	0.83	0	0.044	0	0.956
Arg- β	0.388	0.326	0.163	0.123	0.420	0.368	0.146	0.066
Asp- α	0.160	0.043	0.136	0.661	0.070	0.026	0.152	0.752
Asp- β	0.177	0.556	0.127	0.140	0.090	0.725	0.143	0.042
Glu- α	0.245	0.250	0.323	0.182	0.197	0.295	0.393	0.115
Glu- β	0.518	0.405	0.077	0	0.550	0.450	0	0
Glu- γ	0.111	0.004	0.763	0.122	0	0	1	0
His- α	0.140	0.016	0.029	0.815	0.040	0	0	0.960
His- β	0.163	0.738	0	0.099	0.04	0.960	0	0
Ile- α	0.225	0.001	0.698	0.076	0.141	0	0.859	0
Leu- α	0.152	0	0.763	0.085	0.032	0	0.968	0
Leu- β	0.771	0.132	0.097	0	1	0	0	0
Lys- α	0.149	0.036	0.704	0.111	0.043	0.027	0.930	0
Lys- β	0.515	0.333	0.106	0.046	0.601	0.358	0.041	0
Lys- γ	0.481	0.087	0.357	0.075	0.565	0.024	0.391	0.020
Lys- δ	0.174	0.147	0.610	0.069	0.042	0.156	0.802	0
Met- α	0.166	0.100	0.128	0.606	0.080	0.102	0.140	0.678
Phe- α	0.131	0.024	0.019	0.826	0.022	0.004	0	0.974
Phe- β	0.147	0.787	0	0.066	0.010	0.990	0	0
Pro- α	0.294	0.239	0.318	0.149	0.272	0.270	0.378	0.080
Pro- β	0.515	0.156	0.314	0.015	0.571	0.100	0.329	0
Ser- α	0.119	0.002	0.259	0.620	0	0	0.330	0.670

Thr- α	0.168	0.043	0.132	0.657	0.085	0.024	0.144	0.747
Thr- β	0.169	0.480	0.236	0.115	0.077	0.626	0.290	0.007
Tyr- α	0.134	0.024	0.024	0.818	0.029	0.005	0.001	0.965
Tyr- β	0.137	0.773	0	0.090	0	1	0	0
Tyr- ϵ_x	0.488	0.057	0.066	0.389	0.546	0	0	0.454
Val- α	0.133	0	0.756	0.111	0.016	0	0.984	0

Cultiu continu del 60% glicerina + 40% metanol a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Ile- γ_1	0.601	0.321	0.078	0.755	0.197	0.048
Pro- γ	0.182	0.684	0.134	0.098	0.867	0.035
Tyr- δ_x		n.d.			n.d.	

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.56	0.44	0.57	0.43
Arg- δ	0.59	0.41	0.61	0.39
Gly- α	0.55	0.45	0.55	0.45
His- δ_2	0.79	0.21	0.87	0.13
Ile- γ_2	0.51	0.49	0.50	0.50
Ile- δ	0.70	0.30	0.75	0.25
Leu- δ_1	0.53	0.47	0.53	0.47
Leu- δ_2	0.89	0.11	1	0
Lys- ϵ	0.52	0.48	0.52	0.48
Pro- δ		n.d.		n.d.
Ser- β	0.72	0.28	0.79	0.21
Thr- γ_2	0.69	0.31	0.74	0.26
Val- γ_1	0.54	0.46	0.54	0.46
Val- γ_2	0.87	0.13	0.98	0.02

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.48	0.11	0.08	0.33	0.55	0.05	0.02	0.38
Arg- β	0.69	0.22	0.06	0.03	0.85	0.15	0	0
Asp- α	0.55	0.11	0.20	0.14	0.66	0.04	0.17	0.13
Asp- β	0.56	0.17	0.20	0.07	0.67	0.13	0.17	0.03
Glu- α	0.55	0.15	0.22	0.08	0.66	0.10	0.20	0.04
Glu- β	0.65	0.16	0.15	0.04	0.82	0.09	0.08	0.01
Glu- γ	0.48	0.06	0.41	0.05	0.54	0	0.46	0
His- α	0.48	0.06	0.04	0.41	0.54	0	0	0.46
His- β	0.51	0.43	0.04	0.02	0.55	0.45	0	0
Ile- α	0.57	0.07	0.36	0	0.64	0	0.36	0
Leu- α	0.52	0.04	0.43	0.01	0.55	0	0.45	0
Lys- α	0.42	0.13	0.35	0.10	0.46	0.09	0.40	0.05
Met- α	0.58	0.09	0.20	0.13	0.70	0.01	0.17	0.12
Phe- α	0.44	0.07	0.07	0.42	0.49	0.01	0.01	0.49
Phe- β	0.48	0.44	0.04	0.04	0.51	0.49	0	0
Pro- α	0.55	0.16	0.22	0.07	0.65	0.11	0.20	0.04
Ser- α	0.47	0.06	0.27	0.20	0.53	0	0.28	0.19
Thr- α	0.55	0.10	0.21	0.14	0.66	0.04	0.18	0.12
Thr- β	0.53	0.20	0.19	0.08	0.63	0.18	0.15	0.04
Tyr- α	0.45	0.06	0.07	0.42	0.51	0	0.01	0.48
Tyr- β	0.49	0.39	0.06	0.06	0.56	0.44	0	0
Tyr- ϵ_x	0.63	0.09	0.06	0.22	0.82	0	0	0.18
Val- α	0.47	0.06	0.42	0.05	0.53	0	0.47	0

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Ile- γ_1	0.59	0.35	0.06	0.73	0.25	0.02
Leu- β	0.78	0.19	0.03	0.99	0	0.01
Lys- β	0.66	0.29	0.05	0.82	0.16	0.02
Lys- γ	0.66	0.30	0.04	0.83	0.16	0.01
Lys- δ	0.50	0.46	0.04	0.56	0.44	0
Pro- β	0.61	0.33	0.06	0.74	0.22	0.04
Pro- γ	0.45	0.47	0.08	0.50	0.48	0.02
Tyr- δ_x		n.d.			n.d.	

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)				
CARBONIS TERMINALS				
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet		Abundància relativa de fragments de carbonis intactes	
	I_s	I_d	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$
Ala- β	0.192	0.808	0.072	0.928
Arg- δ	0.226	0.774	0.117	0.883
Gly- α	0.253	0.747	0.154	0.846
His- $\delta 2$	0.538	0.462	0.539	0.461
Ile- $\gamma 2$	0.191	0.809	0.069	0.930
Ile- δ	0.734	0.266	0.804	0.196
Leu- $\delta 1$	0.204	0.796	0.088	0.912
Leu- $\delta 2$	0.889	0.111	1	0
Lys- ϵ	0.233	0.767	0.127	0.873
Pro- δ	0.233	0.767	0.134	0.866
Ser- β	0.575	0.425	0.589	0.411
Thr- $\gamma 2$	0.724	0.276	0.792	0.208
Val- $\gamma 1$	0.202	0.798	0.085	0.915
Val- $\gamma 2$	0.873	0.127	0.993	0.007

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)								
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb acoblament escalar diferent)								
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet				Abundància relativa de fragments de carbonis intactes			
	I_s	I_{da}	I_{db}	I_{dd}	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ala- α	0.164	0.037	0.017	0.782	0.064	0.018	0	0.918
Arg- β	0.507	0.251	0.182	0.060	0.589	0.248	0.155	0.008
Asp- α	0.214	0.052	0.154	0.580	0.142	0.031	0.168	0.660
Asp- β	0.238	0.514	0.147	0.101	0.172	0.657	0.161	0.010
Glu- α	0.259	0.233	0.331	0.177	0.205	0.272	0.404	0.118
Glu- β	0.495	0.286	0.144	0.075	0.570	0.298	0.106	0.026
Glu- γ	0.159	0.017	0.727	0.097	0.046	0	0.953	0
His- α	0.196	0.017	0.022	0.765	0.110	0	0	0.890
His- β	0.206	0.719	0.003	0.072	0.084	0.906	0	0.010
Ile- α	0.248	0.011	0.661	0.081	0.274	0	0.726	0
Ile- $\gamma 1$	0.640	0.242	0.054	0.642	0.761	0.201	0	0.038
Leu- α	0.212	0	0.724	0.067	0.109	0	0.891	0
Lys- α	0.202	0.028	0.679	0.091	0.113	0.005	0.882	0
Lys- β	0.536	0.073	0.349	0.042	0.626	0.002	0.373	0
Lys- γ	0.538	0.295	0.130	0.037	0.624	0.297	0.079	0
Met- α	0.202	0.088	0.133	0.577	0.122	0.081	0.143	0.653
Phe- α	0.184	0.014	0.026	0.775	0.094	0	0	0.906
Phe- β	0.195	0.752	0	0.064	0.076	0.924	0	0
Pro- α	0.303	0.254	0.300	0.143	0.272	0.293	0.354	0.081
Ser- α	0.193	0.021	0.402	0.384	0.108	0	0.510	0.383
Thr- α	0.226	0.054	0.143	0.577	0.159	0.031	0.151	0.659

Thr- β	0.226	0.450	0.216	0.107	0.153	0.573	0.257	0.016
Tyr- α	0.177	0.017	0.030	0.776	0.085	0	0.005	0.910
Tyr- β	0.178	0.752	0.003	0.067	0.057	0.943	0	0
Tyr- ϵ_x	0.503	0.072	0.031	0.394	0.560	0	0	0.440
Val- α	0.165	0.005	0.704	0.126	0.057	0	0.929	0.094

Cultiu continu del 40% glicerina + 60% metanol, a $\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$ (marcatge simultani de glicerina i metanol)						
CARBONIS CENTRALS en un fragment C_3 (amb igual acoblament escalar)						
Carboni observat	Intensitat relativa del multiplet			Abundància relativa de fragments de carbonis intactes		
	I_s	I_d	I_t	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(3)}$
Leu- β	0.767	0.208	0.024	0.987	0	0.013
Lys- δ	0.080	0.920	0	0.080	0.920	0
Pro- β	0.470	0.438	0.092	0.531	0.425	0.045
Pro- γ	0.189	0.688	0.123	0.096	0.873	0.031
Tyr- δ_x		n.d.			n.d.	

6.5. Comprovació de les igualtats i valors coneguts dels fragmentòmers (apartat 4.5.2.3 dels resultats)

6.5.1. Comprovació dels valors dels fragmentòmers coneguts a priori

Cultiu 40% glicerina i 60% metanol

Àtom de carboni	Continu 40% glicerina + 60% metanol (marcatge simultani de la glicerina i el metanol)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ile- α	0.64	0	0.36	0	0.27	0	0.73	0
Ile- γ 1	0.73	0.25	-	0.02	0.76	0.20	0	0.04
Leu- α	0.55	0	0.45	0	0.11	0	0.89	0
Leu- β	0.99	0	-	0.01	0.99	0	-	0.01
Leu- δ 2	1	0	-	-	1	0	-	-
Lys- α	0.46	0.09	0.40	0.05	0.11	0.01	0.88	0
Lys- β	0.82	0.16	-	0.02	0.63	0	0.37	0
Phe- β	0.51	0.49	0	0	0.08	0.92	0	0
Tyr- β	0.56	0.44	0	0	0.06	0.94	0	0
Tyr- δ_x		n.d.				n.d.		
Val- α	0.53	0	0.47	0	0.06	0	0.93	0.01
Val- γ 2	0.98	0.02	-	-	0.99	0.1	-	-

Cultiu 60% glicerina i 40% metanol

Àtom de carboni	Continu 60% glicerina + 40% metanol (marcatge simultani de la glicerina i el metanol)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ile- α					0.14	0	0.86	0
Ile- γ 1					0.75	0.20	-	0.05
Leu- α					0.03	0	0.97	0
Leu- β					1	0	0	0
Leu- δ 2					0.99	0.01	-	-
Lys- α					0.04	0.03	0.93	0
Lys- β		n.d.			0.60	0.36	0.04	0
Phe- β					0.01	0.99	0	0
Tyr- β					0	1	0	0
Tyr- δ_x					-	-	-	-
Val- α					0.02	0	0.98	0
Val- γ 2					0.97	0.03	-	-

Cultiu 80% glicerina i 20% metanol

Àtom de carboni	Contínu 80% glicerina + 20% metanol (marcatge simultani de la glicerina i el metanol)							
	μ 0.05 h ⁻¹				μ 0.16 h ⁻¹			
	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$	$f^{(1)}$	$f^{(2)}$	$f^{(2*)}$	$f^{(3)}$
Ile- α	0.49	0	0.51	0	0.18	0	0.82	0
Ile- γ 1	0.67	0.33	-	0	0.96	0.02	-	0.02
Leu- α	0.23	0	0.77	0	0.16	0	0.84	0
Leu- β	1	0	-	0	1	0	-	0
Leu- δ 2	1	0	-	-	1	0	-	-
Lys- α	0.20	0.03	0.77	0	0.21	0	0.79	0
Lys- β	0.88	0.12	-	0	0.64	0.36	-	0
Phe- β	0.25	0.75	0	0	0.08	0.92	0	0
Tyr- β	0.27	0.73	0	0	0.09	0.91	0	0
Tyr- δ_x	0.68	0	-	0.32	-	-	-	-
Val- α	0.24	0	0.76	0	0.09	0	0.91	0
Val- γ 2	1	0	-	-	1	0	-	-

Només és incorrecte el valor de Tyr- δ_x .

