

- Akerlund T., Nordström K. y Bernander R. (1995) Analysis of cell size and DNA content in exponential growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **77**, 6791-6795.
- Amanullah, A., Hewitt, C.J., Nienow, A.W., Lee, C., Chartrain, M., Buckland, B.C., Drew, S. y Woodley, J.M. (2002) Application of multi-parameter flow cytometry using fluorescent probes to study substrate toxicity in the indene bioconversion. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 239-249.
- Amanullah, A., Hewitt, C.J., Nienow, A.W., Lee, C., Chartrain, M., Buckland, B.C., Drew, S. y Woodley, J.M. (2003) Measurement of strain-dependent toxicity in the indene bioconversion using multiparameter flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 405-420.
- Alakomi, H.L., Skyttä, A., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K y Helander, I.M. (2000) Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Env. Microbiol.* **66**, 2001-2005.
- Alvarez-Vasquez, F., Cánovas, M., Iborra, J.L. y Torres, N.V. (2002) Modeling, optimization and experimental assessment of continuous L(-)-carnitine production by *Escherichia coli* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 794-805.
- Aragozzini, F., Manzoni, M., Cavazzoni, V. y Craveri, R. (1987) D,L-carnitine resolution by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 95-98.
- Ayres, H.M, Furr, J.R y Russell, A.D. (1999) Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Let. Appl. Microbiol.* **28**: 13-16
- Bailey, J.E. (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1675.
- Bennett, P.M. y Holms, W.H. (1975) Reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* ML308 during growth on acetate. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 37-51.
- Betz, J.W., Aretz, W. y Hartel, W. (1984) Use of flow cytometry in industrial microbiology for strain improvement programs. *Cytometry.* **5**, 145-150.
- Bieber, L.L. (1988) Carnitine. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 261-283.
- Boye E. y Løbner-Olesen A. (1991) Bacterial growth control studied by flow cytometry. *Res. Microbiol.* **142**, 131-135.
- Bremer, J. (1983) Carnitine in intermediary metabolism. The biosynthesis of palmitoylcarnitine by cell subfractions. *J. Biol. Chem.* **238**, 2774-2779.

- Brenningstall, G.N. (1990) Carnitine deficiency syndromes. *Pediatr. Neurol.* **6**, 75-81.
- Brown, T.D., Jones-Mortimer, M.C. y Konberg, H.L. (1977) The enzymatic interconversion of acetate y acetyl coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 327-336.
- Boye, E. y Løbner-Olesen. (1990) Flow cytometry: Illuminating microbiology. *New Biol.* **2**, 119-125.
- Buchet, A., Nasser, W., Eichler, K. y Mandrand-Berthelot, M.A. (1999) Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator. *Mol. Microbiol.* **34**, 562-575.
- Button, D.K, y Robertson, B. (2001) Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometr. *Appl. Env. Microbiol.* **67**, 1636-1645.
- Cairney, J., I. R. Booth y C. F. Higgins. (1985) *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J. Bacteriol.* **164**, 1218-223.
- Calvani, M. y Arrigoni-Martelli, E. (1999) Attenuation by **actyl-carnitine** of neurological damage and metabolical derangements following brain ischemia and perfusion. *Tissue React.* **21**, 1-6.
- Calvani, M., Reda, E. y Arrigoni-Martelli, E. (2000) Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic. Res. Cardiol.* **95**, 75-83.
- Cánovas, M, Maiquez, J.R., Diego, T., Buendía, B., Espinosa, G. e Iborra, J.L.** (2001) **Production of L(-)-carnitine in membrane reactor systems by *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains. Modelling of the process.** En: *Proceedings of Engineering with membranes. Vol. I.* (Luque, S. y Álvarez, J.R. Ed.),pp.23-28. ISBN 84-669-5013-4.
- Cánovas, M., Maiquez, J.R., Obón, J.M. e Iborra, J.L. (2002) Modelling of the biotransformation of crotonobetaine into L(-)-carnitine by *Escherichia coli* strains. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 764-75.

