



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Análisis de la limitación de Na_2HPO_4 en cultivos en lote de
P. rhodozyma utilizando una red neuronal artificial.**

TESIS

Que presenta

MARTÍNEZ SÁNCHEZ JOSÉ MANUEL

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIOINGENIERÍA**

Director de la Tesis:

DOCTOR LUIS BERNARDO FLORES COTERA

Ciudad de México

Mayo, 2019

El presente trabajo se llevó a cabo de febrero de 2017 a Septiembre de 2018 en el laboratorio 48 del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de investigación y de estudios Avanzados del IPN Unidad Zacatenco bajo la dirección del Doctor Luis Bernardo Flores Coterá.

Índice general

Abreviaturas Utilizadas.	6
Resumen.	7
1 Introducción	11
1.1 Antecedentes	11
1.2 Papel biológico de los fosfatos	12
1.3 Sistemas vivos	14
1.3.1 Redes neuronales artificiales	14
1.4 Redes neuronales y su aplicación en investigaciones biológicas . .	16
1.5 Modelo experimental.	17
2 Objetivos	18
2.1 Objetivo general	18
2.1.1 Objetivos particulares	18
3 Materiales y Métodos	19
3.1 Cultivo de la cepa y conservación	19
3.2 Experimentos en bioreactor	20
3.3 Medios de cultivo	20
3.4 Toma de muestras y diseño experimental	21
3.5 Análisis de metabolitos y peso seco	21
3.5.1 Análisis de proteínas	21
3.5.2 Determinación de amonio residual	21
3.5.3 Análisis de azúcares reductores	22

3.5.4	Determinación de carotenoides	22
3.6	Implementación del algoritmo	23
3.6.1	Estructura y parámetros de la red	25
3.6.2	Análisis estadístico y métricas de evaluación	26
4	Resultados	27
4.1	Efecto de la deficiencia de Na_2HPO_4 en la respiración y el crecimiento	27
4.2	Efecto de la deficiencia nutricional en el consumo de azúcares	28
4.3	Efecto de la deficiencia nutricional en el nivel de proteínas totales	30
4.4	Efecto de la deficiencia nutricional en la producción de carotenoides	30
4.5	Capacidad de respuesta de la red neuronal.	31
5	Discusion	34
5.1	Una limitación de 0.6 mM de Na_2HPO_4 tiene un efecto notable en la respiración y una leve repercusión en el crecimiento	34
5.2	La deficiencia nutricional de Na_2HPO_4 induce la síntesis de carotenoides	35
5.3	Los niveles de proteínas totales disminuyen como efecto de la deficiencia de Na_2HPO_4	36
6	Conclusiones	38
7	Anexo	40
7.1	Conservación de la cepa por liofilizado	40
7.2	Determinación de peso seco	40
	Referencias.	41

Índice de figuras

1.1	Esquema general de la oxidación de aminoácidos.	13
1.2	Estructura general de una red neuronal perceptrón multicapa. . .	16
3.1	Esquema de flujo para el análisis estadístico de resultados.	26
4.1	Desarrollo del cultivo de <i>P. rhodozyma</i> en medio sintético completo y en medio limitante	29
4.2	Comparación entre los resultados de los niveles de biomasa experimentales contra los niveles de biomasa predichos por la red neuronal.	33

Índice de cuadros

4.1	Métricas de evaluación.	32
-----	---------------------------------	----

Abreviaturas Utilizadas.

DNA Ácido desóxirribunucleico.

CC Coeficiente de correlación.

CCC Coeficiente de concordancia.

Kb Kilobases.

Mb Megabases.

mM Milimolar.

MAPE Error porcentual absoluto de la media.

MSE Error cuadrático medio.

MAE Error medio absoluto.

Pi Fosfato inorgánico

RMSE Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

RNA Ácido ribonucleico.

RNA-Pol RNA polimerasa.

ROS Especies reactivas de oxígeno.

rpm Revoluciones por minuto.

YM Yeast Malt.

Resumen

En el presente trabajo se mostró que un cultivo de *Phaffia rhodozyma* con una concentración limitante de 0.6 mM de Na_2HPO_4 promueve la síntesis de astaxantina, entorpece el consumo de oxígeno y azúcares así como la síntesis de proteínas y de biomasa en comparación con los niveles de dichos parámetros en un cultivo sin limitación, donde la concentración de Na_2HPO_4 es de 2.74 mM. Se construyó una red neuronal artificial para predecir los cambios en el nivel de biomasa en el cultivo con limitación a partir de datos de oxígeno disuelto, pH y consumo de azúcares permitiendo obtener una curva de biomasa del cultivo del limitante ajustada a la curva experimental con una precisión del 99%. Los resultados obtenidos en los niveles de oxígeno disuelto, azúcares, proteínas y biomasa permiten concluir que las condiciones experimentales del cultivo en deficiencia de Na_2HPO_4 afecta varias rutas metabólicas en la célula, provocando efectos notables en el desarrollo del cultivo, de igual manera se deriva que las redes neuronales artificiales permiten estudiar fenómenos biológicos con gran precisión estableciendo las bases teóricas para la predicción de efectos biológicos a partir de observaciones experimentales.

Palabras Clave. Estrés Oxidativo, Redes Neuronales, Bioprocesos.

Abstract

In the present work it was shown that a cultivation of *Phaffia rhodozyma* with a limiting concentration of 0.6 mM of Na_2HPO_4 promotes the synthesis of astaxanthin, it hinders the consumption of oxygen and sugars as well as the synthesis of proteins and biomass in comparison with the levels of said parameters in a culture without limitation, where the concentration on of Na_2HPO_4 is 2.74 mM. An artificial neural network was constructed to predict the changes in the level of biomass in the crop with limitation based on data of dissolved oxygen, pH and sugar consumption, allowing to obtain a biomass curve of the crop of the limiting adjusted to the experimental curve with a pres sure of 99%. The results obtained in the levels of dissolved oxygen, sugars, proteins and biomass allow to conclude that the experimental conditions of the culture in deficiency of Na_2HPO_4 affects several metabolic pathways in the cell, causing remarkable effects in the development of the culture, in the same way it is derived that the artificial neural networks allow to study biological phenomena with great pressure establishing the theoretical bases for the prediction of biological effects from experimental observations.

Keywords. Oxidative stress, Neural Networks, Bioprocess, Metabolism.

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de estudios de posgrado otorgada para la realización del presente estudio.

Al Cinvestav Unidad Zacatenco, en particular al Departamento de Biotecnología y Bioingeniería por todo el apoyo académico, administrativo y de infraestructura para la realización de presente trabajo.

Al Doctor Luis Bernardo Flores Cotera, por todos sus buenos consejos, recomendaciones y enseñanzas en el transcurso de los cursos de maestría y las evaluaciones de resultados, especialmente por aceptarme como parte de su equipo y por transmirme motivación por el rigor científico.

A mi comité de tutores, que en todo momento aportaron sus buenos consejos y recomendaciones; al Doctor Carlos Coello por su valiosa opinión sobre las redes de regualación, al Doctor Rodolfo Marsh por sus valiosas observaciones sobre los efectos de una limitación de nutrientes y la Doctora Flor Nohemi Rivera Orduño por sus comentarios y apoyo en su laboratorio.

A el equipo del laboratorio 48, que nos brindaron su ayuda en todo momento, gracias por todo a Fernando, Zoila y Humberto; y a Cipriano y Anahí que nos ayudaron a iniciarnos en esta linea de investigación.

A Roxana, Ezequiel e Iris por su magnífica compañía, motivación e inolvidables pláticas.

A mi familia, por su apoyo, paciencia y buenos momentos.

Computers are incredibly fast, accurate, and stupid. Human beings are incredibly slow, inaccurate, and brilliant. Together they are powerful beyond imagination.

Albert Einstein, theoretical physicist.

*Sometimes it is the people no one can imagine anything of who do the things
no one can imagine.*

Alan Turing

Science is not only a disciple of reason but also one of romance and passion.