6.5.2. Comprovació de les igualtats entre fragmentòmers (i relacions entre aquests) conegudes a priori

Els errors estan calculats de la següent manera:

$$\% \text{ error} = 100 \cdot |(1^{\text{er}} \text{ terme} - 2^{\text{on}} \text{ terme}) / 1|$$

Cultiu 40% glicerina i 60% metanol

Cultiu continu 40% glicerina + 60% metanol (marcatge doble de la glicerina i el metanol)						
IGUALTAT	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$			$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		
	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error
$f^{(1)}\{\text{Ala-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Val-}\gamma 1\}$	0.55	0.54	1	0.06	0.08	2
$f^{(1)}\{\text{Ala-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Leu-}\delta 1\}$	0.55	0.53	2	0.06	0.09	3
$f^{(1)}\{\text{Ala-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Ile-}\gamma 2\}$	0.55	0.50	5	0.06	0.07	1
$f^{(1)}\{\text{Val-}\gamma 1\} = f^{(1)}\{\text{Leu-}\delta 1\}$	0.54	0.53	1	0.08	0.09	1
$f^{(1)}\{\text{Val-}\gamma 1\} = f^{(1)}\{\text{Ile-}\gamma 2\}$	0.54	0.50	4	0.08	0.07	1
$f^{(1)}\{\text{Leu-}\delta 1\} = f^{(1)}\{\text{Ile-}\gamma 2\}$	0.53	0.50	3	0.09	0.07	2
$f^{(3)}\{\text{Ala-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Ala-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Val-}\alpha\}$	0.38+0.02= 0.40	0.47	7	0+0.92= 0.92	0.93	1
$f^{(1)}\{\text{Ala-}\alpha\} + f^{(2)}\{\text{Ala-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Val-}\alpha\}$	0.55+0.05= 0.60	0.53	7	0.06+0.02= 0.08	0.06	2
$f^{(i)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Met-}\alpha\}$	0.66	0.70	4	0.14	0.12	2
	0.04	0.01	3	0.03	0.08	5
	0.17	0.17	0	0.17	0.14	3
	0.13	0.12	1	0.66	0.66	0

$f^{(i)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.66 0.04 0.17 0.13	0.66 0.04 0.18 0.12	0 0 1 1	0.14 0.03 0.17 0.66	0.16 0.03 0.15 0.66	2 0 2 0
$f^{(i)}\{\text{Met-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.70 0.01 0.17 0.12	0.66 0.04 0.18 0.12	4 3 1 0	0.12 0.08 0.14 0.66	0.16 0.03 0.15 0.66	4 5 1 0
$f^{(i)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.67 0.13 0.17 0.03	0.63 0.18 0.15 0.04	3 5 2 1	0.17 0.66 0.16 0.01	0.15 0.57 0.26 0.02	2 9 10 1
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Thr-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.17+0.13= 0.30	0.18+0.12= 0.30	0	0.17+0.66= 0.83	0.15+0.66= 0.81	2
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Met-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Met-}\alpha\}$	0.17+0.13= 0.30	0.17+0.12= 0.29	1	0.17+0.66= 0.83	0.14+0.66= 0.80	3
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Ile-}\alpha\}$	0.17+0.13= 0.30	0.36	6	0.17+0.66= 0.83	0.73	10
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Ile-}\delta 1\}$	0.17+0.03= 0.20	0.25	5	0.16+0.01= 0.17	0.20	3
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.66 0.10 0.20 0.04	0.65 0.11 0.20 0.04	1 1 0 0	0.21 0.27 0.40 0.12	0.27 0.29 0.36 0.08	6 2 4 4
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\beta\}$	0.82	0.74	8	0.57	0.53	4
$f^{(2)}\{\text{Glu-}\beta\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Pro-}\beta\}$	0.09+0.08= 0.17	0.22	5	0.30+0.11= 0.41	0.43	2
$f^{(3)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(3)}\{\text{Pro-}\beta\}$	0.01	0.04	3	0.02	0.04	2
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\gamma\}$	0.82	0.83	1	0.57	0.62	5
$f^{(2)}\{\text{Glu-}\beta\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Lys-}\gamma\}$	0.09+0.08= 0.17	0.16	1	0.30+0.11= 0.41	0.30	9
$f^{(3)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(3)}\{\text{Lys-}\gamma\}$	0.01	0.01	0	0.02	0.08	6
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(i)}\{\text{Leu-}\alpha\}$	0.54 0 0.46 0	0.55 0 0.45 0	1 0 1 0	0.05 0 0.95 0	0.11 0 0.89 0	6 0 6 0
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0.54	0.50	4	0.05	0.10	5
$f^{(2)}\{\text{Glu-}\gamma\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(2)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0+0.46= 0.46	0.48	2	0+0.95= 0.95	0.87	8
$f^{(3)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(3)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0	0.02	2	0	0.03	3
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.54+0.46 = 1	0.65+0.20= 0.85	15	0.05+0.95= 1	0.27+0.35= 0.62	38
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\beta\}$	0.54+0.46 = 1	0.82	18	0.05+0.95= 1	0.63	37
$f^{(1)}\{\text{Leu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\alpha\}$	0.55	0.42	8	0.11	0.11	0
$f^{(2*)}\{\text{Leu-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Lys-}\alpha\}$	0.45	0.40	5	0.89	0.88	1
$f^{(i)}\{\text{Phe-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Tyr-}\alpha\}$	0.49 0.01 0.01 0.49	0.51 0 0.01 0.48	2 1 0 1	0.09 0 0 0.91	0.09 0 0 0.91	0 0 0 0
$f^{(i)}\{\text{Phe-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Tyr-}\beta\}$	0.51 0.49 0 0	0.56 0.44 0 0	5 5 0 0	0.08 0.92 0 0	0.06 0.94 0 0	2 2 0 0

$f^{(i)} \{Pro-\delta\} = f^{(i)} \{Lys-\epsilon\}$	-	-		0.13 0.87	0.13 0.87	0 0
$f^{(1)} \{Thr-\gamma\} = f^{(1)} \{Ile-\delta1\}$	0.74	0.75	1	0.79	0.80	1
$f^{(2)} \{Thr-\gamma\} = f^{(2)} \{Ile-\delta1\}$	0.26	0.25	1	0.21	0.20	1

Cultiu 60% glicerina i 40% metanol

Cultiu continu 60% glicerina + 40% metanol (marcatge doble de la glicerina i el metanol)						
IGUALTAT	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$			$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		
	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Val-\gamma1\}$	n.d.			0.01	0.02	1
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Leu-\delta1\}$	n.d.			0.01	0.04	3
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma2\}$	n.d.			0.01	0.79	78
$f^{(1)} \{Val-\gamma1\} = f^{(1)} \{Leu-\delta1\}$	n.d.			0.02	0.04	2
$f^{(1)} \{Val-\gamma1\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma2\}$	n.d.			0.02	0.79	77
$f^{(1)} \{Leu-\delta1\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma2\}$	n.d.			0.04	0.79	75
$f^{(3)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2*)} \{Ala-\alpha\} = f^{(2*)} \{Val-\alpha\}$	n.d.			0.96 + 0 = 0.96	0.98	2
$f^{(1)} \{Ala-\alpha\} + f^{(2)} \{Ala-\alpha\} = f^{(1)} \{Val-\alpha\}$	n.d.			0 + 0.04 = 0.04	0.02	2
$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Met-\alpha\}$	n.d.			0.07 0.03 0.15 0.75	0.08 0.10 0.14 0.68	1 7 1 7
$f^{(i)} \{Asp-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\}$	n.d.			0.07 0.03 0.15 0.75	0.09 0.02 0.14 0.75	2 1 1 0
$f^{(i)} \{Met-\alpha\} = f^{(i)} \{Thr-\alpha\}$	n.d.			0.08 0.10 0.14 0.68	0.09 0.02 0.14 0.75	1 8 0 7
$f^{(i)} \{Asp-\beta\} = f^{(i)} \{Thr-\beta\}$	n.d.			0.42 0.37 0.15 0.06	0.08 0.62 0.29 0.01	34 25 14 5
$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Thr-\alpha\} + f^{(3)} \{Thr-\alpha\}$	n.d.			0.15 + 0.75 = 0.90	0.14 + 0.75 = 0.89	1
$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Met-\alpha\} + f^{(3)} \{Met-\alpha\}$	n.d.			0.15 + 0.75 = 0.90	0.14 + 0.68 = 0.82	8
$f^{(2*)} \{Asp-\alpha\} + f^{(3)} \{Asp-\alpha\} = f^{(2*)} \{Ile-\alpha\}$	n.d.			0.15 + 0.75 = 0.90	0.86	4
$f^{(2*)} \{Asp-\beta\} + f^{(3)} \{Asp-\beta\} = f^{(2)} \{Ile-\delta1\}$	n.d.			0.15 + 0.06 = 0.21	0.19	2

$f^{(i)} \{Glu-\alpha\} = f^{(i)} \{Pro-\alpha\}$	n.d.	0.20 0.30 0.39 0.11	0.27 0.27 0.38 0.08	7 3 1 3
$f^{(i)} \{Glu-\beta\} = f^{(i)} \{Pro-\beta\}$	n.d.	0.55 0.45 0 0	0.57 0.10 0.33 0	2 35 33 0
$f^{(1)} \{Glu-\beta\} = f^{(1)} \{Lys-\gamma\}$	n.d.	0.55	0.56	1
$f^{(2)} \{Glu-\beta\} + f^{(2*)} \{Glu-\beta\} = f^{(2)} \{Lys-\gamma\}$	n.d.	0.45 + 0 = 0.45	0.02	43
$f^{(3)} \{Glu-\beta\} = f^{(3)} \{Lys-\gamma\}$	n.d.	0	0.02	2
$f^{(i)} \{Glu-\gamma\} = f^{(i)} \{Leu-\alpha\}$	n.d.	0 0 1 0	0.03 0 0.97 0	3 0 3 0
$f^{(1)} \{Glu-\gamma\} = f^{(1)} \{Pro-\gamma\}$	n.d.	0	0.10	10
$f^{(2)} \{Glu-\gamma\} + f^{(2*)} \{Glu-\gamma\} = f^{(2)} \{Pro-\gamma\}$	n.d.	0 + 1 = 1	0.87	13
$f^{(3)} \{Glu-\gamma\} = f^{(3)} \{Pro-\gamma\}$	n.d.	0	0.03	3
$f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} = f^{(1)} \{Pro-\alpha\} + f^{(2*)} \{Pro-\alpha\}$	n.d.	0.20 + 0.39 = 0.59	0.27 + 0.38 = 0.65	6
$f^{(1)} \{Glu-\alpha\} + f^{(2*)} \{Glu-\alpha\} = f^{(1)} \{Lys-\beta\}$	n.d.	0.20 + 0.39 = 0.59	0.60	1
$f^{(1)} \{Leu-\alpha\} = f^{(1)} \{Lys-\alpha\}$	n.d.	0.03	0.04	1
$f^{(2*)} \{Leu-\alpha\} = f^{(2*)} \{Lys-\alpha\}$	n.d.	0.97	0.93	4
$f^{(i)} \{Phe-\alpha\} = f^{(i)} \{Tyr-\alpha\}$	n.d.	0.02 0.01 0 0.97	0.03 0 0 0.97	1 1 0 0
$f^{(i)} \{Phe-\beta\} = f^{(i)} \{Tyr-\beta\}$	n.d.	0.01 0.99 0 0	0 1 0 0	1 1 0 0
$f^{(i)} \{Pro-\delta\} = f^{(i)} \{Lys-\epsilon\}$	n.d.	0.13 0.87	0.10 0.90	3 3
$f^{(1)} \{Thr-\gamma\} = f^{(1)} \{Ile-\delta1\}$	n.d.	0.80	0.81	1
$f^{(2)} \{Thr-\gamma\} = f^{(2)} \{Ile-\delta1\}$	n.d.	0.20	0.19	1

Cultiu 80% glicerina i 20% metanol

Cultiu continu 80% glicerina + 20% metanol (marcatge doble de la glicerina i el metanol)						
IGUALTAT	$\mu = 0.05 \text{ h}^{-1}$			$\mu = 0.16 \text{ h}^{-1}$		
	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error	1 ^{er} terme	2 ^{on} terme	% error
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Val-\gamma1\}$	0.24	0.23	1	0.10	0.06	4
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Leu-\delta1\}$	0.24	0.29	5	0.10	0.12	2
$f^{(1)} \{Ala-\beta\} = f^{(1)} \{Ile-\gamma2\}$	0.24	0.24	0	0.10	0.10	0