- Carelli, A. Borghi, A., Carrano, L., Gastaldo, L. y Marinelli, F. (1995) Biotransformation of the lipoglycopeptide antibiotic A40926 by *Actinoplanes teichomyceticus* cells. *J. Ind. Microbiol.* **15**, 429-433.
- Cassey, B., Guest, J.R. y Attwood, M.M. (1998) Environmental control of pyruvate dehydrogenase complex expression in *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **159**, 325-329.
- Castellar M.R., Cánovas M., Kleber H-P. e Iborra J.L. (1998) Biotransformation of D(+)-carnitine by resting cells of *Escherichia coli* O44 K74. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 883-890.
- Castellar, M.R., Obón, J.M., Marin, A., Cánovas, M. e Iborra, J.L. (2001) L(-)-carnitine production using a recombinant *Escherichia coli* strain. *Enzyme. Microb. Technol.* **28**, 785-791.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterisation of **amplifiable** multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Chisholm, J.J.jr. (1970) Screening techniques for undue lead exposure in children: Biological and practical consideration. *J. Pediatr.* **79**, 719-738.
- Chohan, S., Izawa, H., Nishihara, H. y Takamura, Y. (1998) Changes in size of intracellular pools of coenzyme A and its thioesters in *Escherichia coli* K-12 cells to various carbon sources and stresses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1122-1128.
- Cole S.T. Colon C., Lemire B.D y Weiner J.H. (1985) Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **811**. 381-403.
- Crissman H.A., Darzynkiewicz Z., Tobey R.A. y Stenkamp J.A. (1985) Correlated measurements of DNA, RNA, and protein in individual cells by flow cytometry. *Science* **288**, 1321-1323.
- Cronan, J.E. y La Porte, D. (1996) Tricarboxylic acid cycle and glyoxilate bypass. En: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. (Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M.

- Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger 2<sup>nd</sup> ed). Vol I. pp. 206-216. American Society for Microbiology, Whashington, D.C.
- Csonka, L. M. (1991) Prokariotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.
- Czok, R. y Lamprecht, W. (1974) Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. En: **Methods of enzymatic analysis**. Academic press, Inc., New York, N. Y. Vol III. pp. 1446-1451
- Dâmelio, V., G. Russo y D. Ferraro. (1974) The effects of heavy metals on protein synthesis in crustaceans and fish. *Rev. Int. Oceanograph. Med.* **33**, 111-118.
- Davey H.M. y Kell D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* **60**, 641-696.
- De Buysere, M.S. y Olson, M.S. (1983) The analysis of acyl-coenzyme A derivatives by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **133**, 373-379.
- De Graef, M.R., Alexeeva, S., Snoep, J.L. y Teixeira, M.J. (1999) The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **18**, 2351-2357.
- Denton, R.M. (1976) Hormonal regulation of fatty acid synthesis in adipose tissue through changes in the activities of piruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1) and acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2). *Proc. Nutr. Soc.* **34**, 217-224.
- Degelau, A., Freitag, R., Linz, F., Middendorf, C., Scheper, T., Bley, T., Muller, S., Stoll, P. y Reardon, KF. (1992) Immuno and flow cytometric analytical methods for biotechnological research and process monitoring. *J. Biotechnol.* **25**, 115-144.
- Dixon, G.H. y Konberg, H.L. (1959) Assay methods for key enzymes of the glyoxilate cycle. *Biochemistry* **72**, 3.

- Dropsy, E.P. y Klibanov, A. M. (1984) Cholinesterase-catalysed resolution of D,L-carnitine. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 911-915.
- Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H-P. y Mandrand-Berthelot, M-A. (1994a) Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**, 775-786.
- Eichler, K., Schunck, W-H., Kleber, H-P. y Mandrand-Berthelot, M-A. (1994b) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Escherichia coli* gene encoding carnitine dehydratase. *J. Bacteriol.* **176**, 2970-2975.
- Eichler, K., Buchet, A., Bourgis, F., Kleber, H-P. y Mandrand-Berthelot, M-A. (1995) The *fix* *Escherichia coli* region contains four genes related to carnitine metabolism. *J. Basic. Microbiol.* **35**, 217-227.
- Eichler, K., Buchet, A., Lemke, R., Kleber, H-P. y Mandrand -Berthelot, M-A. (1996) Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcription activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 1248-1257.
- El-Mansi, EMT. (1998) Control of metabolic interconversion of citrate dehydrogenase between the catalytically active and inactive form in *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **166**, 333-339.
- Elssner, T., Preusser, A., Wagner, U. y Kleber, H.P. (1999) Metabolism of L(-)-carnitine by Enterobacteriaceae under aerobic conditions. *FEMS. Microbiol. Lett.* **15**, 295-301.
- Elssner, T., Henning, L., Frauendorf, H., Haferburg, D. y Kleber, H-P. (2000) Isolation, identification and synthesis of butyrobetainyl-CoA and crotonobetainyl-CoA, compounds involved in carnitine metabolism of *E. coli*. *Biochemistry* **39**, 10761-10769.
- Elssner, T., Engemann, C., Baumgart, K. y Kleber, H.P. (2001) Involvement of coenzyme A esters and two new enzymes and enoyl-CoA hydratase and a CoA-transferase, in the hydration of crotonobetaine to L-carnitine by *Escherichia coli*. *Biochemistry* **18**, 11140-48.