Stephen Hawking

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes

El uso de modelos computacionales para describir fenómenos biológicos y funciones celulares es un campo emergente en la biología sintética cuyo objetivo es diseñar y construir nuevos circuitos biológicos en las células, ya sea para modelar funciones existentes o crear otras nuevas[1]. Un circuito genético es un conjunto de elementos de expresión y de regulación que desarrollan funciones lógicas mediante una implementación controlable y racional [2]. En 2009 el equipo dirigido por el doctor Mario di Bernardo de la Universidad de Nápoles en Italia, publicó la conversión de un circuito genético de levadura en un oscilador sintético ajustable.¹ Utilizando herramientas no lineales de análisis matemático, el doctor Mario di Bernardo evaluó la dinámica de interacción entre genes de un circuito genético de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* descubriendo que las interacciones entre los componentes de una red de regulación dependen de sus propiedades topológicas [2] y encontrando que dicha red puede ser fácilmente convertida en un oscilador sintético ajustable [4]. En el año 2010,

¹Un oscilador es un circuito que produce una señal repetitiva, a menudo senoidal, del mismo modo y en aplicaciones biológicas, un oscilador sintético ajustable es un circuito que no existe de manera nativa en la célula y cuya intensidad de señal puede ser ajustada artificialmente [3].

Chávez-Cabrera *et al.* mostraron que la levadura *Phaffia rhodozyma* acumula carotenoides cuando crecen en un medio limitado por amonio [5], evidenciando la correlación entre dos variables cuyos valores son función de la actividad de enzimas específicas, que puede conceptualizarse en términos algebraicos como funciones biyectivas de variables dependientes [2]. En 2011, un equipo de biólogos sintéticos de la Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins publicó sus estudios en la levadura *S. cerevisiae* con brazos cromosómicos montados a partir de ADN químicamente sintetizado. Esta publicación es un hito en la historia de la biología sintética en eucariontes al ofrecer la posibilidad de disponer de organismos eucariontes diseñados por el hombre [4]. En ese mismo año, Blount *et al.* y colaboradores publicaron los resultados de su trabajo donde construyeron una red sintética de regulación genética² en *S. cerevisiae* implementando un sistema reproducible de reprogramación celular en levaduras. Para el año de 2013, James E. DiCarlo y su equipo reportaron el uso del sistema CRISPR-Cas de tipo II en *S. cerevisiae* para dirigir mutaciones puntuales al genoma de la levadura e incrementar las tasas de recombinación con oligonucleótidos exógenos, evidenciando el potencial de esta herramienta para la edición genética en levaduras. Martínez-Cardenas (2015), demostró que la respuesta adaptativa de *P. rhodozyma* a estímulos de estrés nutricional implica cambios en el consumo de oxígeno, azúcares, producción de carotenoides y cambios en la velocidad específica de crecimiento [7], hecho que sugiere una conexión entre un *modelo de respuesta a estrés* que implica una expresión diferencial del genes, permitiendo la respuesta adaptativa de la célula ante los estímulos externos [7].

1.2. Papel biológico de los fosfatos

El fósforo está involucrado en diversos procesos biológicos que incluyen la integridad de la membrana, el mantenimiento y la herencia de material genético,

²Red sintética de regulación genética se encuentra definida como una red de regulación introducida al organismo mediante elementos exógenos [6]

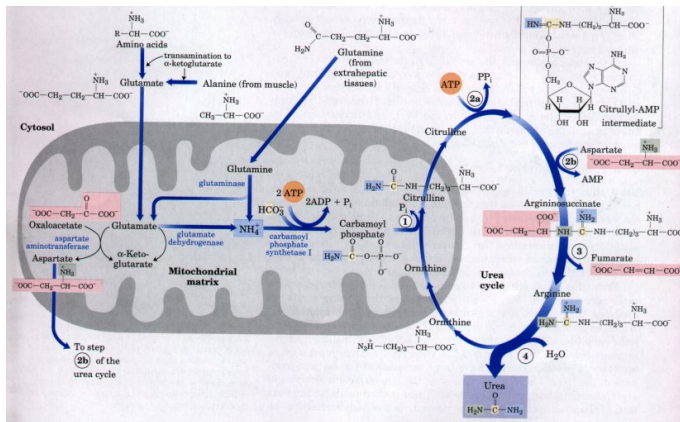


Figura 1.1: Esquema general de la oxidación de aminoácidos.

el metabolismo energético y la señalización intracelular. Por ejemplo, el fósforo es componente de los fosfolípidos que aseguran la integridad de la membrana biológica, es también fundamental en la síntesis de ATP para la generación de energía etc. Diversos estudios han demostrado que la alteración en los niveles de fosfato inorgánico (P_i) extracelular, ya sea un exceso o una limitación desencadena cascadas de señalización para regular la expresión génica y el metabolismo [8]. En cuanto a los aspectos fisiológicos, se sugiere que un aumento en P_i extracelular desencadena la transducción de señales a través del cotransportador de sodio / fosfato (Na^+ / P_i) $PiT1$ tipo III y la ruta ERK1 / 2. Los organismos unicelulares, como las bacterias y las levaduras, detectan el P_i ambiental mediante complejos de proteínas ubicados en la membrana plasmática, que regula la expresión de múltiples genes involucrados en la captación y el metabolismo del P_i para adaptarse a su disponibilidad, en específico genes del operón PHO y de la familia SPX [9]. En los mamíferos, la disponibilidad de P_i se debe detectar tanto a nivel celular para regular la función de cada célula como de todo el cuerpo para mantener la homeostasis del fluido extracelular [10].

En levaduras, la regulación de fosfato se mantiene mediante la entrada y salida de los iones mediante la operación de múltiples co-transportadores de sodio / fosfato (Na^+ / P_i), así como la regulación de varias hormonas [11].

Las alteraciones en los niveles de fosfato extracelular provocan que moléculas de señalización activen receptores anclados a la membrana celular, los cuales a su vez interaccionan con segundos mensajeros intracelulares [11], que provocan la transducción de señales para regular la expresión de genes y el comportamiento celular adaptativo[9]. La carga excesiva de fosfato puede provocar varios efectos nocivos al aumentar el estrés oxidativo y desregular la transducción de señales. La capacidad de respuesta de las células eucariontas a los niveles de fosfato extracelular sugiere que pueden detectar cambios en la disponibilidad de fosfato y adaptarse a ellos. Los organismos unicelulares, utilizan algunos tipos de transportadores de Pi fosfato de alta afinidad y otras moléculas, como las ciclinas dependientes de inhibidores de cinasas(CKI), para detectar cambios en la disponibilidad ambiental de Pi [9]. Los organismos multicelulares pueden necesitar integrar señales de varios órganos para detectar los niveles de fosfato como un organismo completo, de manera similar a las plantas superiores[12].

1.3. Sistemas vivos

Las células vivas realizan múltiples funciones celulares para obtener información del medio ambiente, capturar nutrientes y mantener en operación sus sistemas metabólicos [13]. Una máquina de estados finitos es un modelo de comportamiento con entradas y salidas de datos, donde las salidas son función de las señales de entrada actuales y de conjunto de salidas anteriores [13], en ese sentido las células pueden ser conceptualizadas como máquinas de estados finitos, donde cada célula, al comportarse como un sistema dinámico, adquiere, almacena y procesa información del entorno [13], [14]. Esta información determina estados futuros y permite al sistema evolucionar en función del tiempo [15].

1.3.1. Redes neuronales artificiales

Los modelos de redes neuronales artificiales (RNAs) son abstracciones matemáticas de la estructura del sistema nervioso, desarrollados para emular el

funcionamiento de los sistemas neuronales biológicos. Estos modelos se basan en el óptimo tratamiento que realizan las millones de neuronas que conforman el cerebro a la información masiva, imprecisa y distorsionada proveniente del ambiente. El objetivo de emular estas estructuras neurobiológicas, es la construcción de sistemas de procesamiento paralelo de cálculo, memoria distribuida y adaptabilidad al entorno, mediante la interconexión de unidades de procesamiento virtuales. Los modelos matemáticos obtenidos a partir de RNAs se caracterizan por su robustez y, capacidad de aprendizaje, generalización y tolerancia a fallas. Una red neuronal artificial (RNA) es fundamentalmente, un sistema reticular constituido por estructuras paralelas que contienen procesadores elementales, llamados neuronas, dispuestos en capas e interconectados a través de enlaces con diferentes pesos numéricos asociados a cada elemento. Los elementos fundamentales de toda red neuronal artificial son una capa de entrada, una capa de procesamiento y una capa de salida, donde se encuentran asociadas variables de entrada y de salida, pesos numéricos sinápticos, función de activación, función de propagación y función de salida. La configuración de estos elementos define la eficiencia del sistema [16].

Perceptrón multicapa.

La red neuronal artificial utilizada para el desarrollo del programa utilizado en este trabajo se denomina red neuronal perceptrón multicapa (RNPM). Este modelo neuronal se caracteriza por ser unidireccional con conexiones *feedforward*, carente de interconexiones a otras neuronas de una misma capa o conexiones hacia neuronas de capas anteriores. En una RNPM el número de capas ocultas puede ser mayor o igual que uno, y difiere del perceptrón simple debido a la implementación de una función de activación no lineal. La arquitectura de la RNPM (Figura 1.2) dispone de tres tipos de capas que son :

1. La capa de entrada: receptora de la información desde el exterior
2. Las capas ocultas: operadoras de las funciones de asociación entre la entrada y la salida.