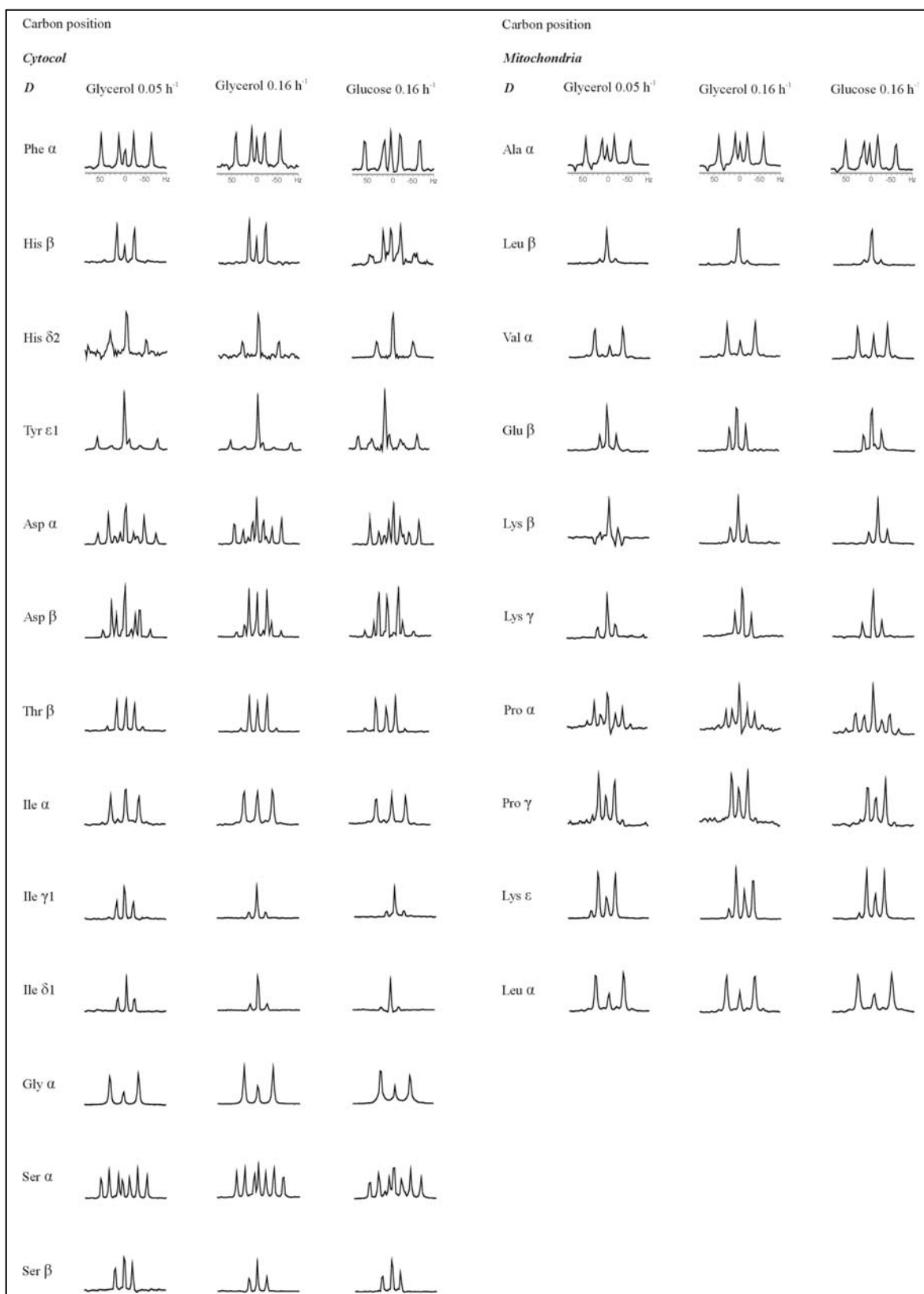
$f^{(1)}\{\text{Val-}\gamma 1\} = f^{(1)}\{\text{Leu-}\delta 1\}$	0.23	0.29	6	0.06	0.12	6
$f^{(1)}\{\text{Val-}\gamma 1\} = f^{(1)}\{\text{Ile-}\gamma 2\}$	0.23	0.24	1	0.06	0.10	4
$f^{(1)}\{\text{Leu-}\delta 1\} = f^{(1)}\{\text{Ile-}\gamma 2\}$	0.29	0.24	5	0.12	0.10	2
$f^{(3)}\{\text{Ala-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Ala-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Val-}\alpha\}$	0.71+0 = 0.71	0.76	5	0.87+0 = 0.87	0.91	4
$f^{(1)}\{\text{Ala-}\alpha\} + f^{(2)}\{\text{Ala-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Val-}\alpha\}$	0.24+0.05 = 0.29	0.24	5	0.09+0.04 = 0.13	0.09	4
$f^{(i)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Met-}\alpha\}$	0.42	0.45	3	0.14	0.15	1
	0.04	0.06	2	0.03	0.08	5
	0.32	0.28	4	0.07	0.06	1
	0.22	0.21	1	0.76	0.71	5
$f^{(i)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.42	0.40	2	0.14	0.15	1
	0.04	0.04	0	0.03	0.01	2
	0.32	0.32	0	0.07	0.07	0
	0.22	0.24	2	0.76	0.77	1
$f^{(i)}\{\text{Met-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.45	0.40	5	0.15	0.15	0
	0.06	0.04	2	0.08	0.01	7
	0.28	0.32	4	0.06	0.07	1
	0.21	0.24	3	0.71	0.77	6
$f^{(i)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Thr-}\beta\}$ on $f^{(2)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Thr-}\beta\}$	0.45	0.42	3	0.15	0.15	0
	0.21+0.29	0.56	6	0.79+0.06	0.85	0
	0.05	0.02	3	0	0	0
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Thr-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Thr-}\alpha\}$	0.32+0.22 = 0.54	0.32+0.24 = 0.56	2	0.07+0.76 = 0.83	0.07+0.77 = 0.84	1
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Met-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Met-}\alpha\}$	0.32+0.22 = 0.54	0.28+0.21 = 0.49	5	0.07+0.76 = 0.83	0.06+0.71 = 0.77	6
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\alpha\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\alpha\} = f^{(2*)}\{\text{Ile-}\alpha\}$	0.32+0.22 = 0.54	0.51	3	0.07+0.76 = 0.83	0.82	1
$f^{(2*)}\{\text{Asp-}\beta\} + f^{(3)}\{\text{Asp-}\beta\} = f^{(2)}\{\text{Ile-}\delta 1\}$	0.29+0.05 = 0.34	0.33	1	0.06+0 = 0.06	0	6
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.31	0.48	9	0.26	0.33	7
	0.02	0.15	13	0.30	0.27	3
	0.30	0.34	4	0.33	0.29	4
	0.37	0.03	34	0.11	0.11	0
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Pro-}\beta\}$	0.78	0.71	7	0.58	0.59	1
	0.22	0.26	4	0.42	0.41	1
	0	0.03	3	0	0	0
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\beta\} = f^{(i)}\{\text{Lys-}\gamma\}$	0.78	0.84	6	0.58	0.59	1
	0.22	0.16	6	0.42	0.40	2
	0	0	0	0	0.01	1
$f^{(i)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(i)}\{\text{Leu-}\alpha\}$	0.21	0.23	2	0.10	0.16	6
	0	0	0	0	0	0
	0.79	0.77	2	0.90	0.84	6
	0	0	0	0	0	0
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0.21	0.24	3	0.10	0.22	12
$f^{(2)}\{\text{Glu-}\gamma\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(2)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0+0.79 = 0.79	0.76	3	0+0.90 = 0.90	0.78	12
$f^{(3)}\{\text{Glu-}\gamma\} = f^{(3)}\{\text{Pro-}\gamma\}$	0	0	0	0	0	0
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Pro-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Pro-}\alpha\}$	0.31+0.30 = 0.61	0.48+0.34 = 0.82	21	0.26+0.33 = 0.59	0.33+0.29 = 0.62	3
$f^{(1)}\{\text{Glu-}\alpha\} + f^{(2*)}\{\text{Glu-}\alpha\} = f^{(1)}\{\text{Lys-}\beta\}$	0.31+0.30 = 0.61	0.88	27	0.26+0.33 = 0.59	0.64	5

$f^{(1)} \{Leu-\alpha\} = f^{(1)} \{Lys-\alpha\}$	0.23	0.20	3	0.16	0.21	5
$f^{(2*)} \{Leu-\alpha\} = f^{(2*)} \{Lys-\alpha\}$	0.77	0.77	0	0.84	0.79	5
$f^{(i)} \{Phe-\alpha\} = f^{(i)} \{Tyr-\alpha\}$	0.27	0.28	1	0.10	0.11	1
	0	0.02	2	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0.73	0.70	3	0.90	0.89	1
$f^{(i)} \{Phe-\beta\} = f^{(i)} \{Tyr-\beta\}$	0.25	0.27	2	0.08	0.09	1
	0.75	0.73	2	0.92	0.91	1
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
$f^{(i)} \{Pro-\delta\} = f^{(i)} \{Lys-\epsilon\}$	0.24	0.26	2	0.23	0.23	0
	0.76	0.74	2	0.77	0.77	0
$f^{(1)} \{Thr-\gamma\} = f^{(1)} \{Ile-\delta_1\}$	0.64	0.67	3	0.93	1	7
$f^{(2)} \{Thr-\gamma\} = f^{(2)} \{Ile-\delta_1\}$	0.36	0.33	3	0.07	0	7

En general es poden considerar que les dades són vàlides, malgrat les diferències entre algunes igualtats. Tot i així, els fragmentòmers que presenten una desviació més important són els de la Pro- α i Glu- α , de manera que en els càlculs METAFoR on aquests s'utilitzin caldrà anar amb compte.

6.6. Seccions transversals al llarg de l'eix $\omega_1(^{13}\text{C})$ dels espectres 2D

Mostra d'algunes de les seccions transversals preses al llarg de l'eix $\omega_1(^{13}\text{C})$ de l'espectre 2D dels cultius continus amb glicerina i glucosa com a úniques fonts de carboni (apartats 4.3 i 4.4 dels resultats).



6.7. Document Matlab emprat a l'apartat 4.5.1 dels resultats per al càlcul dels fragmentòmers dels cultius continus amb alimentació simultània de glicerina i metanol i marcatge únic de glicerina

```

% apartat 4.5.1.2 (marcatge unic glicerina)
% equacions de probabilitat, K (normalitzades per a P1)
% calcul dels fragmentomers per a un carboni determinat
% cultiu continu 80%glicerina+20%metanol (marcatge unic glic)

%per a cada carboni observat, varia el seu grau de marcatge

P1=input('quin es el valor de P1?')

%per a un mateix experiment, Pn, Pf i Fm es conserven:

disp('els valors de les probabilitats son:')

Pn=0.011
Pf=0.0865
Fm=0.699

r = input('Pn, Pf i Fm son correctes? (\'s\'/\'n\')')

if r=='n'

Pn=input('quin es el valor de Pn?')
Pf=input('quin es el valor de Pf?')
Fm=input('quin es el valor de Fm?')

end

disp('quin tipus de carboni estas observant?')
c = input('terminal (1), central amb igual constant acoblament (2) o
central amb diferent constant acoblament (3)')

if c==1

% carboni terminal:
disp('per a un carboni terminal:')

K1S = (1-P1);
K2S = ((1-Fm)*Pn*(1-Pn)+Fm*(1-Pf)*Pn*(1-Pn))/P1;
K1d = P1;
K2d = (Fm*Pf + (1-Fm)*Pn^2 + Fm*(1-Pf)*Pn^2)/P1;

Is=input('quin es el valor de Is?')
Id=input('quin es el valor de Id?')

A=[K1S K2S;
   K1d K2d];

B=[Is
   Id];

F=A\B

total=sum(F)
Fnormal=F/total
totalnormal=sum(Fnormal)

```

```

for i=1:2
    if Fnormal(i) <0
        Fnormal(i)=0
    end
end

totalnormal2=sum(Fnormal)
Fnormal2=Fnormal/totalnormal2
totalnormal2=sum(Fnormal2)

elseif c==2

% carboni central en fragment amb IGUAL constant d'acoblament:
disp('per a un carboni central amb IGUAL constant acoblament:')

K1S = (1-P1)^2;
K2S = (1-P1)*((1-Fm)*Pn*(1-Pn)+Fm*(1-Pf)*Pn*(1-Pn))/P1;
K3S = ((1-Fm)*Pn*(1-Pn)*(1-Pn)+Fm*(1-Pf)*Pn*(1-Pn)*(1-Pn))/P1;
K1d = P1*(1-P1);
K2d = ((1-P1)*[Fm*Pf+(1-Fm)*Pn^2+Fm*(1-Pf)*Pn^2]+P1*((1-Fm)*Pn*(1-
Pn)+Fm*(1-Pf)*Pn*(1-Pn)))/P1;
K3d = ((1-Fm)*Pn^2*(1-Pn)+Fm*(1-Pf)*Pn^2*(1-Pn))/P1;
K1t = P1^2;
K2t = Fm*Pf + (1-Fm)*Pn^2 + Fm*(1-Pf)*Pn^2;
K3t = (Fm*Pf + (1-Fm)*Pn^3 + Fm*(1-Pf)*Pn^3)/P1;

Is=input('quin es el valor de Is?')
Id=input('quin es el valor de Id?')
It=input('quin es el valor de It?')

A=[K1S K2S K3S;
    K1d K2d K3d;
    K1t K2t K3t];

B=[Is
    Id
    It];

F=A\B

total=sum(F)
Fnormal=F/total
totalnormal=sum(Fnormal)

for i=1:3
    if Fnormal(i) <0
        Fnormal(i)=0
    end
end

totalnormal2=sum(Fnormal)
Fnormal2=Fnormal/totalnormal2
totalnormal2=sum(Fnormal2)

elseif c==3

% carboni central en fragment amb DIFERENT constant d'acoblament:
disp('per a un carboni central amb DIFERENT constant acoblament:')

K1S = (1-P1)^2;
K2aS = (1-P1)*((1-Fm)*Pn*(1-Pn)+Fm*(1-Pf)*Pn*(1-Pn))/P1;