- Emmerling, M., Bailey, J.E. y Sauer U. (2000) Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. Biotechnol.* **67**, 623-627.
- Engel, P., Krämer, R., y Uden G. (1992) Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. *J. Bacteriol.* **174**, 5533-5539.
- Engemann, C., Ellsner, T. y Kleber, H.P. (2001a) Biotransformation of crotonobetaine to L(-)-carnitine in *Proteus sp.* *Arch. Microbiol.* **175**, 353-359.
- Engemann, C. y Kleber, H.P. (2001b) Epigenetic regulation of carnitine metabolising enzymes in *Proteus sp.* under aerobic conditions. *FEMS. Microbiol. Lett.* **1**, 1-6.
- Felix. H. (1982) Permeabilized cells. *Anal Biochem.* **120**, 211-234.
- Fiorini, M. y Valentini, C. (1982) Method for preparing L(-)-carnitine. *Eur. Paten. Appl. EP.* 60595.
- Flores, M.V., Voget, C.E y Ertola, R.J.J. (1994) Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 340-346.
- Fritz, I.B. y Yue, K.T.N. (1963) Long chain acylcarnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. *J. Lipid Res.* **4**, 279-288.
- Galabova, D., Tulueva, B. y Spasova, D. (1996) Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 18-22.
- Galindo, E. y Salcedo, G. (1996) Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. *Enzyme. Microb. Technol.* **19**, 145-149.
- García-Ochoa F., Santón V.E. y Alcón A. (1998) Intracellular compound quantification by means of flow cytometry in bacteria: Application to xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 87-94.
- Glassker, E., E.H.M.L., Heuberger, W.N., Konings y B. Polman. (1998) Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (OacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **180**, 5540-5546.

- Gokhale, D.V., Bastawde, K.B., Patil, S.G., Katkote, U.R., Joshi, R.R Ranvindranathan, T., Gaikwad, B.G., Jogdand, V.V. y Nene, S. (1996). Chemoenzymatic synthesis of D(-)-phenylglycine hydantoinase of *Pseudomonas desmolyticum* resting cells. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 353-357.
- Goulas, P. (1988) Purification and properties of carnitine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta.* **957**, 335-339.
- Hanschmann, H., Doß, A. y Kleber, H.P. (1994) L(-)-carnitine dehydratase in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 371-376.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- Helander, I.M., Alakomi, H., Latva-Kala, K. y Koski, P. (1997) Polyethylenimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiolology* **143**, 3193-3199.
- Helander, I.M., Latva-Kala, K. y Lounatmaa, K. (1998) Permeabilization action of polyethyleneimine on *Salmonella typhimurium* involves disruption of the outer membrane and interactions with lipopolysaccharide. *Microbiology* **144**, 385-390.
- Helander, I.M., y Mattila-Sandholm, T. (2000) Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 213-219.
- Hewitt, C.J., Boon, L.A., Mc Farlane, C.M. y Nienow A.W. (1998) The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 612-621.
- Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Nienow, A.W. y Mc Farlane, C.M. (1999a) The use of multiparameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *J. Biotechnol.* **75**, 251-264.
- Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Nienow, A.W. y Mc Farlane, C.M. (1999b) Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 705-711.

- Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., Mc Farlane, C.M., Nienow A.W. (2000) Studies related to the fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 381-390.
- Hoeks, F.W.J.M.M., Mühle, J., Böhlen, L., y Psenicka, I. (1996) Continuous cell recycle process for L(-)-carnitine production engineering and downstream processing aspects compared with discontinuous processes. *Chem. Eng. J.* **61**, 53-61.
- Hofmeyr, J.H.S. y Cornish-Bowden, A. (1991) Quantitative assessment of regulation in metabolic systems. *Eur. J. Biochem.* **200**, 223-236.
- Jepras, R.L., Carter, J., Pearson, C., Paul, F.E. y Wilkinson, M.J. (1995) Development of a robust flow cytometry assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 2696-27001.
- Jung, K., Jung, H. y Kleber, H-P. (1987) Regulation of L(-)-carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* **27**, 131-137.
- Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1989) Purification and properties of carnitine dehydratase from *Escherichia coli*. A new enzyme of carnitine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1003**, 270-276.
- Jung, H., K. Jung y H.P. Kleber. (1990a) L(-)-carnitine metabolism and osmotic stress response in *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* **30**, 409-413.
- Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1990b) L(-)-carnitine uptake by *Escherichia coli*. *J. Basic. Microbiol.* **30**, 507-514.
- Jung, H. y Kleber, H-P. (1991) Metabolism of D(+)-carnitine by *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 393-395.
- Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44.
- Jung, H., Buchholz, M., Clausen, J., Nietschke, M., Revermann, A., Schmid, R. y Jung, K. (2002) CaiT of *E. coli* is a new transporter catalyzing L-carnitine/ $\gamma$ -butyrobetaine exchange. *J. Biol. Chem.* **277**, 89251-89258.
- Kaiser, M. y Sawers, G. (1994) Pyruvate formate-lyase is not essential for nitrate respiration by *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **117**, 163-168.

- Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. (1992) Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 410-422.
- Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. (1993) Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: Flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Env. Microbiol.* **87**, 3187-3196.
- Karp, P., Diley, M., Saier, M., Paulsen, I.T., Paley, S. y Pellegrini-Toole, A. (2002) The EcoCyc database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 56-58.
- Kawamura, M., Akutsu, S., Fukuda, H., Hata, H., Morishita, T., Kano, K. y Nishimori, H. (1987) Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62, 118, 899. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Kell, D., Ryder, H., Kaprelyants, A. y Westerhoff, H. (1991) Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* **60**, 145-158.
- Kempf, B. y Bremer E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**, 319-30.
- King, M.A. (2000) Detection of dead cells and measurements of cell killing by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **243**, 155-166.
- Kleber, H-P. (1997) Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**, 1-9.
- Kleman, G.L. y Strohl, W.R. (1994) Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high cell density fermentation. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 3952-3958.
- Knappe, J. y Sawers, G. (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 383-398.
- Kondo, A., Blanchard, J.S. Y Englard, S. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 338. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Koo, S-P., F. Higgins y I.R. Booth. (1991) Regulation of compatible solute accumulation in *S. typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2617-2625.

- Kröger, A. (1987) Fumarate as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **505**, 129-145.
- Kumari, S., Tishel, R., Eisenbach, M. y Wolfe, A. (1995) Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 2878-2886.
- Kumari, S. Simel, E, Wolfe, A. (2000a)  $\rho^{70}$  is the principal sigma factor responsible for transcription of *acs*, which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 551-554.
- Kumari, S., Beatty, C.M., Browning, D.F., Busby, S.J., Simel, E.J., Hovel-Miner, G. y Wolfe, A.J. (2000b) Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 4173-4179.
- Lalitha, R.G., Nandita, B. y Santhoor, G.B. (1991) Permeabilization of Bakers' yeast by cetylmethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 154-157.
- Lange, J. Thorne, P. y Lynch, N. (1997) Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 1557-1567.
- Lebaron, P. y Joux, F. (1994) Flow cytometry analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 4345-4350.
- Lee, Y., y Chang, H.N. (1990) High cell density culture of recombinant *E. coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 330-337.
- Lee, Y-H., Chu, W-S. y Hsu. W-H. (1994) Bioconversion of cephalosporin C with D-amino acid oxidase from the yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnol. Lett.* **16**, 467-472.
- Leonardo, M.R., Daylly, Y. y Clark, D.P. (1996) Role of NAD in regulating the *adhE* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 6013-6018.
- Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T. y Valentine, R.C. (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **244**, 1064-1068.

- Lisle, J.T., Pyle, B.H, y Mcfeters, G.A. (1999) The use of multiple indices of physiological activity to access viability in chloride disinfected *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microb.* **29**, 42-47.
- Liu, Y., Hama, H., Fujita, Y., Kondo, A., Inoue, Y., Kimura, A. y Fukuda, H. (1999) Production of S-Lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols. *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 54-60.
- López-Amorós R., Comas J. y Vives-Rego J. (1995) Flow cytometry assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 2521-2526.
- Lundie, L.L. y Ferry, J.G. (1989) Activation of acetate by *Methanosarcina thermophila*. *J. Biol. Chem.* **264**, 18392-18396.
- MacMillan, S., Alexander, D., Culham, D., Kunte, H., Marshall, E., Rochon D. y Wood, J. (1999) The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1420**, 30-44.
- Martinac, B., Alder, M. y Kung, J. (1990) Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* **348**, 261-263.
- Mason, DJ., Allman, R., Stark, JM. y Lloyd, D. (1994) Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* **176**, 8-16.
- Mason, DJ., López-Amorós R., Allman R., Stark J.M. y Lloyd D. (1995) The ability of membrane potential dyes and calcofluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 309-315.
- Meier, P.J. (1987) D-Carnitin, harmless? En: Carnitin in der Medizin. (Gitzelmann, R.; Baerlocher, K. y Steinman, B. Eds.) Shattauer, Stuttgart, New York. pp.101-104.**
- Michielsen, M.J.F., Meijer, E.A, Wijffels, R.H., Tramper, J. y Beefink, H.H. (1998). Kinetics of D-malate production by permeabilized *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 621-628.
- Midgley, M. (1987) An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E. coli*. *Microbiol. Sci.* **4**, 125-128.