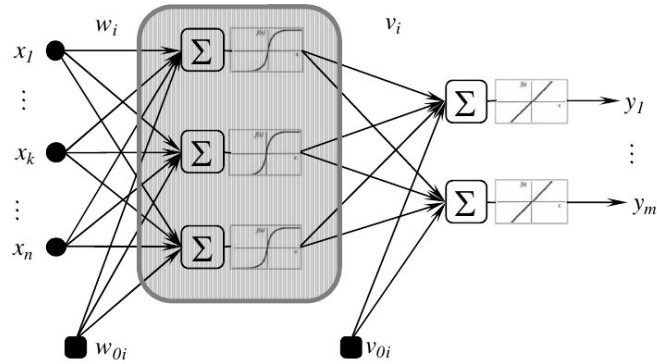


Figura 1.2: Estructura general de una red neuronal perceptrón multicapa.

3. La capa de salida: Devuelve las predicciones de la red neuronal.

La salida de una capa oculta del perceptrón multicapa, puede ser representada con la expresión:

$$f(x = GW^T x + b) : R^D \rightarrow R^L \quad (1.1)$$

Donde D es el tamaño del vector de entrada x .

L es el tamaño del vector de salida.

G es la función de activación.

1.4. Redes neuronales y su aplicación en investigaciones biológicas

En la actualidad, se han desarrollado diversos estudios de modelos de predicción y análisis que integran técnicas de inteligencia artificial, cuya estructura computacional flexible es capaz de identificar relaciones complejas no lineales entre los datos de entrada y salida [16]. Estudios recientes han desarrollado distintos modelos de redes neuronales artificiales para la predicción de cambios en variables biológicas muy diversas, ejemplos de ello son los estudios llevados a cabo por las corporaciones Verily Life Sciences y Google Inc. donde desarrolla-

ron una red neuronal para aprendizaje profundo denominada *DeepVariant* que es capaz de identificar variaciones genéticas en bases de datos de secuenciación masiva de ADN, revelando detalles hasta ahora desconocidos sobre el genoma [17]. Otro ejemplo son los estudios realizados en el Centro de Investigación para las Ciencias de la Salud de Portugal, donde se utilizaron RNA para optimizar la temperatura, flujo de metanol y concentración de dimetilsulfóxido en un cultivo en bioreactor para producir la enzima Catechol-O-Metiltransferasa. Los resultados mostraron que la RNA fue capaz de describir con gran precisión los efectos de las variables mencionadas en la producción de la enzima [18], ejemplificando así la reelevancia de estos modelos matemáticos en el desarrollo de muchas áreas de la biotecnología moderna.

1.5. Modelo experimental.

Phaffia rhodozyma es un basidiomiceto con capacidades fermentativas aislado en la década de 1960 durante una expedición del científico Herman Phaff, esta levadura presenta un estado anamórfico conocido como *P. rhodozyma* y un estado teleomórfico conocido como *Xanthophyllomyces dendrorhous* y adquiere una importante reelevancia en biotecnología debido a su capacidad de producir el carotenoide 3,3'-dihydroxy-beta, beta-caroteno-4,4'-diona (astaxantina), de importante valor comercial [19]. Este microorganismo posee un amplio rango de genes relacionados a la protección al estrés oxidativo. Sin embargo, la astaxantina es considerada como antioxidante primario en esta levadura por su efectivo efecto antioxidante contra especies reactivas de oxígeno[20]. Cultivos por lote de este microorganismo pueden ser implementados en bioreactor para estudios diversos en procesos con duraciones típicas cercanas a las 80 horas, generando así grandes volúmenes de información [20]. Estudios previos [5],[7] reportan el efecto de la deficiencia nutricional en el medio de cultivo de diversos nutrientes tales como el cobre, el nitrógeno, fosfatos, entre otros, sobre la producción de biomasa, el consumo de oxígeno y de azúcares y la producción de carotenoides etc.

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la deficiencia de Na_2HPO_4 en cultivos por lote de *Phaffia rhodozyma*.

2.1.1. Objetivos particulares

1. Implementar un cultivo en bioreactor por lote de *P. rhodozyma* a partir de un medio definido completo [21] y otro cultivo con una concentración limitante de Na_2HPO_4 .
2. Evaluar el efecto de la deficiencia de Na_2HPO_4 en la respiración, consumo de azúcares, desarrollo de biomasa, niveles de proteína y concentración de carotenoides en cultivos por lote en bioreactor de *Phaffia rhodozyma*.
3. Desarrollar una aplicación aplicando técnicas de inteligencia artificial para simular el desarrollo de biomasa en los cultivos en bioreactor y establecer las bases de un modelo para futuras aplicaciones.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Cultivo de la cepa y conservación

Se utilizó la cepa NRRL-Y-10922 de *P. rhodozyma*. Esta levadura se propaga en cajas petri con medio YM sólido (Glucosa (1.0%), extracto de levadura (0.3%), extracto de malta(0.3%), bactopectona (0.5%), y agar (1.5%) (Becton,Dickinson & Co., Sparks, MD, USA). Cada colonia aislada se transfirió a matraces de 250 ml conteniendo 32 ml de medio YM líquido (10 g/l dextrosa, 3 g/l de peptona de caseína, 3 g/l de extracto de malta, 5 g/l extracto de levadura) incubando cada matraz a 20 °C y 150 rpm durante 72 h. Los cultivos fueron conservados de acuerdo al método descrito en el anexo 1. El inóculo fue preparado en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 32 ml de medio YM líquido. El liofilizado de la levadura fue suspendido en 200 μ l de medio YM líquido, extendido sobre placas petri con medio sólido YM e incubadas a 20 °C durante 72 h. Una colonia aislada fue transferida a una nueva placa con medio YM sólido e incubada durante 72 h. A partir de este cultivo se inocularon tres matraces Erlenmeyer que contienen 32 ml medio líquido YM y fueron incubados a 22 °C, durante 18 h a 120 rpm en un agitador orbital (New Brunswick, NJ, EE. UU.)

3.2. Experimentos en bioreactor

Los experimentos en bioreactor se realizaron para comparar el desarrollo del cultivo de *P. rhodozyma* en condiciones sin limitación y con limitación de fosfatos, estos experimentos se llevaron a cabo en un sistema de fermentación Applikon myControl (Delft, The Netherlands) con jarras de fermentación de 3 litros, el volumen de operación fue de 2.1 l y las condiciones de trabajo fueron de 1 vvm de flujo de aire, 700 rpm de agitación, 20 °C (constante) y a un pH libre de control hasta 4.5 cuando se inició el control automático con una solución de NaOH al 5%.

3.3. Medios de cultivo

Los componentes del medio completo fueron los siguientes (en g l^{-1}), 30 de Sacarosa, 0.39 de Na_2HPO_4 , 0.002 de $\text{FeSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$, 0.08 de $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$, 0.07 de KCl, 0.02 de $\text{CaCl}_2/2\text{H}_2\text{O}$, 5.95 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.002 de $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$, 0.0006 de $\text{CuSO}_4/5\text{H}_2\text{O}$, 0.012 de $\text{ZnSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$, 0.0006 de $\text{MnSO}_4/\text{H}_2\text{O}$, 0.0002 de $\text{CoSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$, 0.00013 de H_3BO_4 , 0.00053 de $\text{Na}_2\text{MoO}_4/2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 de NaCl y 1.8 de Na_2SO_4 , además de 12 ml de solución de vitaminas cuya composición fue (en mg/l) 150 de pantotenato de calcio, 76 de tiamina, 4 de biotina, 7.6 de cianocobalamina, 7.6 de mio-inositol, 38 de piricloruro de piridoxina, 76 de riboflavina y 450 de nicotinamida (Todas las vitaminas de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), la solución de vitaminas y la preparación de los medios de cultivo se realizaron utilizando agua desionizada [7].

El medio con limitación se preparó con los mismos componentes y concentraciones que el medio completo salvo la disminución en la concentración de Na_2HPO_4 a 0.0851 g l^{-1} (0.6mM).