```

```

K2bS = (1-P1) * ((1-Fm) * Pn * (1-Pn) + Fm * (1-Pf) * Pn * (1-Pn)) / P1;
K3S = ((1-Fm) * Pn * (1-Pn) * (1-Pn) + Fm * (1-Pf) * Pn * (1-Pn) * (1-Pn)) / P1;

K1da = P1 * (1-P1);
K2ada = (1-P1) * (Fm * Pf + (1-Fm) * Pn^2 + Fm * (1-Pf) * Pn^2) / P1;
K2bda = (1-Fm) * Pn * (1-Pn) + Fm * (1-Pf) * Pn * (1-Pn);
K3da = ((1-Fm) * Pn^2 * (1-Pn) + Fm * (1-Pf) * Pn^2 * (1-Pn)) / P1;

K1db = P1 * (1-P1);
K2adb = (1-Fm) * Pn * (1-Pn) + Fm * (1-Pf) * Pn * (1-Pn);
K2bdb = (1-P1) * (Fm * Pf + (1-Fm) * Pn^2 + Fm * (1-Pf) * Pn^2) / P1;
K3db = ((1-Fm) * Pn^2 * (1-Pn) + Fm * (1-Pf) * Pn^2 * (1-Pn)) / P1;

K1dd = P1^2;
K2add = Fm * Pf + (1-Fm) * Pn^2 + Fm * (1-Pf) * Pn^2;
K2bdd = Fm * Pf + (1-Fm) * Pn^2 + Fm * (1-Pf) * Pn^2;
K3dd = (Fm * Pf + (1-Fm) * Pn^3 + Fm * (1-Pf) * Pn^3) / P1;

Is=input('quin es el valor de Is?')
Ida=input('quin es el valor de Ida?')
Idb=input('quin es el valor de Idb?')
Idd=input('quin es el valor de Idd?')

A=[K1S K2aS K2bS K3S;
   K1da K2ada K2bda K3da;
   K1db K2adb K2bdb K3db;
   K1dd K2add K2bdd K3dd];

B=[Is
   Ida
   Idb
   Idd];

F=A\B

total=sum(F)
Fnormal=F/total
totalnormal=sum(Fnormal)

for i=1:4
    if Fnormal(i) <0
        Fnormal(i)=0
    end
end

totalnormal2=sum(Fnormal)
Fnormal2=Fnormal/totalnormal2
totalnormal2=sum(Fnormal2)

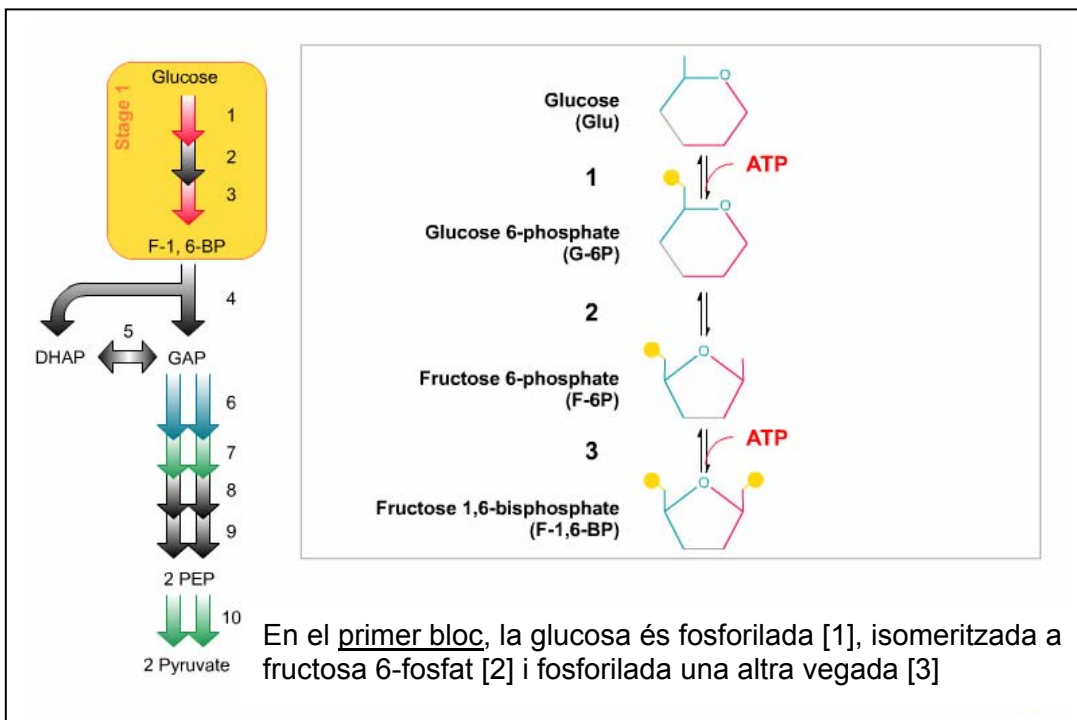
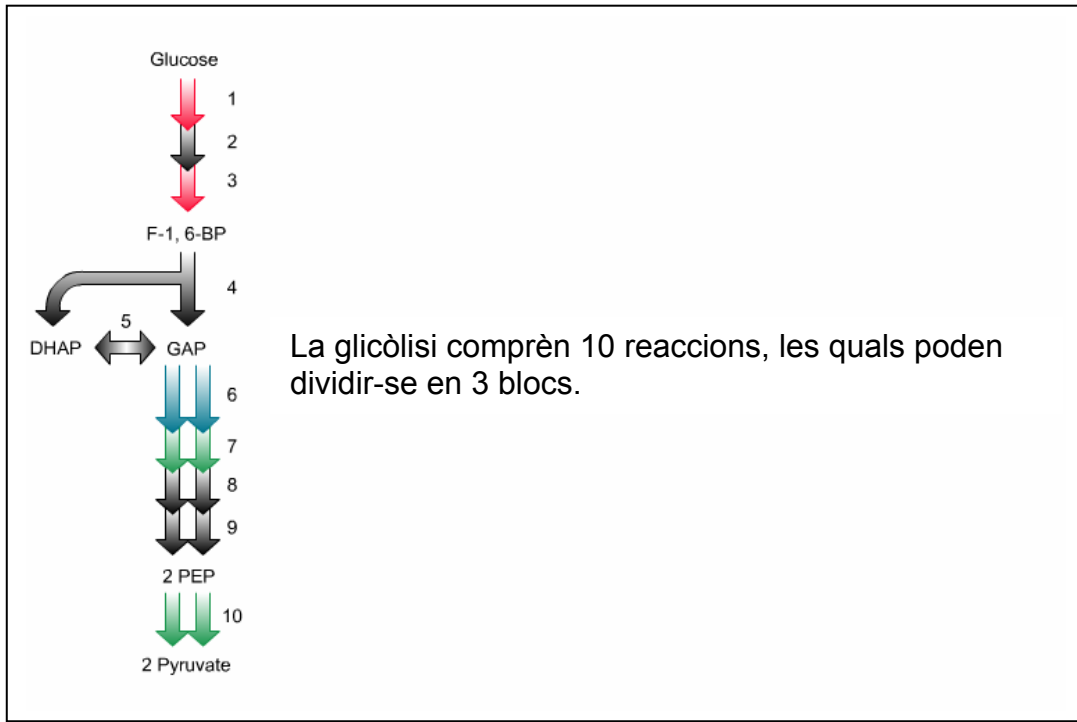
else
    disp('pots escollir nomes entre 1, 2 i 3')
end

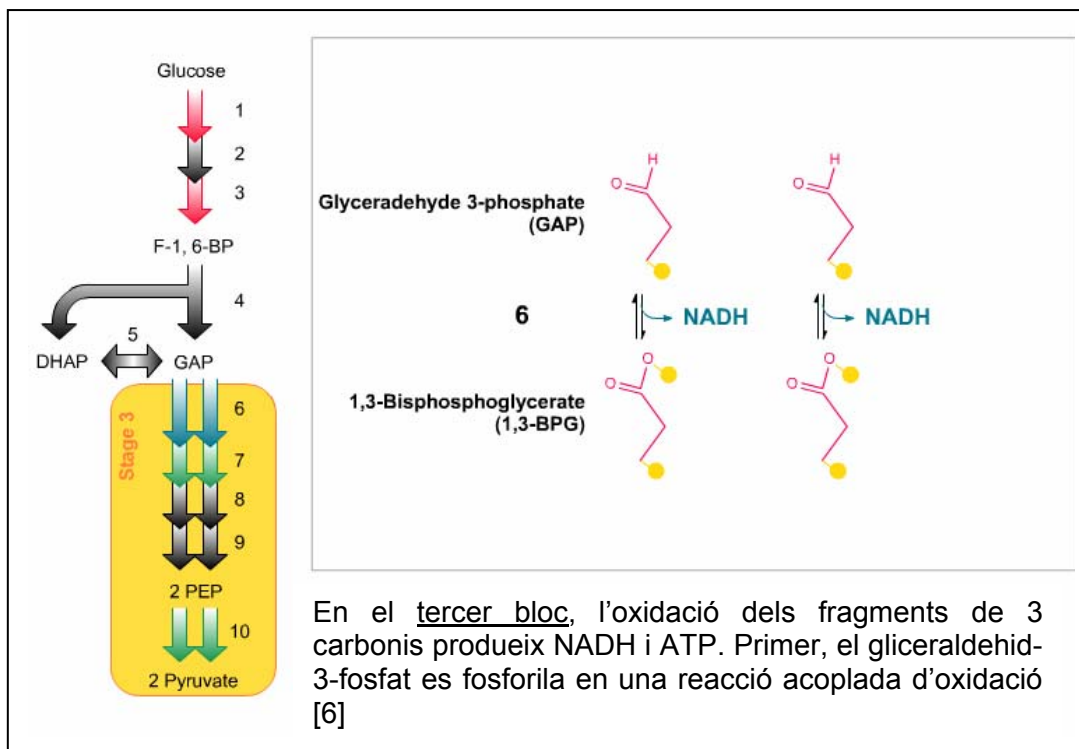
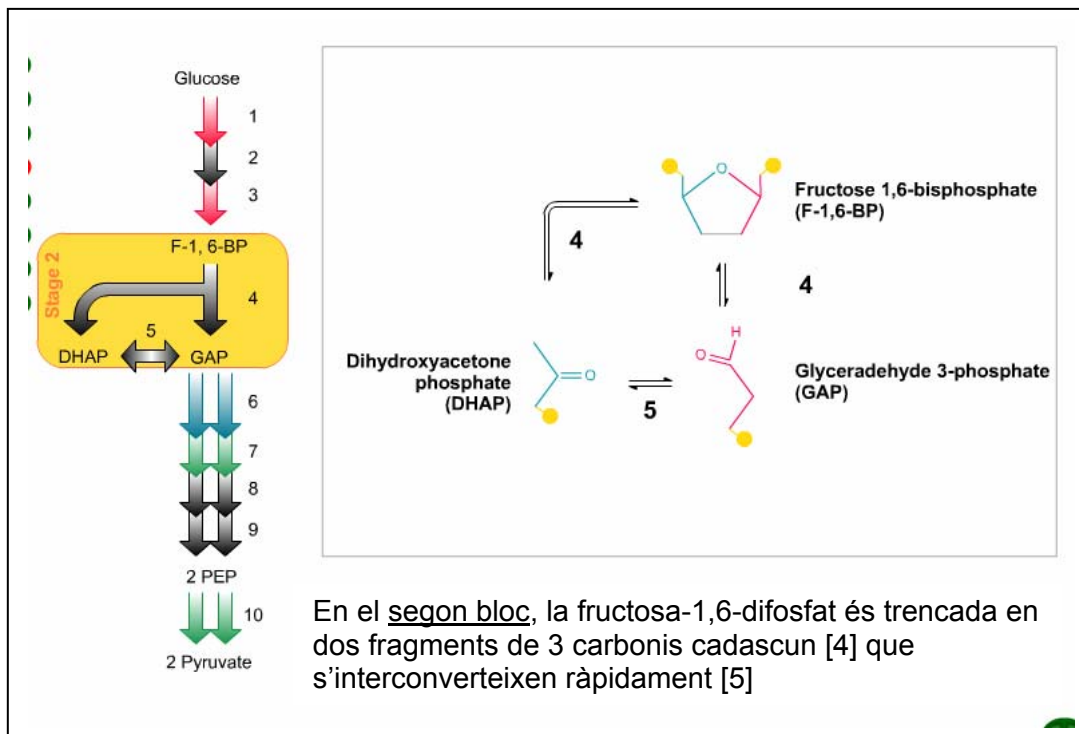
```

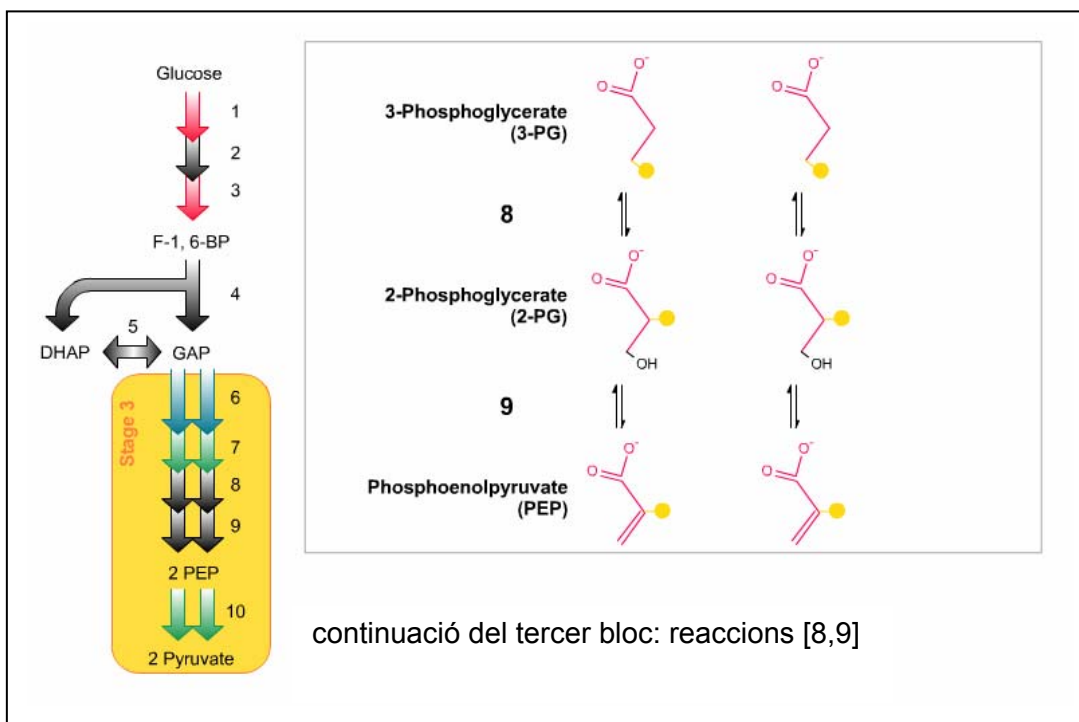
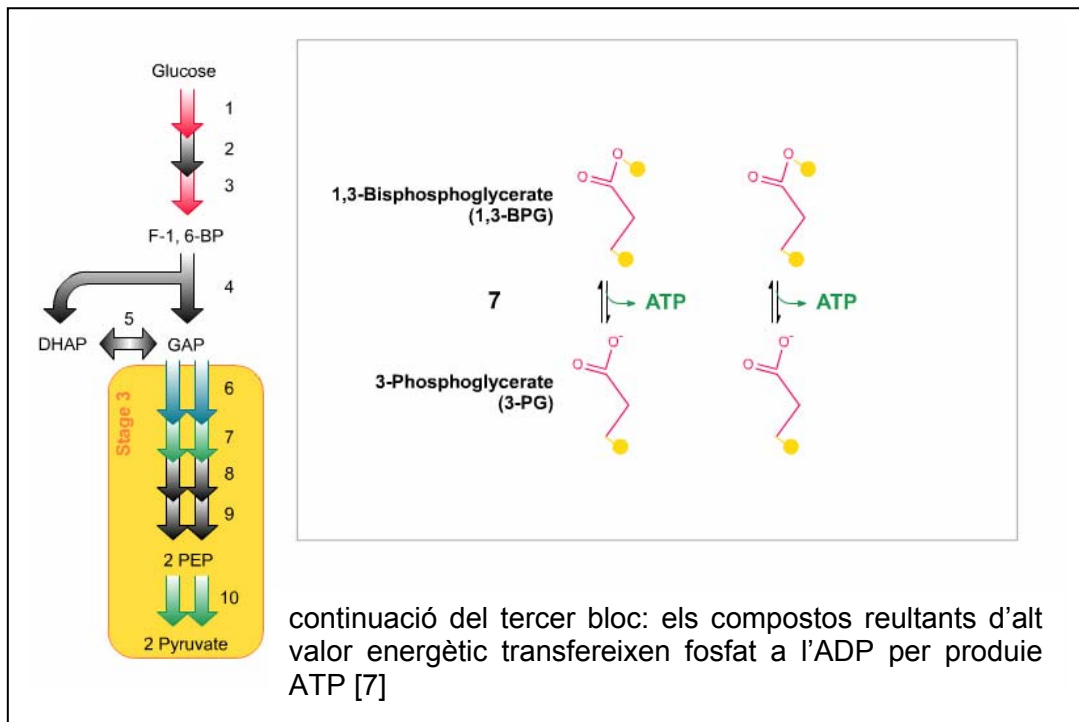
6.8. Rutes metabòliques