- Müller, D.M. y Strack, E. (1972) Razematspaltung von D,L carnitin. *Hoppe-Seyler's. Physiol.* **353**, 618-622.
- Mutafov, S., Angelova, B., Auramova, T., Boyadjieva, L. y Dimova, I. (1997) The inducibility of 9 $\alpha$ -steroid hydroxylating activity in resting *Rhodococcus sp.* Cells. *Process Biochem.* **7**, 585-589.
- Naidu, G.S.N., Lee, I.Y., Lee, E.G., Kang, G.H. y Park, Y.H. (2000) Microbial and enzymatic production of L-carnitine. *Bioprocess Eng.* **23**, 627-635.
- Naidu, G.S.N., Lee, I.Y., Cho, O.K. y Park, Y.H. (2001) Conversion of  $\gamma$ -butyrobetaine to L-carnitine by *Achromobacter cycloclast*. *J. Ind. Microbiol.* **26**, 309-315.
- Nakayama, K., Yuki, O., Honda, H., Okta, T. y Ozawa, T. (1989a) *Eur Patent Appl.* EP 319 344. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Nakayama, K., Hamo, H., Ogawa, T. y Ota, T. (1989b) *Jpn. Kokai Tokkyo JP.* 01222796. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Nakayama, K., Honada, H., Ogawa, KY., Ozawa, T. y Tetsuo, O. (1989c) *Jpn. Kokai Tokkyo JP.* 01222797. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Nebe-Von Caron, G. y Badley, R.A. (1995) Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *J. Microsc.* **179**, **1**, 55-66.
- Nebe-Von Caron, G., Stephens, P. y Badley R.A. (1998) Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 988-998.
- Nebe-Von Caron, G., Stephens, P., Hewitt, C.J., Powell, J.R. y Badley, R.A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Methods* **42**, 97-114.
- Newsholme, E.A. y Crabtree, B. (1973) Metabolic aspects of enzyme activity regulation. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 429-460.

- Obón, J. M., Maiquez, J.R., Cánovas, M., Kleber, H-P. e Iborra, J.L. (1997) L(-)-carnitine production with immobilized *Escherichia coli* cells in continuous reactors. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 531-536.
- Obón, J. M., Maiquez, J.R., Cánovas, M., Kleber, H-P. e Iborra, J.L. (1999) High-density *Escherichia coli* cultures for continuous L(-)-carnitine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 760-764.
- Park, Y-M, Choi, E-S y Rhee, S-K. (1994) Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Lett.* **16**,345-348.
- Peggy, R y Borum. Disturbances in carnitine metabolism (1985) Meetin Held at Imperial College, London, on 18-20 December, pp. 681-683.**
- Pinder, A.C., Purdy, P.W., Pouldter, S.A.G y Clark, D.C. (1990) Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentration in pure cultures. *J. Appl. Microbiol.* **69**, 92-100.
- Poolman, B. y Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solutes accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**, 397-407.
- Pore, R.S. (1994) Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**, 613-627.
- Porter J., Edwards C. y Pickud R.W. (1995) Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J. Appl. Bacteriol.* **179**, 399-408.
- Preusser, A., Wagner, U., Elssner, T. y Kleber, H.P. (1999) Crotonobetaine reductase from *Escherichia coli* consists of two proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1431**, 166-178.
- Quail, MA., Haydon, D.J. y Guest, J.R. (1994) The *pdhR-aceEF-ldp* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol. Microbiol.* **2**, 95-104.
- Quail, M.A. y Guest, J.R. (1995) Purification, characterisation and mode of action of PdhR, the transcriptional repressor of the *pdhR-aceEF-ldp* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **15**, 519-529.

- Ramirez, J.L. (2002) Análisis del metabolismo primario y secundario de *E. coli* O44 K74 en la biotransformación de compuestos trimetilamonio en L(-)-carnitina. Tesina. Universidad de Murcia.
- Rebouche, C.J. y Paulson, D.J. (1986) Carnitine metabolism and function in humans. *Ann. Rev. Nutr.* 6, 41-66.**
- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K.F. Y Scheper, T. (2001) Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 350-360.
- Riondet, C., Cachon, R., Wache, Y., Alcaraz, G. y Divies, C. (2000) Extracellular oxireduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 620-626.
- Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M. y Pilet, M.F. (2001) Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2240-2247.
- Roberson, B.R., Button, D.K. y Koch, A. (1998) Determination of **the biomasses** of small bacteria at low concentration in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3900-3909.
- Roth, S., Jung, K., Jung, H., Hommel, R.K. y Kleber, H-P. (1994) Crotonobetaine reductase from *Escherichia coli*. A new inducible enzyme of anaerobic metabolism of L(-)-carnitine. *Antonie van Leeuwenhoek* 65, 63-69.
- Ryan, W. y Parulekar, S. (1991) Immobilization of *Escherichia coli* JM103[pUC8] in *k*-carrageenan coupled with recombinant protein release by in situ cell membrane permeabilization. *Biotechnol. Prog.* 7, 99-110.
- San, K-Y., Bennett, G., Berrios-Rivera, S., Vadali, R., Yang, Y-T., Horton, E., Rudolph, F., Sariyar, B. Y Blackwood, K. (2002) Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 4, 182-192.
- Seim, H., Ezold, R., Kleber, H-P. y Strack, E. (1980) Stoffwechsel des L-Carnitins bei Enterobakterien. *Z. Allg. Mikrobiol.* 20, 591-594.