3.4. Toma de muestras y diseño experimental

Una vez inoculado el bioreactor, se colectaron muestras cada 6 horas para obtener datos de peso seco de biomasa, proteínas totales, azúcares totales, carotenoides totales y porcentaje de astaxantina. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.5. Análisis de metabolitos y peso seco

Para las mediciones de peso seco de biomasa, cada muestra de 5 ml de medio de cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 m para obtener el paquete celular. Este se lavó con 5 ml de agua bidestilada y se centrifugó a las mismas condiciones. Las células lavadas se resuspendieron en 3 ml de agua bidestilada y se secaron en charolas colocadas a peso constante durante 24 h en un horno a 80 °C y se enfriaron en desecador durante 24 h antes de ser pesadas en una balanza analítica (Kern c200).

3.5.1. Análisis de proteínas

La determinación de proteínas totales se llevó a cabo mediante el método de Biuret [22]. Para disolver la proteína contenida en el paquete celular obtenido por centrifugación de 2-3 ml de muestra las células se resuspendieron en 0.5 ml de NaOH 1N y calentaron en baño maría a 90°C por 20 min. Después de enfriar, las muestras con la proteína disuelta se llevaron a 1 ml con agua destilada y se les agregaron 4 ml del reactivo de Biruet. El desarrollo de color se permitió durante 30 min de reacción. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min para separar los restos celulares y se determinó absorbancia a 550 nm en un espectrofotometro (CLARIOStar BMGLabTech).

3.5.2. Determinación de amonio residual

Los niveles de amonio residual se determinaron mediante la reacción de Berthelot[23]. A cada muestra se le agregaron 2.5 ml de una solución conteniendo

do C_6H_6O (1 %) y $Na_2(Fe(CN)_5 NO) 2H_2O$ (0.005 %) y 2.5 ml de una solución que contenía $NaClO$ (0.05 %) y $NaOH$ (0.5 %). Se agitó hasta un mezclado homogéneo, se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir el desarrollo de color. La absorbancia fue medida a 625 nm un espectrofotómetro (CLARIOStar BMGLabTech).

3.5.3. Análisis de azúcares reductores

Con base al procedimiento descrito en Miller (1959), cada muestra se hidrolizó adicionando 30 μ l de HCl 37 % (11.9 N) e incubando a 90°C durante 8 min. Posteriormente cada muestra se neutralizó con 30 μ l de $NaOH$ 40 %. A continuación se agregaron 3 ml de agua destilada y se adicionaron 3 ml de reactivo DNS. Esta preparación se incubó durante 20 min en agua en ebullición, transcurrido ese tiempo se agregó 1 ml de solución de tartrato a cada muestra y se leyó la absorbancia a 575 nm en un espectrofotómetro (CLARIOStar BMGLabTech). La tasa específica de consumo de azúcar fue calculada asumiendo una función continua de concentración de azúcar a partir del cociente entre la tasa de consumo de azúcar ($g\ l^{-1}$) y concentración de biomasa ($g\ l^{-1}$) mediante el teorema del valor medio.

3.5.4. Determinación de carotenoides

La cuantificación de carotenoides se realizó según un método modificado descrito anteriormente [35]. El paquete celular se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm para eliminar los residuos celulares. El paquete celular fue pulverizado en vortex con 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) agregando a cada muestra 0.2 ml de H_2PO_4 0.01 M y 1 ml de dimetilsulfóxido a 58 °C e incubando la mezcla durante 1 minuto a la misma temperatura. A continuación, los carotenoides fueron extraídos con 2.5 ml de una mezcla 50:50 (v/v) de hexano:acetato de etilo. Los tubos se agitaron vigorosamente en vortex durante 1 minuto adicional y las fases orgánica y acuosa se separaron por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 min; la fase orgánica conteniendo los carotenoides se

leyó en a 480 nm e un espectrofotómetro Biowave II (Biochrom US, Holliston, MA, USA). La concentración de carotenoides se calculó mediante la siguiente ecuación usando un coeficiente de extinción de 2100:

$$\frac{\mu g}{ml} = \frac{1000 * A * V_s}{V_m * E_{1cm}^{1\%}}$$

Donde A es la absorbancia a 480 nm, V_s es el volumen de solvente recuperado, V_m es el volumen de muestra y $E_{1cm}^{1\%}$ es el coeficiente de extinción específico para astaxantina.

3.6. Implementación del algoritmo

Se desarrolló una red neuronal artificial con el objetivo de obtener predicciones de los niveles de biomasa del cultivo en limitación a partir de datos de consumo de oxígeno y consumo de azúcares, utilizando como datos de entrenamiento los datos del cultivo en medio completo. El algoritmo para implementar la Red Neuronal Perceptrón Multicapa se implementó en el lenguaje python 2.7.13 cuyas operaciones clave se describen a continuación.

Definir las clases para representar las neuronas de la red.

```
class LayerN():
```

```
    def __init__(self, numero de entradas, numero de neuronas):  
        asigna los pesos sinapticos iniciales.
```

```
class ANN():
```

```
    def __init__(self, capa_1, capa_n-1, capa_n):  
        Asigna las capas correspondientes al objeto.
```

```
def_funcionSigmoide(Neurona)
```

```
    return La salida de la neurona.
```

```
pesos_S = Inicializa los pesos para la matriz de la primer sinapsis aleatoriamente.
```

Implementa cambios en las matrices de salida de las capas.

```
def test_N(self, inputs):
```

Donde $i = 0$

salida en capa $i =$ producto punto

salida de la capa $i + 1 =$ producto punto

Iterar sobre cada capa disponible.

return salida en capa i , salida en capa n

Inicializamos parametros para construir la red.

$x_0 =$ Matriz de datos de entrada.

$y_0 =$ Vector de datos de salida.

$n_i =$ Numero de iteraciones.

$n_n =$ Numero de neuronas en la capa oculta.

Obtener conjunto de entrada.

Obtener conjunto de salida.

```
def entrenamiento (self,  $x_0$ ,  $y_0$ ,  $n_i$ ):
```

```
    for iteration in xrange( $n_i$ ):
```

```
        salida en capa  $i =$  self.test_N( $x_0$ )
```

```
        salida en capa  $i+1 =$  self.test_N( $x_0$ )
```

```
        Optimizacion para el RMSE mediante el algoritmo Levenberg Marquardt.
```

```
        Calcular error y deltas para cada capa.
```

```
        ajuste_capa_ $i =$  producto punto( $x_0$ , delta capa 1)
```

```
        ajuste_capa_ $i+1 =$  producto punto( $x_0$ , delta capa 2)
```

```
        ajuste de pesos para capa  $i$ 
```

```
        ajuste de pesos para capa  $i+1$ 
```

Crear la capa i de la red con n neuronas y m entradas

```
capa_ $i =$  LayerN( $n$ ,  $m$ )
```


Repetir para cada capa de la red.

Crear la red con n neuronas.

```
ann = ANN(Numero de capas disponibles.)
```

Entrenar la red.

```
ann.entrenamiento(datos de entrada, datos de salida, ciclos de entrenamiento)
```

3.6.1. Estructura y parámetros de la red

La estructura de la red se compone de dos conjuntos de datos de entrada (oxígeno disuelto y azúcares) y un conjunto de datos de salida. Se utilizó el algoritmo Levenberg-Marquardt para optimizar el error cuadrático medio y mejorar el ajuste de reconocimiento de patrones debido a que para este problema en particular, se considera que los parámetros para esta red no son numerosos. Por lo tanto, la elección de este algoritmo se justifica para ganar velocidad de procesamiento. Se realizaron 2000 repeticiones de ejecución del programa hasta alcanzar la validación total de la información en conjunto con un gradiente con cinco revisiones de validación para evaluar la calidad del sistema. Se evaluó la respuesta de la red a la variación del número de capas (desde 1 hasta 5) y el número de neuronas por capa (desde 2 hasta 10), generando así 25 del modelo. El programa utiliza el 60 % de los datos de los periodos seleccionados para la fase de entrenamiento y los restantes para la validación y prueba del modelo (10 % para cada fase, respectivamente). Los pesos iniciales fueron asignados aleatoriamente en el intervalo de $(-0.5,+0.5)$. En cada modelo se aplicó la función de entrenamiento y la posterior evaluación de las capacidades predictivas del sistema. Como entradas del modelo se utilizaron datos de oxígeno disuelto y azúcares reductores y como salida del modelo se utilizaron los datos de biomasa. (Figura 4.2)

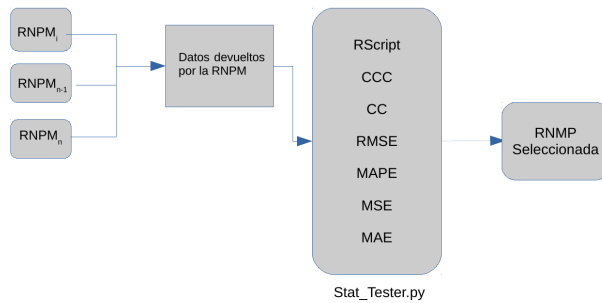


Figura 3.1: Esquema de flujo para el análisis estadístico de resultados.