6.8.1. Glicòlisi

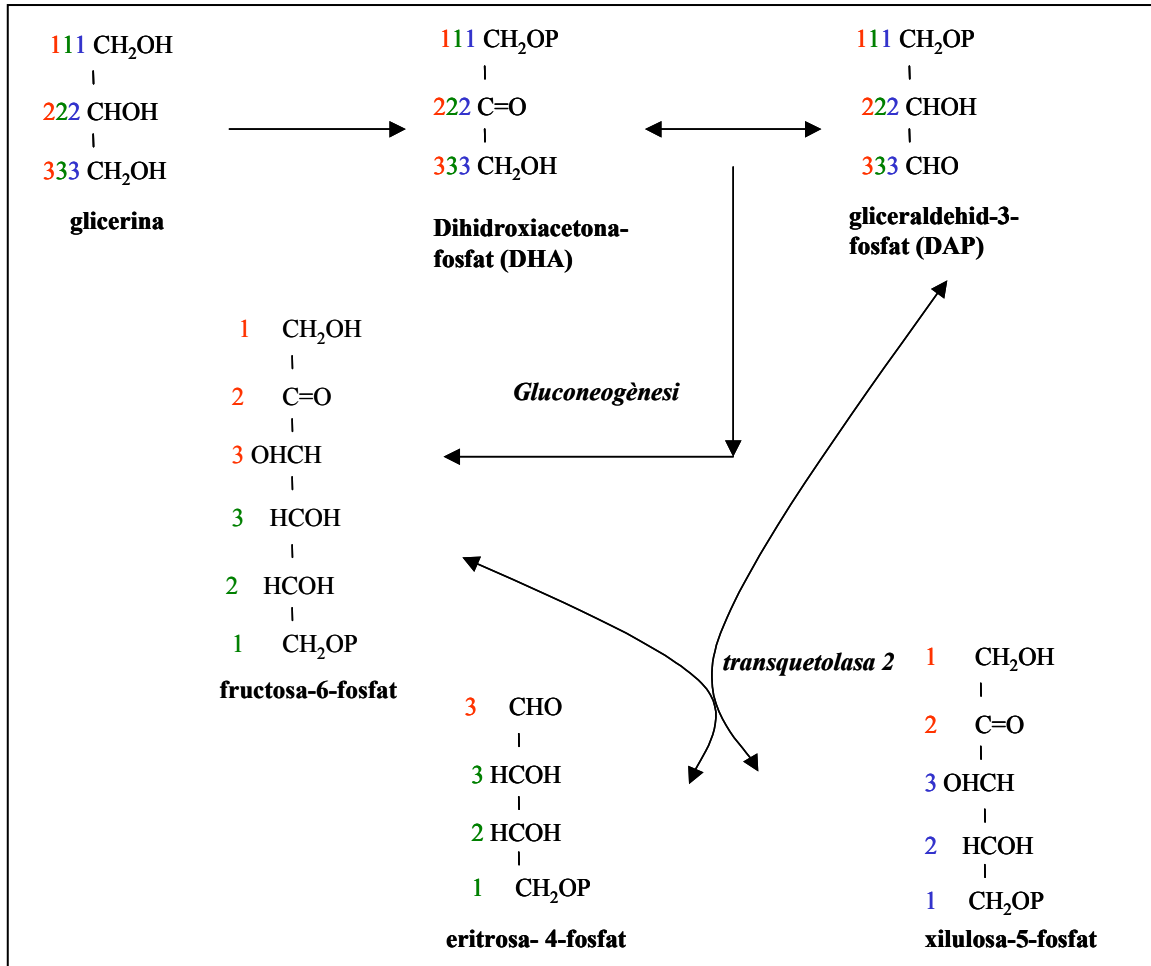
(Berg J.M., Tymoczko J.L. & Stryer L. (2002) Biochemistry (5th edition) Freeman & Co, NY)



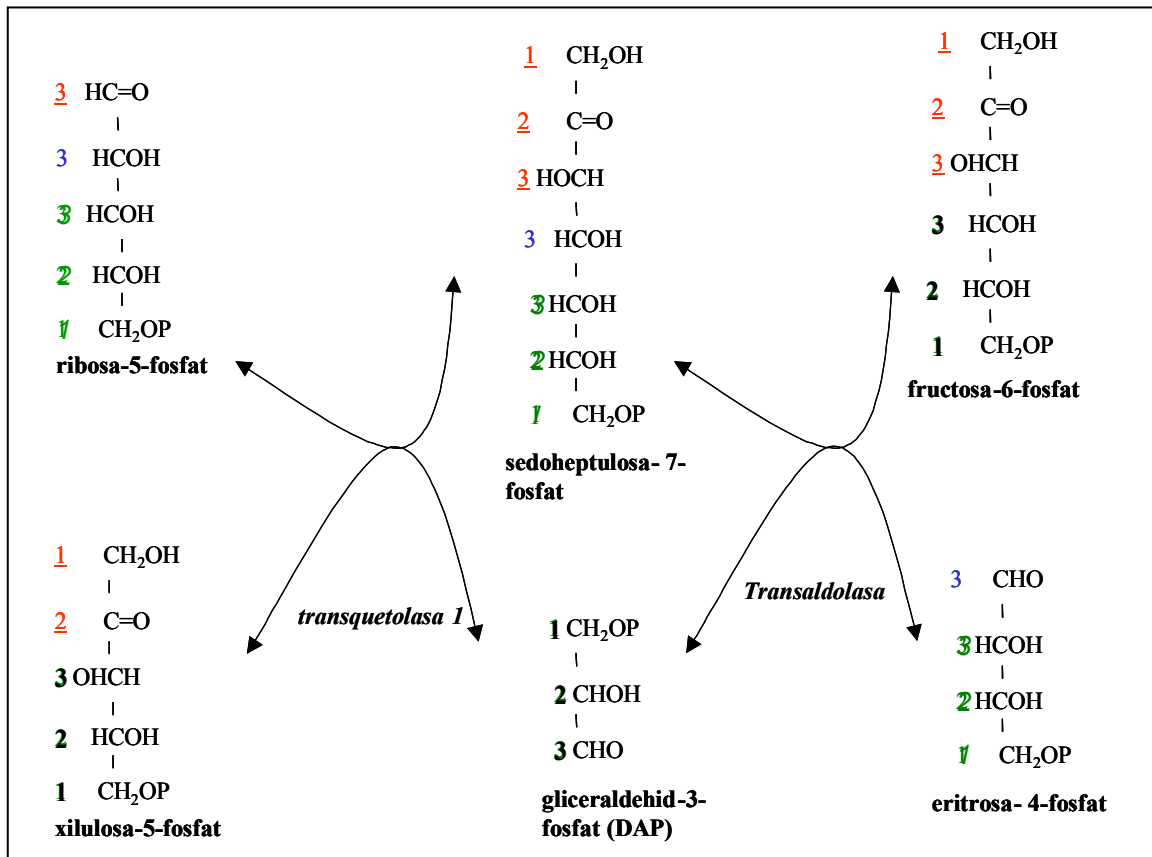




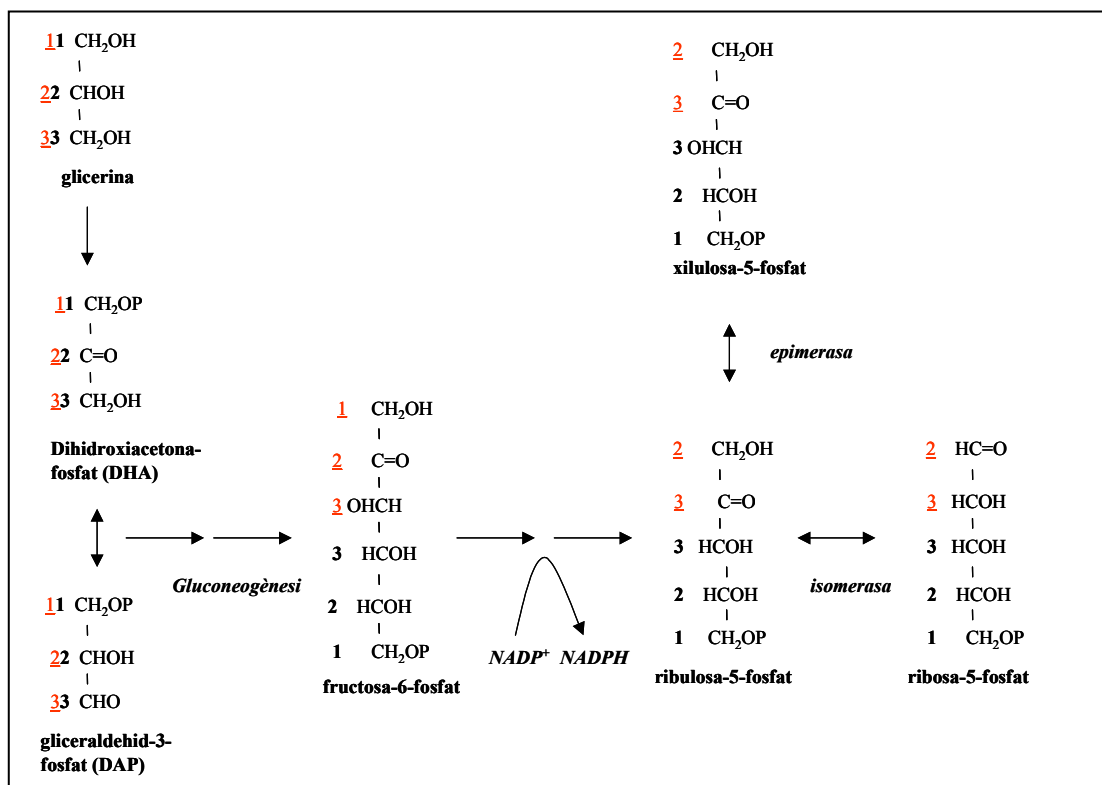
Distribució dels carbonis en la via no oxidativa (reversible) de la ruta de la Pentosa Fosfat (PPP), considerant el flux des de la glicerina fins a Xu5P i E4P:



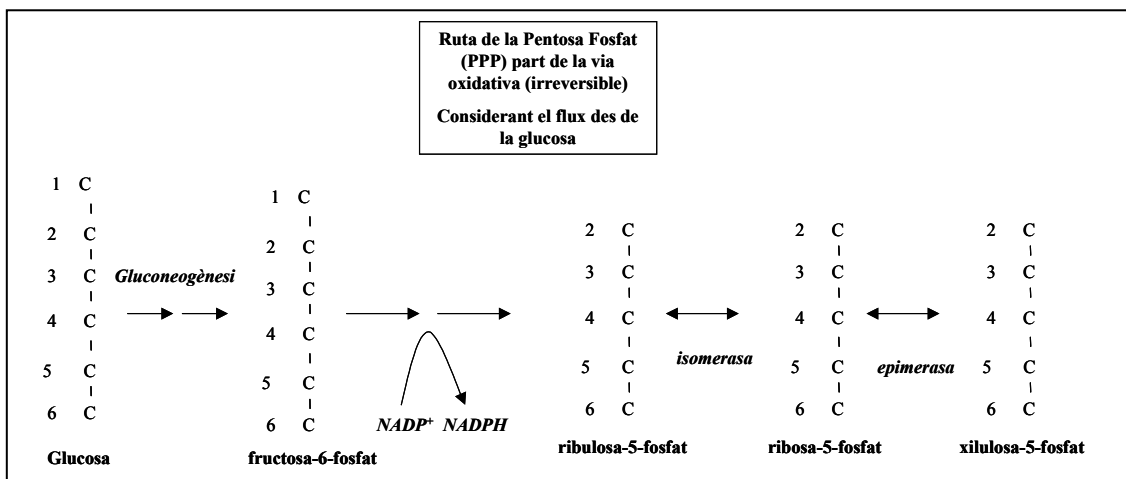
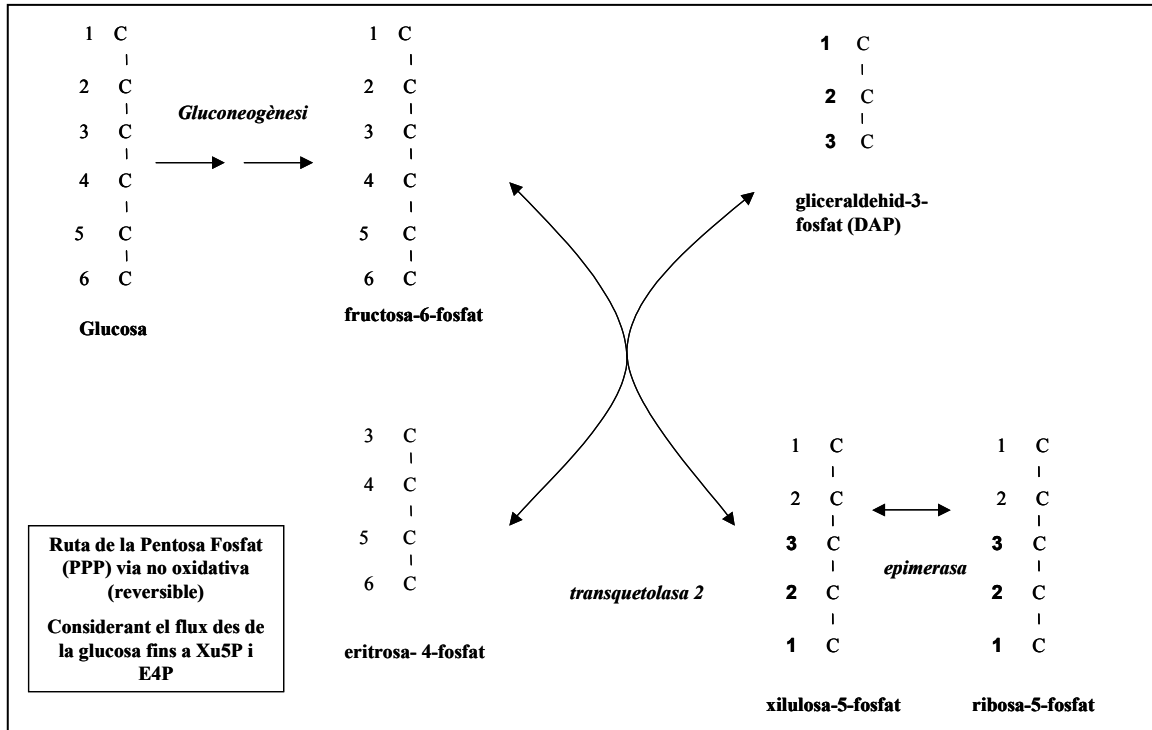
Distribució dels carbonis en la via no oxidativa (reversible) de la ruta de la Pentosa Fosfat (PPP), considerant el flux des de la glicerina (continuació figura anterior):