- Seim, H., Löster, H. y Kleber, H-P. (1982) Reduktiver Stoffwechsel des L-Carnitins und strukturverwandter trimethylammoniumverbindungen in *Escherichia coli*. *Acta Biol. Med. Germ.* **41**, 1009-1018.
- Seim, H. y Kleber, H-P. (1988) Synthesis of L(-)-carnitine by hydration of crotonobetaine by enterobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 538-544.
- Seim, H., Eichler, K. y Kleber, H-P. (2001) L(-)-carnitine and its precursor,  $\gamma$ -butirotetaine. *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*. (Krämer, K., Hoppe, P.L. y Packer, L., eds.). Marcel Dekker, Inc., New York Basel. **12**, 217-256.
- Seo, J-H. y Bailey, J.E. (1987) Cell cycle analysis of plasmid-containing *Escherichia coli* HB101 populations with flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 297-305.
- Shapiro, H.M. (1995) **Practical flow cytometry. 3<sup>rd</sup>**. Alan R. Liss. Inc.. New York.
- Shi, C. (1984) Verfahren zur herstellung von L-carnitin und zwischenprodukte für das verfahren. Patente D-OS 3344085 A1.
- Shin, S., Song, S.G., Lee, D.S., Pan, J.G. y Park, C. (1997) Involvement of *iclR* and *rpoS* in induction of *acs*, the gene for acetyl coenzyme A synthetase of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 103-108.
- Shurtliff, M.M., Parkin, F.G., Member, ASCE, Weathers, L.J. y Gibson, D.T. (1996) Biotransformation of trichloroethylene by a phenol-induced mixed culture. *J. Env. Engin.* **122**, 581-589.
- Sigiura, A., K. Hirokswaa, K. Nakashima y T. Mizuno. (1994) Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **14**, 929-938.
- Sih, C. (1985) Verfahren zur herstellung von L-carnitin und zwischenprodukte für das verfahren. *D-OS*, 3344085 A1.
- Snoep, J.L., De Graef, M.R., Westphal, A.H., De Kok, A., Teixeira de Mattos, M.J y Neijssel, O.M. (1993) Differences in sensitivity to NAD of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for their activity in vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 63-66.

- Soriano, E., Borth, N., Katinger, H. y Mattanovich, D. (1999) Flow cytometry analysis metabolic stress effects due to recombinant plasmids and proteins in *Escherichia coli* production strains. *Metab. Eng.* **1**, 270-274.
- Soriano, E., Borth, N., Katinger, H. Mattanovich, D. (2002) Optimization of recombinant protein expression level in *Escherichia coli* by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 93-98.
- Soupe, J., Haurat, G. Goulas, P. (1987) *Eur. Patent. Appl. EP.* **240**, 423. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Spencer, M.E. y guest, J.R. (1973) Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **114**, 563-570.
- Stephanopoulos, G. (1998) Metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 119-120.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, P. y Kung. C. (1997) Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Ann. Rev. Physiol.* **59**, 633-657.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1074-1078.
- Tanke, HJ. y Van der Keur, M. (1993) Selection of defined cell types by flow-cytometric cell sorting. *Trends Biotechnol.* **11**, 55-62.
- Tholozan, J.L., Cappelletti, J.M., Tissier, J.M., Delattre, G. y Federighi, M. (1999) Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 1110-1116.
- Uden, G. y Trageser, M. (1991) Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Antonie van Leeuwenhoek* **59**, 65-76.
- Upadhyay, R., Nagajyothi, H y Bhat, S.G. (1999) D-Amino acid oxidase and catalase of detergent permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its potential use for the synthesis of  $\alpha$ -keto acids. *Process Biochem.* **35**, 7-13.

- Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**, 395-411.
- Van der Waarde, J.J., Kok, R. y Janssen, D.B. (1993) Degradation of 2-chloroallyl alcohol by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 528-535.
- Vandecasteele, J.P. y Lemal, J. (1980) Reductive enzymic synthesis of L-carnitine with regeneration of the NADH used. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 528-535.
- Vaz, FM y Wanders, RJ. (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J.* **361**, 417-429.
- Veal D.A., Deere D., Ferrari B., Piper J. y Attfield P.V. (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods.* **243**, 191-210.
- Verheul, A., Rombouts, F.M., Beumer, R.R. y Abee, T. (1995) An ATP-dependent L-carnitine transporter in *Listeria monocytogens* Scot A is involved in osmoprotection. *J. Bacteriol.* **177**, 3205-3212.
- Verheul, A., Wouters, J.A., Rombouts J.M. y Abee, T. (1998) A possible role of ProP, ProU and CaiT in osmoprotection of *Escherichia coli* by carnitine. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 1036-1046.
- Vessey, D. A. y Kelley, M. (2001) Characterization of reaction mechanism for the XL-I form of bovine liver xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase. *Biochem. J.* **357**, 283-288.
- Vicenti J.V y Hansen, G.J. (1993) Enzymatic oxidation of cephalosporin C using whole cells of the yeast *Triginopsis variabilis* within a "cross-flow filter-reactor". *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 281-285.
- Wagner, T., Hantke, B. y Wagner, F. (1996) Production of L-methionine from D,L-5-(2-methylthioethyl) hydantoin by resting cells of a new mutant strain of *Arthrobacter species* DMSM 7330. *J. Biotechnol.* **46**, 63-68.
- Wahbi, L.P., Gokhale, D., Minter, S. y Stephens, G.M. (1996) Construction and use of recombinant *Escherichia coli* strains for the synthesis of toluene cis-glycol. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 297-306.

- Wieland O.H., Deufel T. y Paetzke-Brunner J. (1985) Free and esterified carnitine. En: *Methods of enzymatic analysis 3<sup>o</sup> ed.*, vol. 8 (Bergmeyer H.U. Ed.). Verlag Chemie, Weinheim, Germany. pp.481-488.
- Williams, I., Paul, F., Lloyd, D., Jepras, R., Critchley, I., Newman, M., Warrack, J., Giokarini, T., Hayes, A., Randerson, P. y Venables, A. (1999) Flow cytometry and others techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology*. **145**, 1325-1333.
- Walllt, A. y Kahn, M. (2002) The *FixA* and *FixB* genes are necessary for anaerobic carnitine reduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 4044-4047.
- Wood. J. M. (1999) Osmosensing by bacterial: signals and membrane-based sensor. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:230-262.
- Yokozeiki, K., Takahaski, S., Hirose, Y. y Kubota, K. (1988) **Asymmetric production of L(-)-carnitine from crotonobetaine by *Proteus mirabilis*.** *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2415-2421.

**Abreviaturas.**

<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b><i>AceKAB</i></b>	Operón de la formación de acetato
<b><i>AceA</i></b>	Gen que codifica para la isocitrato liasa
<b><i>AceB</i></b>	Gen que codifica para la malato sintetasa
<b><i>AceK</i></b>	Gen que codifica para isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa
<b>ACK</b>	Acetato quinasa
<b>ACS</b>	Acetil-CoA sintetasa
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AMP</b>	Adenosina monofosfato
<b>AMPe</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ArcAB</b>	Regulador del metabolismo aerobio/anaerobio que en condiciones anaerobias inhibe el ciclo de Krebs, la cadena de transporte de electrones y PDH y activa PFL
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BE</b>	Bromuro de etidio
<b>BOX</b>	Bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico)trimetin oxonol.
<b>CaiT</b>	Proteína transportadora de L(-)-carnitina
<b>CaiA</b>	Crotonobetaina reductasa
<b>CaiB</b>	Acetil-CoA/HS-CoA transferasa
<b>CaiC</b>	Crotonobetaina, L(-)-carnitina o $\gamma$ -butirotetaina: acetil-CoA/HS-CoA ligasa
<b>CaiD</b>	Enoil-CoA hidratasa o L(-)-carnitina deshidratasa y D(+)-carnitina racemasa
<b>CaiE</b>	Crotonobetainil-CoA
<b>CaiF</b>	Activador de caiTABCDE en presencia de mezcla de L(-)-carnitina/D(+)-carnitina o crotonobetaina
<b>CAT</b>	Camitina-acetil transferasa
<b>CDH</b>	Camitina deshidratasa
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>CR</b>	Crotonobetaina reductasa

<b>CRP</b>	Represión catabólica via receptor proteico de AMPc
<b>CS</b>	Citrato sintasa
<b>CTe<sup>-</sup></b>	Cadena de transporte de electrones
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>DTNB</b>	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>EDTA</b>	Etilenodiaminotetraacetato sódico
<b>FadR</b>	Factor activador del ciclo del glioxilato
<b>FICT</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FNR</b>	Regulador transcripcional del operón <i>cai</i> bajo anaerobiosis
<b>FSC</b>	Dispersión hacia delante dependiendo del tamaño de partícula
<b>FTA</b>	Fosfotransacetilasa
<b>HEPES</b>	Hidroxietilpiperacine-N'-2-etanosulfonato
<b>ICDH</b>	Isocitrato deshidrogenasa
<b>IcIR</b>	Represor de ICL y activador de ACS
<b>ICL</b>	Isocitrato liasa
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa
<b>ME</b>	Membrana externa
<b>MP</b>	Membrana plasmática
<b>MS</b>	Malato sintetasa
<b>MTT</b>	3-(4',5'-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazoilo
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
<b>NPN</b>	1-N-fenilnaftilamina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa
<b>PdhR</b>	Regulador del operón piruvato deshidrogenasa
<b>PEI</b>	Polietilenimino
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PEPCK</b>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