3.6.2. Análisis estadístico y métricas de evaluación

Para evaluar la precisión de los modelos elegidos se implementó un programa en lenguaje R, manejado mediante un programa en `python` como subproceso `subprocess.call()` que evalúa los valores de los parámetros estadísticos reportados como métricas de evaluación en estudios de modelos de simulación, [24] los cuales son el coeficiente de correlación (CC), coeficiente de concordancia (CCC), raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE), error porcentual absoluto de la media (MAPE), error medio cuadrático (MSE) y error medio absoluto (MAE) de los datos de salida de cada modelo disponible de la red neuronal. El programa almacena la información en disco para su análisis mediante objetos de la clase `shelve` y de acuerdo a la figura 3.1.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Efecto de la deficiencia de Na_2HPO_4 en la respiración y el crecimiento

En el experimento con medio completo, durante la fase de crecimiento exponencial entre las 18-42 h, la levadura creció con mayor rapidez (μ avg $0.39 h^{-1}$) en comparación a la velocidad de crecimiento en deficiencia de Na_2HPO_4 , donde la velocidad máxima en el rango entre las 18-45 h, se alcanzó a la hora 45 (μ avg $0.32 h^{-1}$). La comparación entre las curvas de crecimiento de ambos experimentos muestra concentraciones de biomasa máxima alcanzada similares, con una diferencia de casi el 10 % (9.95 vs. $10.87 g l^{-1}$), solo ligeramente desfasadas en el tiempo (figura 3.1 b). En el caso del cultivo en limitación crecimiento máximo ocurrió a las 50 h y se mantiene en fase estacionaria, mientras que en el cultivo en medio completo el nivel máximo de crecimiento es a las 40 h y hay una disminución de biomasa después del crecimiento máximo.

La limitación de Na_2HPO_4 (figura 4.1 b) provocó que la tensión de oxígeno en el cultivo con limitación fuese notablemente distinta a la observada en el cultivo con medio completo. Al comparar los niveles más bajos de tensión de oxígeno en dicho cultivo se observa un primer descenso pronunciado de la concentración

de oxígeno hasta un nivel del 2% a la hora 20 y un segundo descenso a la hora 48 hasta un 9% (figura 4.1 a), mientras que en el caso del experimento con limitación el descenso máximo de la concentración de oxígeno alcanza solo 48% de concentración a la hora 23 sin posteriores descensos hasta el fin del experimento, con una pendiente claramente menor en comparación con el cultivo en medio completo (figura 4.1 b).

4.2. Efecto de la deficiencia nutricional en el consumo de azúcares

Los resultados del análisis de azúcares revelan la evidencia del efecto de la deficiencia nutricional en el consumo de azúcares. Es claro que el agotamiento de azúcar ocurrió mucho más tarde en el cultivo en limitación donde se alcanza el nivel más bajo de concentración de azúcar a las 90 h (1.21 g/l) mientras que en el cultivo en medio completo el agotamiento de los azúcares ocurre a la 48 h (1.18 g/l). Adicionalmente, el cultivo con limitación presentó una disminución notable en la velocidad en el consumo de azúcar entre las 30-36 h (en concreto el consumo de azúcares pasó de 19 g/l a 18.8 g/l en dicho periodo) donde presumiblemente existió una acumulación temporal de etanol y al ser este consumido, el consumo de azúcares rápidamente continúa a partir de la 36 h (figura 4.1 d). El cultivo con limitación presentó dos intervalos de tiempo (30-36 h y 42-48 h) disminuyendo el consumo de azúcares, provocando descenso en la tasa de consumo específico de azúcares (q_s). En descensos en el valor de q_s fue especialmente notable en el primer intervalo (0.006 g/sacarosa g/células⁻¹ h⁻¹ en la hora 36 y 0.083 g/sacarosa g/células⁻¹ h⁻¹ entre las 42-48 h). Estas caídas en el valor de q_s ocurren a pesar de existir suficientes azúcares en el medio (19.0-18.8 g/l a las 30-36 h). En el segundo descenso en el consumo específico de azúcares se observa un descenso en la concentración de azúcar (8.74-5.42 g/l entre las 42-48 h), que podría estar asociado con el descenso de q_s (0.083 g/sacarosa g/células⁻¹ h⁻¹). En contraste, el cultivo en medio completo mostraba más continuidad en

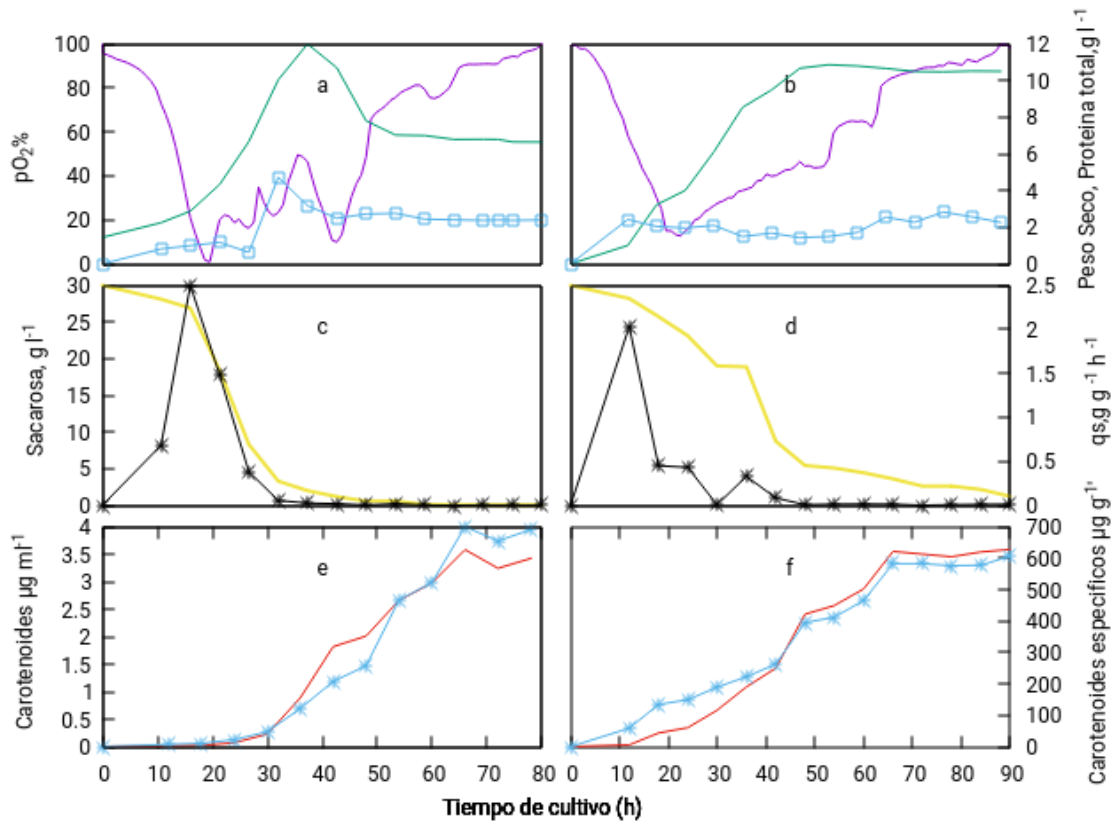


Figura 4.1: Desarrollo del cultivo de *P. rhodozyma* en medio sintético completo y en medio limitante. En la columna izquierda se muestran los resultados del desarrollo del cultivo en medio completo, del lado derecho se presentan los resultados de los experimentos en condiciones de limitación de fosfatos. Cada determinación fue realizada por triplicado. Línea verde = biomasa, línea morada = pO₂, línea-cuadros azul = proteínas totales, línea Amarilla = concentración de azúcares, línea Negra = velocidad específica de consumo de azúcares, línea Naranja = carotenoides volumétricos, línea-estrella azul = carotenoides específicos. Las condiciones de cultivo fueron 1 vvm de flujo de aire, 700 rpm de agitación, 20 °C de temperatura (constante) y pH libre de control hasta 4.5

el consumo de sacarosa desde la hora 0 hasta el agotamiento del azúcar en el caldo de cultivo (48 h) (figura 4.1 c).