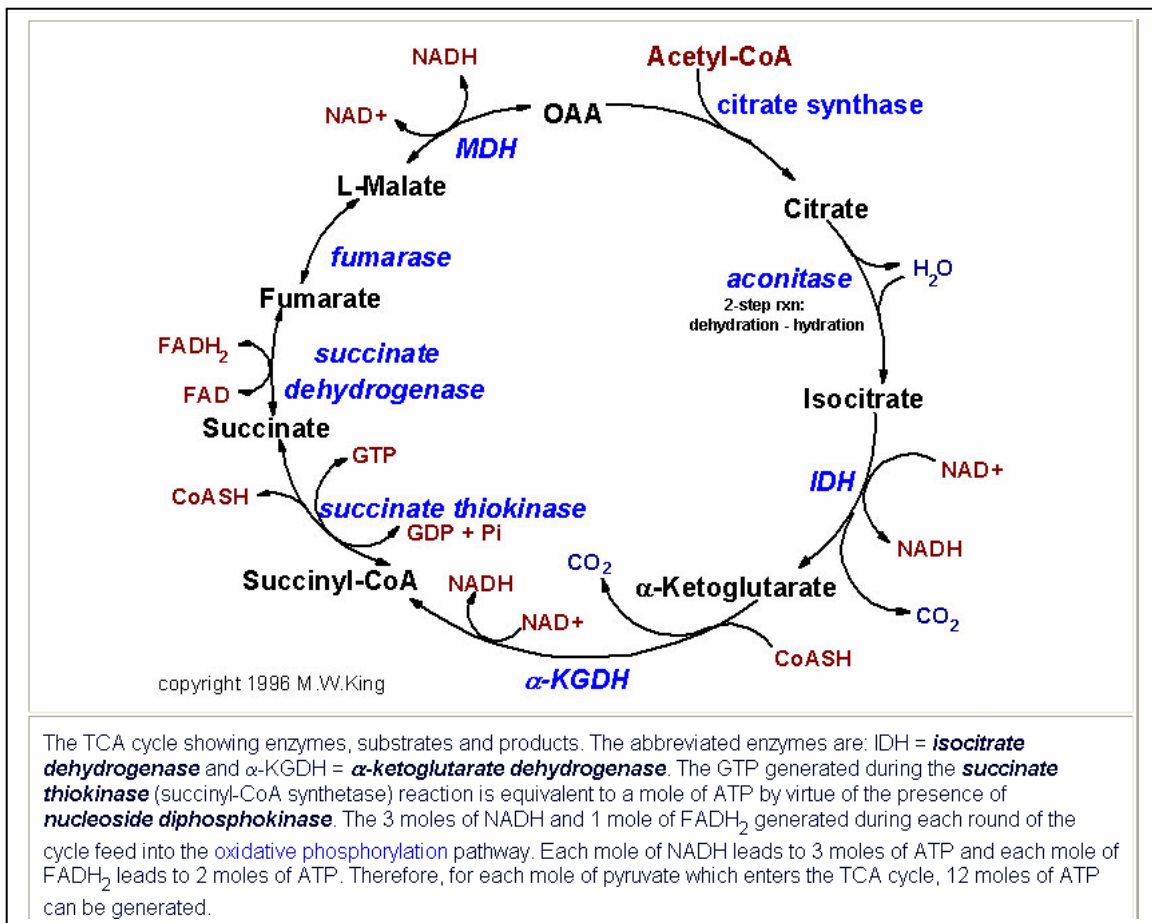
Distribució dels carbonis en la via oxidativa (irreversible) de la ruta de la Pentosa Fosfat (PPP), considerant el flux des de la glicerina:



Distribució dels carbonis en la via no oxidativa (reversible) de la ruta de la Pentosa Fosfat (PPP), considerant el flux des de la glucosa fins a Xu5P i E4P; i distribució dels carbonis en una part de la via oxidativa (reversible) de la ruta PPP considerant el flux des de la glucosa.



6.8.3. Cicle dels àcids tricarboxílics (cicle TCA)



6.8.4. Rutes de síntesi dels aminoàcids

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/search-biochem-index>

Kegg Pathway Database (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>)

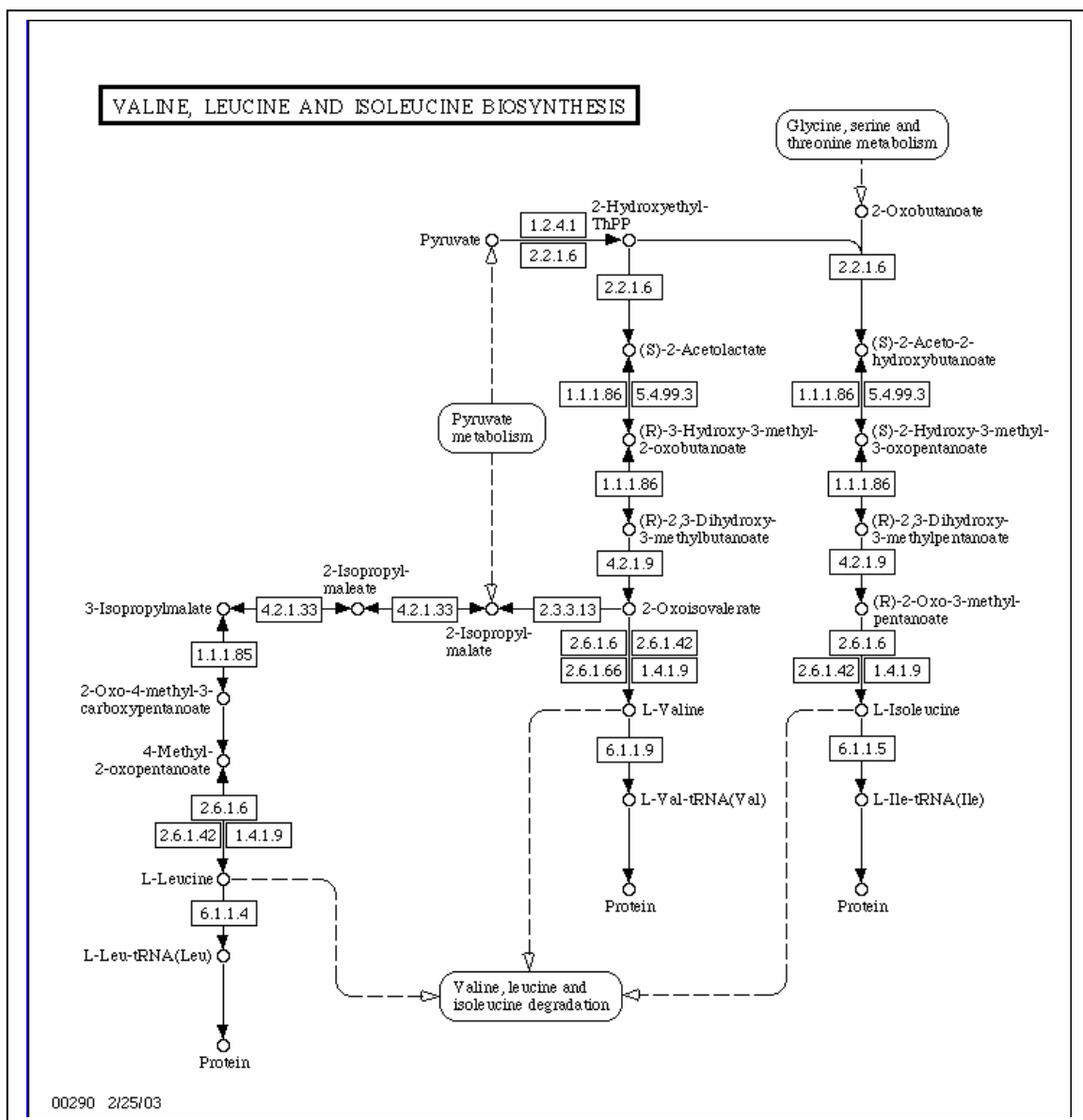
L'Asp, Asn, Met, Thr, Tyr, Phe i l'His provenen exclusivament dels *pools* de metabòlits localitzats al citosol.

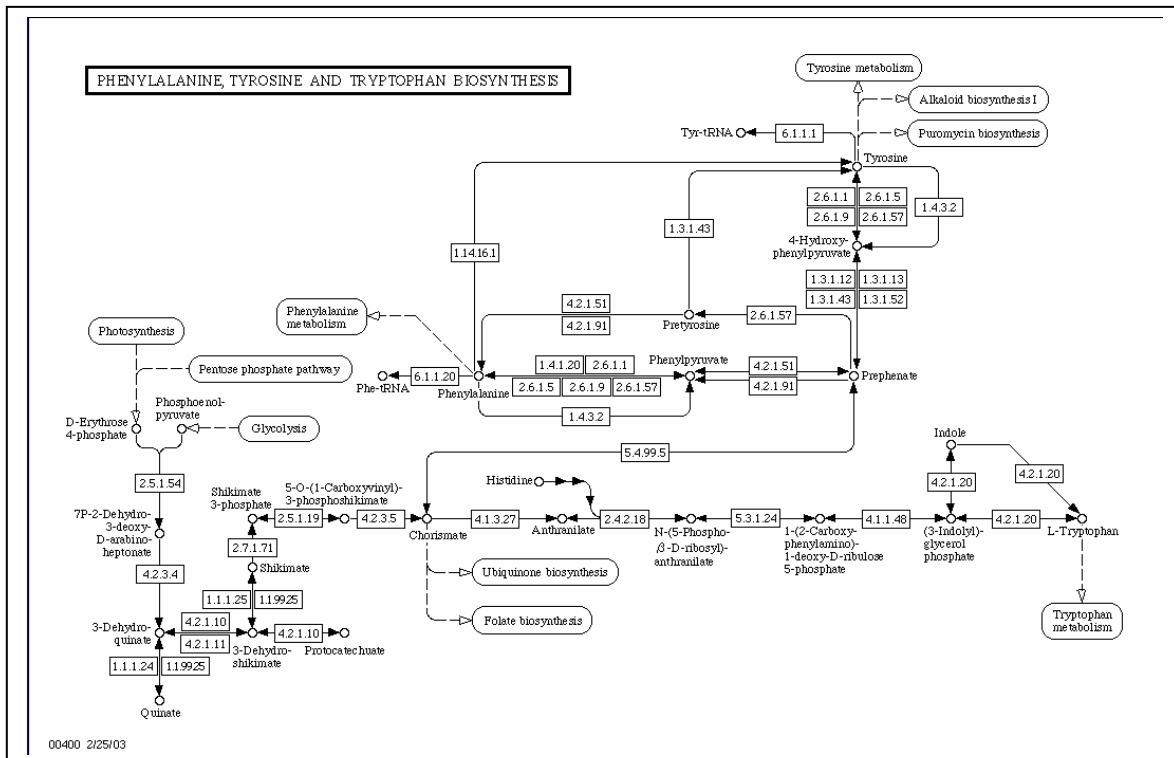
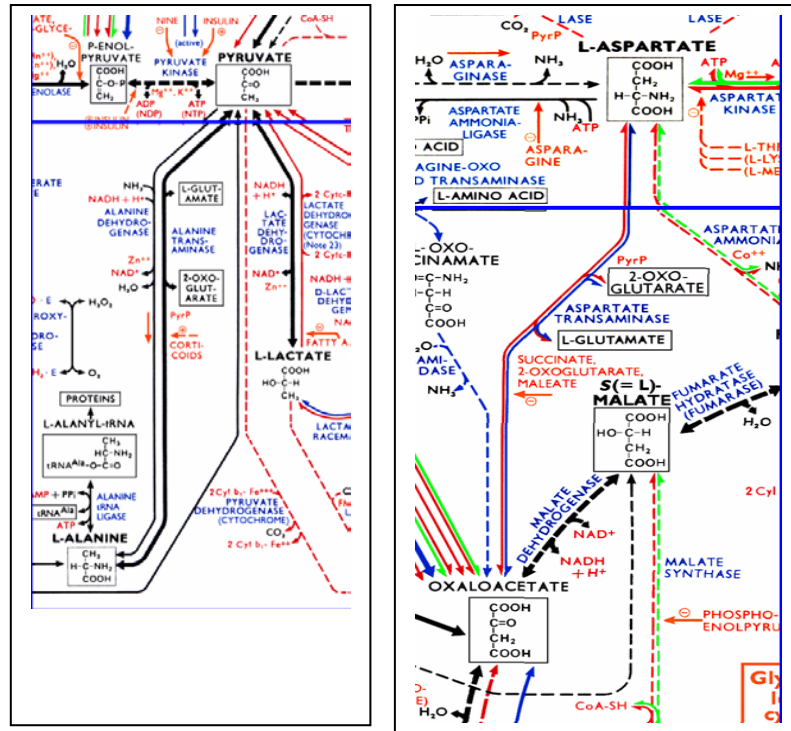
L'Asp es sintetiza a través d'una reacció de transaminació a partir d'OAA (citosòlic), i emprant Glu com a donador de nitrogen (i generant α -cetoglutarat). L'Asn es genera a partir de l'amidació de l'Asp.

A partir de l'Asp també es generen la Met, i la Thr, l'esquelet de carboni dels quals coincideix amb el de l'Asp. A partir de l'Asp també es generen els aminoàcids Ile (la qual també requereix Pyr) i part de l'esquelet de l'Arg.

Les síntesis de l'**Ala**, **Val**, **Leu** i part de l'esquelet de carboni de l'**Ile** requereixen Pyr. L'aminació del piruvat catalitzada per l'alanina aminotransferasa, que és mitocondrial, genera l'**Ala**. Per a la **Val** i la **Leu**, els primers passos són la condensació de dues molècules de piruvat fins a 2-acetolactat, reacció catalitzada per l'acetolactat sintasa, localitzada a la mitocondria. La incorporació de l'AcCoA en la **Leu** està catalitzada per l' α -isopropilmalat sintasa, que és mitocondrial.

Per a l'**Ile**, el primer pas de la seva síntesi consisteix en la condensació del piruvat i el 2-oxobutirat (que prové de la **Thr**, la qual prové de l'**Asp**) fins a 2-aceto-2-hidroxi-butirat, catalitzada, també, per l'acetolactat sintasa.





La síntesi dels aminoàcids aromàtics **Phe**, **Tyr** i **Trp** s'inicia amb la condensació del PEP amb l'E4P (que prové de la ruta de la pentosa fosfat), els quals acaben produint corismat. A partir d'aquest, es sintetitza per una banda **Trp** (el qual també requereix **Ser**), i de l'altra **Phe**. A partir d'aquesta última, es genera **Tyr** per hidroxilació.

La **His** es sintetitza a partir de la R5P, també provinent de la ruta de la pentosa fosfat, l'esquelet de carboni de la qual genera el de l'aminoàcid **His**.

El **Glu**, la **Pro** i l'**Arg** es sintetitzen a partir de l'OxGlu, el qual es genera exclusivament a la mitocondria. Així, el **Glu** es sintetitza a partir de l'OxGlu en una reacció catalitzada per l'aspartat transaminasa, mitocondrial. A partir del **Glu**, es genera la **Gln** (reacció catalitzada per la glutamina sintasa), la **Pro** (a través d'una cadena de reaccions que consumeixen ATP i NADPH) i part de l'esquelet de l'**Arg** (aquesta en el cicle de la urea).

La **Ser** es sintetitza a partir del 3-fosfoglicerat (3PG), però també pot provenir de la **Gly**, per la via reversible de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). Existeixen isoenzims de la SHMT mitocondrials i citosòlics (McNeil J.B. i col., 1994; McNeil J.B. i col., 1996). La **Cys** es genera a partir de la **Ser** a través d'un parell reaccions que requereixen AcCoA i H₂S.

Pel que fa a la **Gly**, els llevats poden usar quatre vies de biosíntesi per generar aquest aminoàcid. Les dues primeres corresponen al trencament de la **Thr** per la via de la threonina aldolasa i al trencament de la **Ser** per la via de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT). La **Gly** també es pot sintetitzar a partir d'una unitat C₁ i CO₂ per la via mitocondrial de la GCV (*Glycine Cleavage*). Finalment, els llevats poden sintetitzar també la **Gly** a partir dels intermediats del cicle TCA a través de la via de l'isocitrat liasa i de l'alanina glioxilat aminotransferasa, on el glioxilat es produeix a partir de l'isocitrat i és transaminat per donar **Gly**.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Bailey, James E., Ollis, David F. (1987) *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York. *Mc Graw-Hill Book Company*.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris, A.J.A., Kötter, P., Luttik, M.A.H, van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**, 15-37.
- Banerjee U.C., Sharma R., Chisti Y. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627-662.
- Beer H.D., Wohlfahrt G., Schmid. R.D., McCarthy J.E.G. (1996) The folding and activity of the extracellular lipase of *Rhizopus oryzae* are modulated by a prosequence. *Biochemical Journal*. 319: 351-359.
- Beer H.D., McCarthy J.E.G., Bornscheuer U.T., Schmid R.D. (1998) Cloning, expression, characterisation and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1399: 173-180.
- Ben Salah A., Fendri K., Gargoury Y. (1994) La lipase de *Rhizopus oryzae*: production, purification et caractéristiques biochimiques. *Revue Francaise des CORPS GRAS*. 41: 133-137.
- Berg J.M., Tymoczko J.L. & Stryer L. (2002) *Biochemistry* (5th edition) Freeman & Co, NY.
- Berger S. (1997) NMR techniques employing selective radiofrequency pulses in combination with pulsed field gradients. *Prog. NMR Spectrosc.* 30, 137-156.
- Berglund, P. (2001) Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*, 18: 13-22.
- Birch A.J. (1957) Biosynthetic Relations of Some Natural Phenolic and Enolic Compounds. *Fortshr. Chem Org. Naturstoffe*, 14, 186-216.
- Boettner, M., Prinz, B., Holz, C., Stahl, U., Lang, C. (2002) High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 99:51-62.
- Boles E., de Jong-Gubbels P., Pronk J.T. (1998) Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180: 2875-2882.
- Bommarius A.S., Schwarm M., Drauz K. (1998) Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals: examples and perspectives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 5: 1-11.
- Börgstrom B., Brockman H. (1984) *Lipases*. Elsevier, Amsterdam.

- Brierley, R.A., Bussineau, C., Kosson R., Melton A., Siegel R.S. (1990) Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 589: 350-363.
- Brocca S., Schmidt-Dannert C., Lotti M., Alberghina L., Schmid R.D. (1998) Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science*. Jun; 7(6): 1415-22.
- Camps, V., Giralt, E., Egozcue, J., et al. (2001) Percepció Social de la Biotecnologia. *Centre de Referència en Biotecnologia i Fundació Víctor Grífols i Lucas*.
- Carrea G., Riva S. (2000) Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 2226-2254.
- Chirovolu V., Cregg J.M., Meagher M.M. (1997) Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 277-283.
- Cornelissen G., Leptien H., Pump D., Scheffler U., Radeke H.H., Luttmann. (2001) CAB8. Integrated bioprocess development for production of recombinant proteins in high cell density cultivation with *Pichia pastoris*. *Comp. Applic. in Biotechnol.*
- Cos O., Serrano A., Montesinos J.L., Ferrer P., Cregg J.M., Valero F. (2004) Combined effect of the Methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on the recombinant overproduction in *Pichia pastoris* fed-batch cultivations. *J. Biotechnol.* (en revisió).
- Cregg J.M., Madden K.R. (1988) Development of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* 29: 33-41.
- Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., Thill G.P., Stillman C.A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 9: 1316-1323.
- Cregg J.M., Madden K.R. (1989) Use of site-specific recombination to generate selectable markers. *Mol. Gen. Genet.* 219: 320-323.
- Cregg J.M., Vedvick T.S., Rasehke W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* II: 905-910.
- Cregg J.M., Russell K.A. (1998) Transformation. *Methods Mol. Biol.* 103, 27-39.
- Curvers S., Brixius P., Klauser T., Thommes J., Weuster-Botz D., Takors R., Wandrey C. (2001) Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. *Fermentation. Biotechnol Prog.* 17: 495-502.
- Dahod S.K., Siuta-Mangano P. (1987) Carbon tetrachloride-promoted stereo selective hydrolysis of methyl-2-chloropropionate by lipase. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 995-999.

D'Anjou M.C., Daugulis A.J. (2000) Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnol. Lett.* 22: 341-34.

D' Anjou M.C., Daugulis A.J. (2001) A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 72:1, 1-11.

Davidson A.P., Jones J.A., Dixon R.M. (1999) Separate Quantification of Doubly and Singly ^{13}C -Labeled Metabolites by HSQC-Filtered J Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 137, 448-450.

Defense Advanced Research Projects Agency, DARPA, <http://www.darpa.mil>

Defense Technical Information Center, Departament de Defensa, EEUU, (http://stinet.dtic.mil/str/tr_fields.html).

De Graaf A.A., Mahle M., Möllney M., Wiechert W., Stahmann P., Sahn H. (2000) Determination of Full ^{13}C Isotopomer Distributions for Metabolic Flux Analysis using Heteronuclear Spin Echo Difference NMR Spectroscopy. *J. Biotechnol.* 77, 25-35.

Dixon G.H., Kornberg H.L. (1959) Assay method for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochemical Journal* 72: 3.

Egli, T., Käppeli, O., Fiechter, A. (1982) Mixed substrate growth of methylotrophic yeasts in chemostat culture: Influence of the dilution rate on the utilization of a mixture of glucose and methanol. *Arch. Microbiol.* 131, 8-13.

Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S. (1983) Determination of amino acids with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography.* 282, 609-618.

Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S. (1983) Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.* 282, 609-618.

Eisenreich W., Schwarzkopf B., Bacher A. (1991) Biosynthesis of Nucleotides, Flavins and Deazaflavins in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* 266, 9622-9631.

Faber, K.N., Elgersma Y., Heyman, J.A., Koller A., Lüers G.H., Nuttley W.M., Terlecky, S.R., Wenzel, T.J., Subramani, S. (1998) Use of *Pichia pastoris* as a model eukaryotic system: Peroxisome biogenesis. *Meth. Mol. Biol.* 103: 121-147.

Fernández, E., Fernández, M., Moreno, F., Rodicio, R. (1993) Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 238-242.

Fiaux J., Andersson C.I.J., Holmberg N., Bülow L., Kallio P.T., Szyperski T., Bailey J.E., Wüthrich K. (1999) ^{13}C NMR Flux Ratio Analysis of Escherichia coli Central Carbon Metabolism in Microaerobic Bioprocesses. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1407-1408.

Fiaux J., Çakar Z.P., Sonderegger M., Wüthrich K., Szyperski T., Sauer, U. (2003) Metabolic flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Eukaryotic Cell* **2**, 170-180.

Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A.A., Bolívar F. (2002) Analysis of Carbon Metabolism in *Escherichia coli* Strains with an Inactive Phosphotransferase System by ¹³C Labeling and NMR Spectroscopy. *Metabolic Engineering*. **4**, 124-137.

Flores C.L., Rodríguez C., Petit T., Gancedo C. (2000) Carbohydrate and energy yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 507-529.

Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.Ø., Nielsen, J. (2003) Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Research*. **13**: 244-253.

Fundació per la Pau. (2002) Anuari 2001-2002. Per la pau: prou investigació militar! (www.fundacioperlapau.org).

Gancedo C., Gancedo J.M., Sols, A. (1968) Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur. J. Biochem.* **5**, 165-172.

Gancedo J.M., Lagunas R. (1973) Contribution of the pentose-phosphate pathway to glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a critical analysis on the use of labelled glucose. *Plant Sci. Lett.* **1**: 193-200.

Gancedo J.M., Gancedo C. (1997) Gluconeogenesis and catabolite repression. In: Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology and applications (Zimmermann F.K., Entian K.D., Eds.). *Technomic Publishing, Lancaster*. 359-377.

Gancedo J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 334-361.

García Barreno P., et al. (2000) *La ciencia en tus manos*. Espasa Calpe. Madrid.

Gatignol A., Durand H., Tiraby G. (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett. Mar*, **28**; 230 (1-2): 171-5.

Gellissen G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 741-750.

Glick B.R., Pasternak J.J. (1994) Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA. *American Society for Microbiology Press*.

Gòdia Casablanca F., López Santín J. (editors). (1998) Ingeniería Bioquímica. *Editorial Síntesis, Madrid*.

Goodman J.M. (1985) Dihydroxyacetone synthase is an abundant constituent of the methanol-induced peroxisome of *Candida boidinii*. *J. Biol.Chem.* *Jun* **10**; 260 (11): 7108-13.

- Goodrick J.C., Xu M., Finnegan R., Schilling B.M., Schiavi S., Hoppe H., Wan N.C. (2001) High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol. Bioeng.* 74: 492-497.
- Gotor V. (1999) Non-conventional hydrolase chemistry: Amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorg. & Med. Chem.* 7: 2189-2197.
- Gotor V. (2000) Enzymes in organic solvents. The use of lipases and (R)-oxynitrilase for the preparation of products of biological interest. *Molecules.* 5: 290-292.
- Gotor V. (2002) Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. *Organic Process Research and Development.* 6: 420-426.
- Güntert P., Dötsch V., Wider G., Wüthrich K. (1992) Processing of multi-dimensional NMR data with the new software PROSA. *J. Biomol. NMR.* 2, 619-629.
- Günther H. (1995) NMR Spectroscopy (2nd Ed.). *Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry.* John Wiley and Sons, Chichester. ISBN 0-471-95201-X.
- Hamilton S.R., Bobrowicz P., Bobrowicz B., Davidson R.C., Robert C., Li H., Mitchell T., Nett J.H., Rausch S., Stadheim T.A., Wischnewski H., Wildt S., Gerngross T.U. (2003) Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science*, 301, 1244-1246.
- Harder W., Veenhuis, M. (1989) Metabolism of one-carbon compounds, in *The Yeasts*, vol.3, 2nd edition (Rose A.H., Harrison J.S., Eds.). *Academic Press, London.* 289-316.
- Harder W., Egli T., Bystrykh L.V., Trotsenko Y.A. (1987) Microbial growth on C1-compounds. *H.W. van Versseveld., J.A. Duine, Eds.* 139-149.
- Hettema E.H., Tabak H.F. (2000) Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 18-27.
- Higgins D.R., Cregg J.M. (1998) *Pichia* protocols. *Methods in Molecular Biology.* Humana Press. 103
- Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L., Cormeau L.C. (2000) Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from plant fruit.
- Hochuli M., Patzelt H., Oesterhelt D., Wüthrich K., Szyperski, T. (1999) Amino acid biosynthesis in the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *J.Bacteriol.* 181, 3226-3237.
- Hoechst (1988) *Eur. Pat.* 321.918.
- Holzer H. 1976. Catabolite inactivation in yeast. *Trends in Biochem. Sci.* 1: 178-181.
- Hornak J.P. *The Basics of NMR* (<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>).

Indiveri C., Iacobazzi V., Giangregorio N., Palmieri F. (1998) Bacterial overexpression, purification and reconstitution of the carnitine/acylcarnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 589-594.

Jones E.W., Fink G.R. (1982) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression (Strathern J.N., Jones E.W., Broach J.R., Eds.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* 181-299.

Jones G.J., Bellion E. (1991) Methanol oxidation and assimilation in *Hansenula polymorpha*. An analysis by ^{13}C NMR in vivo. *Biochemical Journal*, 280: 475-481.

Katakura Y., Zhang W., Zhuang G., Omasa T., Kishimoto M., Goto Y., Suga K. (1998) Effect of methanol concentration on the production of human β 2-glycoprotein I domain V by recombinant *Pichia pastoris*. A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J.Ferm. Bioeng.* 86: 482-487.

Kegg Pathway Database (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>)

Kjellberg A., Weintraub A., Widmalm G. (1999) Structural Determination and Biosynthetic Studies of the O-Antigenic Polysaccharide from the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91 Using ^{13}C -Enrichment and NMR Spectroscopy. *Biochemistry.* 38, 12205-12211.

Klapa M.I., Park S.M., Sinskey A.J. (1999) Metabolite and Isotopomer Balancing in the Analysis of Metabolic Cycles: I. Theory. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 375-391.

Kobayashi K., Kuwae S., Ohya T., Ohda T., Ohyama M., Tomomitsu K. (2000) High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* based on optimal methanol feeding strategy. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (3): 280-288.

Koutz P., Davis G.R., Sillman C., Barringer K., Cregg J.M., Thill G. (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, 5: 167-177.

Lee J.D., Komagata K. (1980) Taxonomy study of methanol assimilating yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 26: 133-158.

Lee G.C., Lee L.C., Sava V., Shaw J.F. (2002) Multiple mutagenesis of non-universal serine codons of the *Candida rugosa* LIP2 gene and biochemical characterization of purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris*. *Biochem J.* 366: 603-611.

Lin Cereghino J., Cregg J.M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev. Jan.*, 24(1): 45-66.

Lin Cereghino G.P.L., Cereghino J.L., Sunga A.J., Johnson M.A., Lim M., Gleeson M.A.G., Cregg J.M. (2001) New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene.* 263: 159-169.