4.3. Efecto de la deficiencia nutricional en el nivel de proteínas totales

Los niveles de proteínas totales observados en el experimento en medio limitante son claramente inferiores a la proteína total observada en el medio completo. Por ejemplo, en el experimento en medio completo se alcanza una concentración máxima de proteínas de 3.9 mg/ml a la hora 36 del cultivo mientras que en el experimento con limitación se observan tres picos de máxima producción de proteínas el primero a la hora 12 con 2.5 mg/l, a las 72 h con 2.7 mg/l y a las 84 h con 2.5 mg/l. Este hecho resalta la diferencia en los niveles de concentración de proteínas en ambos experimentos ya que la concentración máxima de proteínas totales en el experimento en medio completo es 39 % mayor (concentración máxima a la hora 36 %) en comparación con el experimento con limitación (figura 4.1 a, b).

4.4. Efecto de la deficiencia nutricional en la producción de carotenoides

La comparación entre los resultados de los análisis de carotenoides del cultivo con limitación de Na_2HPO_4 y el cultivo en medio completo muestran que en las primeras 20 h de cultivo los niveles de carotenoides son muy similares. Sin embargo, a partir de la hora 20 en el experimento con limitación, el contenido de carotenoides específicos comienzan a ser más elevados que en el cultivo en medio completo hasta alcanzar un nivel máximo a las 90 h de $616\mu\text{g g celulas}^{-1}$ en comparación del cultivo en medio completo donde se alcanzaron $460\mu\text{g g celulas}^{-1}$ (figura 3.1 f). Para analizar con mayor detalle estas observaciones podemos dividir los experimentos de fermentación en tres etapas. La primer

etapa, corresponde a la fase lag, comprendido entre la hora 0-24 de ambos cultivos donde se observa una similitud general entre ambos niveles de carotenoides. Sin embargo en la segunda etapa del experimento, entre las 24-48 h, la concentración de carotenoides en el cultivo con limitación comienza a ser mas elevada que el cultivo sin limitacion, y se observa que el nivel máximo de carotenoides en el cultivo en medio completo ($460\mu\text{g g celulas}^{-1}$) es superado a la hora 54 del cultivo en limitación ($465\mu\text{g g celulas}^{-1}$). A partir de este momento el cultivo en limitación produce considerablemente más carotenoides que el cultivo en medio completo ($3,2\mu\text{g ml}^{-1}$ vs $6,2\mu\text{g ml}^{-1}$).

4.5. Capacidad de respuesta de la red neuronal.

Al analizar todos los criterios estadísticos evaluados para todas las arquitecturas del modelo, el modelo no. 25 ofreció mejores resultados a juzgar por el máximo coeficiente de correlación y por los valores de los otros criterios estadísticos antes mencionados. Este modelo de la red se seleccionó debido a que presenta la mayor precisión, con un máximo Coeficiente de Correlación (0.9958) revelando que dicho modelo presenta un 99 % de precisión del pronóstico en la correlación de los datos de prueba contra los datos simulados por la red neuronal. Se observa así mismo el mayor coeficiente de concordancia (0.9958), menor error medio absoluto (0.0171) y menor error medio cuadrático (0.00060), analizando los valores obtenidos de error porcentual absoluto de la media se observa que el resultado de las predicciones del modelo 25 son aceptables al tener un valor de error cuadrático medio menor al 5 % (Cuadro 1). En este modelo se implementaron 2 capas y 3 neuronas por cada capa y los resultados mostrados revelan la importancia de evaluar el número de capas y de neuronas para mejorar la predicción del sistema.

Cuadro 4.1: Métricas de evaluación.

Modelo	CC	CCC	RMSE	MAPE	MSE	MAE
Mod1	0.9877	0.9877	0.0272	5.1920	0.00071	0.0199
Mod2	0.9751	0.9751	0.0270	5.1901	0.00079	0.0198
Mod3	0.9807	0.9807	0.0270	5.1881	0.00071	0.0198
Mod4	0.9817	0.9817	0.0268	5.0199	0.00074	0.0197
Mod5	0.9841	0.9841	0.0265	5.0190	0.00071	0.0197
Mod6	0.9839	0.9839	0.0265	5.0160	0.00073	0.0196
Mod7	0.9899	0.9899	0.0264	5.0030	0.00071	0.0196
Mod8	0.9905	0.9905	0.0265	5.0001	0.00072	0.0195
Mod9	0.9913	0.9913	0.0263	4.9980	0.00071	0.0193
Mod10	0.9916	0.9916	0.0260	4.9078	0.00078	0.0193
Mod11	0.9944	0.9944	0.0258	4.8950	0.00071	0.0189
Mod12	0.9945	0.9945	0.0254	4.8072	0.00071	0.0188
Mod13	0.9945	0.9945	0.0250	4.7033	0.00070	0.0182
Mod14	0.9946	0.9946	0.0243	4.5234	0.00070	0.0181
Mod15	0.9947	0.9947	0.0240	4.5099	0.00070	0.0181
Mod16	0.9949	0.9947	0.0238	4.4999	0.00070	0.0180
Mod17	0.9952	0.9952	0.0235	4.4556	0.00070	0.0180
Mod18	0.9955	0.9955	0.0226	4.4188	0.00069	0.0179
Mod19	0.9955	0.9955	0.0226	4.4102	0.00067	0.0178
Mod20	0.9956	0.9956	0.0225	4.4011	0.00068	0.0178
Mod21	0.9956	0.9956	0.0225	4.4001	0.00068	0.0176
Mod22	0.9957	0.9957	0.0225	4.3398	0.00068	0.0175
Mod23	0.9957	0.9957	0.0224	4.3399	0.00069	0.0174
Mod24	0.9957	0.9957	0.0224	4.3301	0.00069	0.0172
Mod25	0.9958	0.9958	0.0223	4.3121	0.00060	0.0171

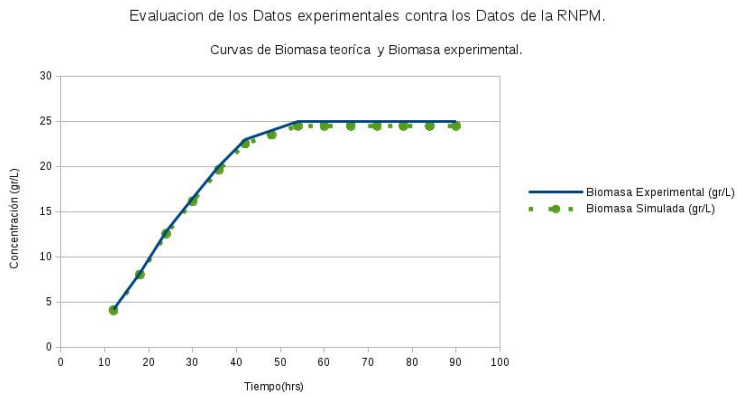


Figura 4.2: Comparación entre los resultados de los niveles de biomasa experimentales contra los niveles de biomasa predichos por la red neuronal. Gráfica de los resultados de la red neuronal. En verde, biomasa teórica predicha por la red neuronal, el modelo generó un resultado predictivo fiable a partir del set de datos de entrenamiento. En azul, biomasa experimental.

Capítulo 5

Discussion

5.1. Una limitación de 0.6 mM de Na_2HPO_4 tiene un efecto notable en la respiración y una leve repercusión en el crecimiento

En los sistemas biológicos el grupo fosfato está presente de manera predominante en forma de fosfatos de adenosina (AMP, ADP y ATP) e integrado en el material genético o presente de forma ionizada. El consumo de oxígeno es notablemente vigoroso en el cultivo en medio completo entre las horas 6-20 donde se alcanzó una caída de la concentración de O_2 a niveles cercanos a cero, a pesar de existir un suministro constante de aire al medio de cultivo. En contraste el cultivo con limitación presentó mayores concentraciones de O_2 como resultado de un consumo lento de oxígeno provocado por la deficiencia de grupos fosfato, esto es consistente con informes anteriores que muestran que la deficiencia de fosfatos, en diversos tipos celulares, provoca una caída en la respiración mitocondrial [5]. Dado que el balance de O_2 se establece a partir de la relación entre el consumo de oxígeno por la mitocondria y el suministro de aire al medio de cultivo. Particularmente este suministro es una función de la tasa de agitación y el volumen de aire inyectado al bioreactor. Por lo tanto, una

vez fijadas dichas condiciones de operación es posible establecer que la variación en las concentraciones de oxígeno disuelto dependen de la actividad respiratoria celular. Por lo tanto, el consumo vigoroso de oxígeno en el cultivo en medio completo disminuye la pO_2 mitocondrial, mientras que el consumo lento de oxígeno en el cultivo con limitación invariablemente conduce a mayor pO_2 mitocondrial. Como consecuencia de estas observaciones y a partir de los niveles de oxígeno disuelto medidos, se puede sostener que el cultivo en condiciones limitantes estuvo expuesto a condiciones oxidativas más severas debido a un mayor nivel de pO_2 mitocondrial. Se puede inferir que la deficiencia de fosfato conduce a una lenta producción de ATP debido a que la reacción $Pi+ADP$ produce ATP celular. Puesto que la síntesis de proteína requiere de cantidades significativas de ATP, una lenta producción de ATP, necesariamente ralentiza la síntesis de proteína. De igual manera, los niveles de biomasa observados en ambos experimentos coinciden con las observaciones ya expuestas sobre los cambios en la respiración celular, ya que aunque los niveles de biomasa en ambos cultivos son muy similares (9.95 vs. 10.87 $g\ l^{-1}$ en el cultivo en medio completo y limitante respectivamente), aunque la diferencia en biomasa no es muy grande, si lo es en proteínas totales, hecho que sugiere como posible explicación que las células del cultivo con deficiencia de Pi, acumulan más ácidos grasos pero menos proteína.