- Lin Cereghino G.P., Lin Cereghino J., Ilgen C., Cregg, J.M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329-332.
- Maaheimo H., Fiaux J., Çakar, Z.P., Bailey J.E., Sauer U., Szyperski T. (2001) Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional ¹³C labeling of common amino acids. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2464-2479.
- Macomber R.S. (1998) A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy. *Wiley, New York*, ISBN ISBN: 0-471-15736-8.
- Macrae A.R., Hammond R.C. (1985) Present and future applications of lipases. *Biotech. Gen. Engin. Rev.* 3: 193-217.
- Martin G.E., Hadden C.E. (2000) Long Range ¹H-¹⁵N Heteronuclear Shift Correlation at Natural Abundance. *J. Nat. Prod.* 63, 543-585.
- Mayer A.F., Hellmuth K., Schlieker H., López-Ulibarri R., Oertel S., Dahlems U., Strasser A.W.M., Van Loon A.P.G.M. (1999) An expression system matures: a high efficient and cost effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.*, 63: 373-381.
- Mayson B.E., Kilburn D.G., Zamost B.L., Raymond Ch.K., Lesnicki G.J. (2003) Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol. Bioeng.*, 81: 3, 291-298.
- McNeil J.B., McIntosh E.M., Taylor B.V., Zhang F.R., Tang S., Bognar A.L. (1994) Cloning and molecular characterization of three genes, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for glycine. *J. Biol. Chem.* 269: 9155-9165.
- McNeil J.B., Bognar A.L., Pearlman R.E. (1996) In vivo analysis of folate coenzymes and their compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 142: 371-381.
- Menéndez J, Valdés I., Cabrera N. (2003) The ICLI gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast*, 20: 1097-1108.
- Michal G. (1998) Biochemical Pathways: An atlas of biochemistry and molecular biology. *John Wiley & Sons, New York*.
- Minning S., Schmid-Dannert C., Schmid R.D. (1998) Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *J. Biotechnol.* 66, 147-156.
- Minning S., Serrano A., Ferrer P., Solà C., Schmid R.D., Valero F. (2001) Overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 86, 59-70.
- Molina M.A. Investigació militar i guerra d'Iraq (www.prouinvestigaciomilitar.org)

- Möllney M., Wiechert W., Kownatzki D., de Graaf A.A. (1999) Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: IV. Optimal Design of Isotopomer Labeling Experiments. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 86-103.
- Monschau N., Stahmann K.P., Sahm H., McNeil J.B., Bognar A.L. (1997) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 150: 55-60.
- Moore A.L., Rich P.R. (1980) Trends in Biochemical Sciences. 5: 284.
- Müller R.H., Sysoev O.V., Babel W. (1986) Use of formate gradients for improving biomass yield of *Pichia pinus* growing continuously on methanol. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 25: 238-244.
- Muñoz E. (2001) Biotecnología y sociedad. Encuentros y desencuentros. *Cambridge University Press, Madrid.*
- Murdanoto A.P., Sakei Y., Konishi T., Yasuda F., Tani Y., Kato N. (1997) Purification and properties of methyl formate synthase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeasts. *Applied and Environmental Microbiology.* 63 (5): 1715-1720.
- Nevoigt E., Stahl U. (1997) *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 231-241.
- Norbeck J., Blomberg N. (1997) *Amer. J. Biol. Chem.* 272, 5544-5554.
- Ogata K., Nishikawa H., Ohsugi M. (1969) A yeast capable of utilising metanol. *Agric. Biol. Chem.* 33: 159-1520.
- Palmieri L., Lasorsa F.M., De Palma A., Palmieri F., Runswick M.J., Walker J.E. (1997) Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Lett.* 417, 114-118.
- Palmieri L., Vozza A., Agrimi G., De Marco V., Runswick M.J., Palmieri F., Walkers J.E. (1999) Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. *J. Biol. Chem.* 274: 22184-22190.
- Parella T. (1998) Pulsed Field Gradients: A New Tool for Routine NMR. *Magn. Reson. Chem.* 36, 467-495.
- Parella T., Belloch J., Sánchez-Ferrando F., Virgili A. (1999) Novel Selective 1D Experiments Based on Heteronuclear J Cross-Polarization. *Magn. Reson. Chem.* 37, 631-636.
- Parés R., Juárez A. (1997) Bioquímica de los microorganismos. Madrid. *Editorial Reverté, S.A.*
- Park S.M., Klapa M.I., Sinskey A.J., Stephanopoulos G. (1999) Metabolite and Isotopomer Balancing in the Analysis of Metabolic Cycles: II. Applications. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 392-401.

- Penninckx M.A. (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.
- Petersen S., de Graaf A.A., Eggeling L., Möllney M., Wiechert W., Sahm H. (2000) In Vivo Quantification of Parallel and Bidirectional Fluxes in the Anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 275, 35932-35941.
- Phalakornkule, C., Lee, C., Zhu, T., Koepsel, R., Ataai, M.M., Grossmann, I.E., Domach, M.M. (2001) A MILP-Based Flux Alternative Generation and NMR Experimental Design Strategy for Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering.* 3, 124-137.
- Ratcliffe R.G., Roscher A., Shachar-Hill Y. (2001) Plant NMR Spectroscopy. *Prog. NMR Spectrosc.* 39, 267-300.
- Reetz M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology.* 6: 145-150.
- Ren H.T., Yuan J.Q., Bellgardt K.H. (2003) Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. *J. Biotechnol.* (disponible on-line en www.sciencedirect.com) (en premsa).
- Resina D., Serrano A., Valero F., Ferrer P. (2004) Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J. Biotechnol.* (en premsa).
- Rodríguez M., Rubiera R., Penichet M., Montesinos R, Cremata J., de la Fuente J. (1994) High-level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotechnol.* 33:135-146.
- Rodríguez J.E., Sánchez K., Roca H., Delgado J.M. (1997) Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level dextranase. *Biotechniques.* 11: 461-466.
- Ryan E.D., Tracy J.W., Kohlaw G.B. (1973) Subcellular localization of leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* 116: 222-225.
- Ryan E.D., Kohlaw G.B. (1974) Subcellular localization of isoleucine-valine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* 120: 631-637.
- Shachar-Hill Y. (2002) Nuclear Magnetic Resonance and Plant Metabolic Engineering. *Metabolic Engineering.* 4, 90-97.
- Sahasrabudhe A.V., Solapure S.M., Khurana R., Suryanarayan V., Ravishankar S., deSousa S.M., Das G. (1998) Production of recombinant lipase and its variant in *Pichia pastoris*. *Protein Expresión and Purification.* 14: 425-433.

- Sakai Y., Murdanoto A.P., Sembiring L., Tani Y., Kato N. (1995) A novel formaldehyde oxidation pathway in methylotrophic yeasts: methylformate as a possible intermediate. *FEMS Microbiol Lett.* 127 (3): 229-234.
- Sato Y., Oda T., Urano S. (1976) Griseofulvin Biosynthesis: New Evidence of Two Acetate Dispositions in the Ring A from ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Studies. *Tetrahedron Lett.*, 3971-3974.
- Sauer U., Hatzimanikatis V., Bailey J.E., Hochuli M., Szyperski T., Wüthrich K. (1997) Metabolic fluxes in riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Nature Biotechnol.* 15, 448-452.
- Sauer U., Lasko D.R., Fiaux J., Hochuli M., Glaser R., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J.E. (1999) Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* 181, 6679-6688.
- Schmidt K., Norregaard L.C., Pedersen B., Meissner A., Duus J. Ö. , Nielsen J. Villadsen J. (1999) Quantification of Intracellular Metabolic Fluxes from Fractional Enrichment and ^{13}C - ^{13}C Coupling Constants on the Isotopomer Distribution in Labelled Biomass Components. *Metabolic Engineering.* 1, 166-179.
- Schöler A. Schüller H.J. (1994) A carbon-source-responsive promoter element necessary for activation of the isocitrate lyase gene ICL1 is common to genes of the gluconeogenic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 14, 3613-3622.
- Serrano A. (2002) Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. *Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.*
- Serrano A., Lin Cereghino G., Ferrer P., Cregg J.M., Valero F. (2001) Overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* strains containing multiple copies of the target gene. In: Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells. A comparative view on host physiology. Merten, O.-W. et al. (eds). *Kluwer, Países Baixos*, 259-268.
- Shen S., Sulter G., Jeffries T. Cregg J.M. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 216, 93-102.
- Simpson T.J. (1975) Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance in Biosynthetic Studies. *Chem. Soc. Rev.* 4, 497-522.
- Simpson T.J. (1987) Applications of Multinuclear NMR to Structural and Biosynthetic Studies of Polyketide Microbial Metabolites. *Chem. Soc. Rev.* 16, 123-160.
- Sinha J., Plantz B.A., Zhang W., Gouthro M., Schlegel V., Liu Ch., Meagher M. (2003) Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnol. Progr.* 19, 3: 794-802.

SIPRI. (2001) Year Book 2002. Military Spending and Armaments.

Stratton J., Chiruvolu V., Meagher M. (1998) High cell-density fermentation. In: Higgins, D.R., Cregg J.M. *Pichia* Protocols. *Methods in Molecular Biology. Humana Press*. 103: 107-120.

Sumitomo (1973) *Jpn. Pat.* 50.013.365.

Surribas A., Cos O., Montesinos J.L., Valero F. (2003) On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotechnol. Lett.* 25:1795-1800.

Swartz J., Cooney C.L. (1981) Metanol inhibition in continuous culture of *Hansenula polymorpha*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1206-1213.

Szyperski T. (1995) Biosynthetically Directed Fractional ^{13}C -Labeling of Proteinogenic Aminoacids. An Efficient Analytical Tool to Investigate Intermediary Metabolism. *Eur. J. Biochem.* 232, 433-448.

Szyperski T., Bailey J.E., Wüthrich K. (1996) Detecting and Dissecting Metabolic Fluxes Using Biosynthetic Fractional ^{13}C Labeling and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *Trends Biotechnol.* 14, 453-459.

Szyperski T. (1998) ^{13}C -NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 31, 1, 41-106.

Szyperski T., Glaser R.W., Hochuli M., Fiaux J., Sauer U., Bailey J., Wüthrich K. (1999) Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional ^{13}C -labeling and two dimensional NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*. 1, 189-197.

Takada Y., Noguchi T. (1985) Characteristics of alanine: glyoxylate aminotransferase from *Saccharomyces cerevisiae*, a regulatory enzyme in the glyoxylate pathway of glycine and serine biosynthesis from tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochemical Journal*. 231, 157-163.

Takahashi S., Ueda M., Harayuki A., Beer H.D., Bornscheuer U.T., Schmid R.D., Tanaka A. (1998) Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86. 2: 164-168.

Tang S.J., Shaw J.F., Sun K.H., Sun G.H., Chang T.Y., Lin C.K., Lo Y.C., Lee G.C. (2001) Recombinant expression and characterization of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Pichia pastoris*: comparison of glycosylation, activity, and stability. *Arch. Biochem. Biophys.* 387: 93-8.

Tani Y., Kato N., Yamada H. (1978) Utilization of methanol by yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.* 24: 165-186.

- Thorpe, E.D., d'Anjou, M.C. & Daugulis, A.J. (1999) Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* 21, 669-672.
- Trinh L.B., Phue J.N., Shiloach J. (2003) Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia Pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* 82: 4, 438-444.
- Tschopp J.F., Brust P.F., Cregg J.M., Stillman C.A., Gingeras T.R. (1987) Expression of the lacZ gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acid Res.* 15: 3859-3876.
- Van Dijken J.P., Otto R. Harder W. (1976) Growth of *Hansenula polymorpha* in a methanol-limited chemostat. *Arch. Microbiol.* III: 137-144.
- Van Dijken J.P., Oostra-Demkes G.J., Otto R., Harder W. (1976) S-formylgluthathione: the substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts. *Arch. Microbiol.* Dec 1; 111(1-2): 77-83.
- Van Roermund C.W.T. *et al.* (1995) The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* 14:3480-3486.
- Van Roermund C.W.T., Hetteema E.H., van der Berg M., Tabak H.F., Wanders R.J.A. (1999) Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J.* 18: 5843-5852.
- Van Winden, W., Schipper, D., Verheijen, P., Heijnen J. (2001) Innovations in generation and analysis of 2D [¹³C,¹H]-COSY NMR spectra for metabolic analysis purposes. *Metabolic Engineering.* 3: 322-343.
- Van Winden, W. (2002). ¹³C-labeling technique for metabolic network and flux analysis (theory and applications). *Tesi doctoral, Technische Universiteit Delf.* 69-70.
- Veenhuis M., Van Dijken J.P., Harder W. (1983) The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.*, 24: 1-78.
- Voet D., Voet J.G. (1995) Biochemistry. *John Wiley & Sons, New York, NY.* 727-784.
- Waites et al. (1981) Distribution studies of ¹⁴C in hydroxyacetone and hexose phosphates after pulse labelling whole cells of methanol grown *Hansenula polymorpha* with [¹⁴C]-methanol. *Journal of General Microbiology.* 22, 193.
- Waterman H.R., Digan M.E., Kouotz P.J., Lair S.V., Cregg J.M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186: 37-44.
- Wegner G.H. (1983) Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. *US Patent* 4414329.

- Wendisch V.F., de Graaf A.A., Sahm H. (1997) Accurate Determination of ^{13}C Enrichments in Nonprotonated Carbon Atoms of Isotopically Enriched Amino Acids by ^1H Nuclear Magnetic Resonance. *Analytical Biochem.* 245, 196-202.
- Wiechert W., Möllney M., Isermann N., Wurzel M., de Graaf A.A. (1999) Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: III. Explicit Solution and Analysis of Isotopomer Labeling Systems. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 69-85.
- Wiechert W. (2001) ^{13}C Metabolic Flux Analysis. *Metabolic Engineering.* 3, 195-206.
- Woldman Y., Appling D.R. (2002) A general method for determining the contribution of split pathways in metabolite production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering.* 4, 170-181.
- Yang Y., Loewe M.E. (1998) Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: purification and characterization. *Protein Expresión and Purification.* 13: 36-40.
- Zhang W., Bevins M., Plantz B.A., Smith L.A., Meagher M.M. (2000) Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, Serotype A. *Biotechnol. Bioeng.* 70: 1-8.
- Zhu, T., Phalakornkule, C., Ghosh, S., Grossmann, I.E., Koepsel, R.R., Ataa, M.M., Domach, M.M. (2003) A metabolic network analysis & NMR experiment design tool with user interface-driven model construction dor depth-first search analysis. *Metabolic Engineering.* 5, 75-85.
- Zimmermann F.K., Entian K.D. (1997) Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. *Technomic Publishing Company, Inc.*

REFLEXIÓ FINAL

Si les coses fossin senzilles

Aleshores tindríem encara més problemes. T'imagines, no haver d'escollir, no tenir oportunitat de discutir com es fan les coses. No opinar diferent de l'altre, no haver de dubtar per res. T'imagines? Tenir-ho tot previst, estar sempre d'acord, fer i no desfer. Anar passant sense dificultats, sense ningú que et contradigui, sense que ningú cregui que hi ha res malament i sense haver-se de queixar. Treballar sabent que tot és correcte. Celebrar amb els amics allò que saps que tothom vol celebrar. T'imagines menjant sempre allò que t'agrada? Saber que tothom t'estima perquè sí. I no patir entrebancs perquè no. I saber sempre les causes i les solucions. T'ho imagines? Seria tot tan complicat! Si tu no entens per què, jo tampoc. Les coses no són mai tan senzilles.