5.2. La deficiencia nutricional de Na_2HPO_4 induce la síntesis de carotenoides

La comparación entre los niveles de carotenoides observados en ambos experimentos muestra que el mayor contenido de carotenoides por gramo de célula corresponde al cultivo con limitación. Esta observación indica que cuando la levadura se encuentra expuesta a una limitación de Pi, la síntesis de carotenoides es estimulada. La figura 4.1 b muestra claramente una respiración disminuida en el cultivo con limitación, lo cual daría lugar a un lento flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial y una subsecuente acumulación de cofactores

en estado reducido (tales como NADH y QH₂). A partir de esta observación y combinado con una mayor pO₂ promedio en este cultivo, se puede proponer la hipótesis de que la falta de fuentes de fosfatos en el medio con limitación provoca un desbalance redox y la formación especies reactivas de oxígeno de las cuales la célula debe protegerse a través de la acumulación de carotenoides . Estudios previos han demostrado que en diversos tipos de células eucariotas, altos niveles de O₂ y bajos niveles de síntesis de ATP pueden favorecer la producción de especies reactivas de oxígeno [7], [25], [26]. La rápida acumulación de carotenoides en el cultivo en limitación entre 20-70 h coincide con una baja tasa de consumo de oxígeno en ese periodo de tiempo, observación que refuerza la idea de que existe una relación clara entre la respiración, la síntesis de especies reactivas de oxígeno y la acumulación de carotenoides.

5.3. Los niveles de proteínas totales disminuyen como efecto de la deficiencia de Na₂HPO₄

La síntesis de proteínas comienza con la etapa de la iniciación de la traducción donde el factor de iniciación de la traducción eucarionte 3 (eIF3) se asocia al extremo 5' terminal de la molécula de mRNA así como con el extremo 5'UTR para interactuar con la subunidad 40s del ribosoma y mantener asociado al mRNA y a la subunidad 60s evitando su desacoplamiento prematuro. Este evento inicial se lleva a cabo en presencia de GTP, que es sintetizado durante el ciclo de Krebs [26]. Si este ciclo opera con deficiencia (lentamente) y la tasa de producción de ATP y GTP experimenta un decremento se puede inferir que la síntesis de proteínas también disminuye debido a la deficiencia de moléculas de alta energía necesarias en el ensamblaje y operación del ribosoma. Sin embargo, lo anterior sugiere que el efecto primario de la falta de Pi, debe ser en la fosforilación de ADP. Una lenta fosforilación elevaría el potencial de membrana de la mitocondria, afectando a su vez el flujo de electrones en la cadena respiratoria provocando un entorpecimiento en la operación normal del ciclo de Krebs por

deficiencia de NAD^+ . Los resultados obtenidos en el análisis del consumo de azúcares reductores y de respiración apoyan la idea de que la baja producción de energía debido a la lenta respiración celular, además de un lento consumo de azúcares relacionado con una deficiencia de NAD^+ provocado por un lento flujo de electrones y baja reoxidación del NADH en la mitocondria, provocando así una disminución de ATP para la síntesis de proteínas.

Capítulo 6

Conclusiones

La célula dispone de diversos mecanismos para la captación de información y energía del entorno y ajusta sus rutas metabólicas en complejos mecanismos de adaptación como respuesta a la información captada del medio ambiente. Este trabajo muestra que la exposición de la levadura *P.rhodozyma* a una deficiencia de 0.6 mM/l de Na_2HPO_4 provoca la afectación de la respiración celular, una disminución notable en la síntesis de proteínas totales y una acumulación muy importante de carotenoides, aportando evidencia indirecta de que una baja tasa de consumo de oxígeno puede provocar la generación de ROS a un nivel más elevado de lo habitual y por ello estimular la síntesis de carotenoides como mecanismo de protección al estrés oxidativo. La simulación de la curva de crecimiento de biomasa en un bioreactor operado en cultivo por lote utilizando redes neuronales multicapa, generó información estadística muy útil cuya implementación en el lenguaje Python 2.7.13 permitió obtener un modelo con coeficientes de correlación de Pearson y concordancia de un 0.9958 reflejando un vínculo muy fuerte entre los datos experimentales y los datos simulados por la red neuronal y en conjunción con error porcentual absoluto de la media menor al 5%, se obtuvo un modelo robusto con una elevada precisión en la predicción. La aplicación de este tipo de modelos representa una importante alternativa para la generación de herramientas de detección de limitaciones metabólicas acoplado al sistema

de adquisición de datos del bioreactor, que sea capaz de identificar cambios en patrones de los niveles de biomasa aportando información muy importante al experimentador para aplicar ajustes oportunos a las condiciones de cultivo o seleccionar cepas distintas de una misma línea celular optimizando condiciones de operación.

Capítulo 7

Anexo

7.1. Conservación de la cepa por liofilizado

A partir del stock original, en una placa con medio YM sembrar por estriamiento para generar colonias aisladas, transferir colonias aisladas en matraces individuales con medio YM líquido e incubar a 20°C durante 4 días a 150 rpm. Después de transcurrido ese periodo de tiempo, centrifugar la biomasa a 3500 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender las células en 10 ml de leche descremada, colocar 1 ml de la suspensión en ampolletas de vidrio y liofilizar durante 4 horas. Una vez completada la liofilización, sellar ampolletas al mechero.

7.2. Determinación de peso seco

Preparar charolas de aluminio a peso constante mediante su secado durante 72 horas a 95°C. Colectar 5 ml de muestra por duplicado y centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos, retirar el sobrenadante, lavar con 5 ml de agua bidestilada y centrifugar nuevamente a 3500 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender la biomasa en 3 ml de agua bidestilada y colocarla en las charolas para su secado durante 48 horas a 95°C, colocar en desecador durante 48 horas y pesar en balanza analítica.

Bibliografía

- [1] L. Marucci, D. A. W. Barton, I. Cantone, M. A. Ricci, M. P. Cosma, S. Santini, D. di Bernardo, and M. di Bernardo, “How to turn a genetic circuit into a synthetic tunable oscillator, or a bistable switch,” *PLOS ONE*, vol. 4, pp. 1–10, 12 2009.
- [2] G. Fritz, N. E. Buchler, T. Hwa, and U. Gerland, “Designing sequential transcription logic: a simple genetic circuit for conditional memory,” *Systems and Synthetic Biology*, vol. 1, pp. 89–98, Apr 2007.
- [3] W. O. Friesen and G. D. Block, “What is a biological oscillator?,” *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 246, no. 6, pp. R847–R853, 1984. PMID: 6742159.
- [4] S. Y. Lee, S. B. Sohn, Y. B. Kim, J. H. Shin, J. E. Kim, and T. Y. Kim, “Chapter 8 - computational methods for strain design,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 141 – 156, Boston: Academic Press, 2013.
- [5] C. Chávez-Cabrera, Z. R. Flores-Bustamante, R. Marsch, M. d. C. Montes, S. Sánchez, J. C. Cancino-Díaz, and L. B. Flores-Cotera, “Atp-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, pp. 1953–1960, Feb 2010.
- [6] Y. Schaerli, A. Jiménez, J. M. Duarte, L. Mihajlovic, J. Renggli, M. Isalan, J. Sharpe, and A. Wagner, “Synthetic circuits reveal how mechanisms of

- gene regulatory networks constrain evolution,” *Molecular Systems Biology*, vol. 14, no. 9, 2018.
- [7] A. Martínez-Cárdenas, C. Chávez-Cabrera, J. M. Vasquez-Bahena, and L. B. Flores-Cotera, “A common mechanism explains the induction of aerobic fermentation and adaptive antioxidant response in *Phaffia rhodozyma*,” *Microbial Cell Factories*, vol. 17, p. 53, Apr 2018.
- [8] E. Eskes, M.-A. Deprez, T. Wilms, and J. Winderickx, “ph homeostasis in yeast; the phosphate perspective,” *Current Genetics*, vol. 64, pp. 155–161, Feb 2018.
- [9] D. Secco, C. Wang, H. Shou, and J. Whelan, “Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the spx domain-containing proteins,” *FEBS Letters*, vol. 586, no. 4, pp. 289 – 295, 2012.
- [10] T. Michigami, M. Kawai, M. Yamazaki, and K. Ozono, “Phosphate as a signaling molecule and its sensing mechanism,” *Physiological Reviews*, vol. 98, no. 4, pp. 2317–2348, 2018. PMID: 30109818.
- [11] J. W. Booth and G. Guidotti, “Phosphate transport in yeast vacuoles,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 33, pp. 20408–20413, 1997.
- [12] D. R. Samyn and B. L. Persson, “Inorganic phosphate and sulfate transport in *S. cerevisiae*,” *Springer International Publishing*, pp. 253–269, 2016.
- [13] J. X. Zhou and S. Huang, “Chapter 5 - theoretical considerations for re-programming multicellular systems,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 81 – 99, Boston: Academic Press, 2013.
- [14] N. Slavov, E. M. Airoidi, A. van Oudenaarden, and D. Botstein, “A conserved cell growth cycle can account for the environmental stress responses of divergent eukaryotes,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 23, no. 10, pp. 1986–1997, 2012.

- [15] “Copyright,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. iv –, Boston: Academic Press, 2013.
- [16] “Neural networks principles,” Prentice-Hall Englewood Cliffs, 1994.
- [17] R. Poplin, “A universal snp and small-indel variant caller using deep neural networks,” *Nature Biotechnology*, vol. 36, no. 31, p. 983987, 2018.
- [18] A. Pedro, L. Martins, J. Dias, M. Bonifcio, J. Queiroz, and L. Passarinha, “An artificial neural network for membrane-bound catechol-o-methyltransferase biosynthesis with *Pichia pastoris* methanol-induced cultures,” *Microbial cell factories*, vol. 14, p. 113, 08 2015.
- [19] B. P. Tu, A. Kudlicki, M. Rowicka, and S. L. McKnight, “Logic of the yeast metabolic cycle: Temporal compartmentalization of cellular processes,” *Science*, vol. 310, no. 5751, pp. 1152–1158, 2005.
- [20] L. C. Mata-Gómez, J. C. Montañez, A. Méndez-Zavala, and C. N. Aguilar, “Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview,” *Microbial Cell Factories*, vol. 13, p. 12, Jan 2014.
- [21] L. Flores-Cotera, R. Martín, and S. Sánchez, “Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium.,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 55, pp. 341–347, Apr 2001.
- [22] G. Ag, “Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 177, pp. 751–66., 08 1949.
- [23] M. W. Weatherburn, “Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia,” *Analytical Chemistry*, vol. 39, no. 8, pp. 971–974, 1967.
- [24] S. Paul and A. Azeem, “An artificial neural network model for optimization of finished goods inventory,” *International Journal of Industrial Engineering Computations*, vol. 2, pp. 431–438, 04 2011.

- [25] G.-H. An, D. B. Schuman, and E. A. Johnson, "Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 55, no. 1, pp. 116–124, 1989.
- [26] W. A. Schroeder and E. A. Johnson, "Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 31, pp. 18374–18379, 1995.
- [27] G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [28] J. J. Sedmak, D. K. Weerasinghe, and S. O. Jolly, "Extraction and quantitation of astaxanthin from *phaffia rhodozyma*," *Biotechnology Techniques*, vol. 4, pp. 107–112, Mar 1990.
- [29] "Front-matter," in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. i – iii, Boston: Academic Press, 2013.
- [30] A. P. Arkin, D. Baker, K. Biliouris, G. Bokinsky, B. C. Bundy, P. Carrara, G. M. Church, P. C. Cirino, R. E. Cobb, D. T. Eriksen, T. Freestone, M. Fussenegger, D. Groff, J. C. Guimaraes, B. C. Heng, S. Huang, M. Itaya, M. C. Jewett, Y. Kaznessis, J. Keasling, J. E. Kim, T. Y. Kim, Y. B. Kim, Y. Kuruma, S. Y. Lee, S. Li, C. C. Liu, P. L. Luisi, Y. Luo, S. Ma, M. T. Mee, T. P. de Souza, S. Qian, A. Ranji, F. Richter, C. Schmidt-Dannert, J. H. Shin, P. Smadbeck, R. P. Smith, S. B. Sohn, P. Stano, N. Tang, Y. Tanouchi, J. Tian, I. Tikh, K. Volzing, H. H. Wang, J. C. Wu, L. You, H. Zhao, and J. X. Zhou, "Contributors," in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. vii – xi, Boston: Academic Press, 2013.
- [31] "Introduction," in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. xiii – xviii, Boston: Academic Press, 2013.
- [32] N. Tang, S. Ma, and J. Tian, "Chapter 1 - new tools for cost-effective {DNA} synthesis," in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 3 – 21, Boston: Academic Press, 2013.

- [33] P. C. Cirino and S. Qian, “Chapter 2 - protein engineering as an enabling tool for synthetic biology,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 23 – 42, Boston: Academic Press, 2013.
- [34] D. T. Eriksen, S. Li, and H. Zhao, “Chapter 3 - pathway engineering as an enabling synthetic biology tool,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 43 – 61, Boston: Academic Press, 2013.
- [35] J. C. Guimaraes, C. C. Liu, and A. P. Arkin, “Chapter 4 - from biological parts to circuit design,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 63 – 78, Boston: Academic Press, 2013.
- [36] F. Richter and D. Baker, “Chapter 6 - computational protein design for synthetic biology,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 101 – 122, Boston: Academic Press, 2013.
- [37] K. Volzing, K. Biliouris, P. Smadbeck, and Y. Kaznessis, “Chapter 7 - computer-aided design of synthetic biological constructs with the synthetic biology software suite,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 123 – 139, Boston: Academic Press, 2013.
- [38] B. C. Heng and M. Fussenegger, “Chapter 9 - design and application of synthetic biology devices for therapy,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 159 – 181, Boston: Academic Press, 2013.
- [39] R. E. Cobb, Y. Luo, T. Freestone, and H. Zhao, “Chapter 10 - drug discovery and development via synthetic biology,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 183 – 206, Boston: Academic Press, 2013.
- [40] G. Bokinsky, D. Groff, and J. Keasling, “Chapter 11 - synthetic biology of microbial biofuel production: From enzymes to pathways to organisms,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 207 – 223, Boston: Academic Press, 2013.
- [41] M. Itaya, “Chapter 12 - tools for genome synthesis,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 225 – 242, Boston: Academic Press, 2013.

- [42] R. P. Smith, Y. Tanouchi, and L. You, “Chapter 13 - synthetic microbial consortia and their applications,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 243 – 258, Boston: Academic Press, 2013.
- [43] P. Stano, T. P. de Souza, Y. Kuruma, P. Carrara, and P. L. Luisi, “Chapter 14 - semi-synthetic minimal cells: Biochemical, physical, and technological aspects,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 261 – 276, Boston: Academic Press, 2013.
- [44] A. Ranji, J. C. Wu, B. C. Bundy, and M. C. Jewett, “Chapter 15 - transforming synthetic biology with cell-free systems,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 277 – 301, Boston: Academic Press, 2013.
- [45] I. Tikh and C. Schmidt-Dannert, “Chapter 16 - towards engineered light-energy conversion in nonphotosynthetic microorganisms,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 303 – 316, Boston: Academic Press, 2013.
- [46] H. H. Wang, M. T. Mee, and G. M. Church, “Chapter 17 - applications of engineered synthetic ecosystems,” in *Synthetic Biology* (H. Zhao, ed.), pp. 317 – 325, Boston: Academic Press, 2013.
- [47] “Genetic circuits,” in *Synthetic Biology Advancement* (H. Zhao, ed.), pp. 327 – 333, Boston: Academic Press, 2013.
- [48] C. Bishop, *Neural Networks for Pattern Recognition*. Oxford University Press, 1996.