<b>PEPCX</b>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
<b>PhIA</b>	Regulador de formiato hidrógeno liasa
<b>PK</b>	Piruvato quinasa
<b>PMS</b>	Metasulfato de fenacina
<b>PTA</b>	Fosfotransacetilasa
<b>RpoD (<math>\rho^{70}</math>)</b>	Factor de la RNA polimerasa necesario para el mantenimiento celular
<b>RpoS (<math>\rho^2</math>)</b>	Regulador transcripcional expresado cuando las células alcanzan la fase estacionaria y en condiciones de estrés celular regulando los genes implicados en la osmotolerancia e inhibiendo el metabolismo de carnitina
<b>TPP</b>	Pirofosfato de tiamina
<b>TRIS</b>	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## 1.1. Introducción.

### 1.1.1. Importancia de la carnitina en los seres vivos.

La L(-)-carnitina (3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilamonio butirato) es un compuesto polar, distribuido ampliamente en la naturaleza, que se encuentra en tejidos de animales, plantas y también en gran número de microorganismos (Bieber, 1988). En mamíferos, la L(-)-carnitina es un constituyente natural del organismo, siendo aportado en la alimentación o bien sintetizado en el hígado, riñón y cerebro. La función de la L(-)-carnitina consiste en transportar ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna, para que sean oxidados (Fritz *et al.*, 1963; Bremer, 1983). Además la L(-)-carnitina facilita la oxidación de cadenas ramificadas de  $\alpha$ -cetoácidos y modula la relación AcilCoA/CoASH (Bieber, 1988).

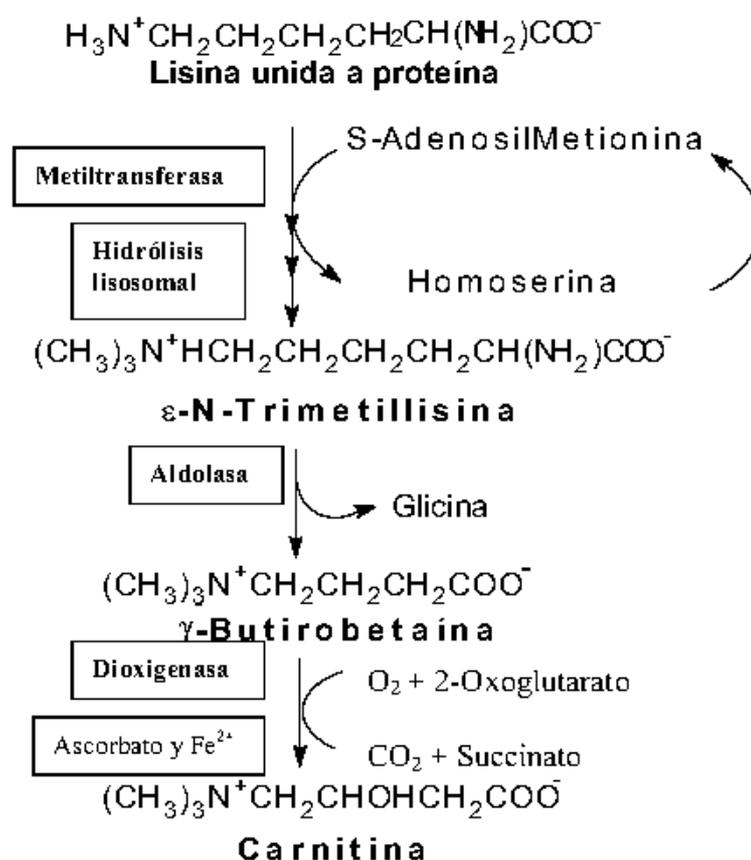
La biosíntesis de carnitina requiere de los aminoácidos esenciales lisina y metionina, junto con la presencia de cofactores como el ácido ascórbico, niacina, piridoxina, hierro y oxígeno molecular (Rebouche, 1986). En mamíferos, algunas proteínas como la calmodulina, miosina, actina, citocromo c y las histonas contienen residuos de  $\epsilon$ -N-trimetilisinalisina. La N-metilación de estos residuos de lisina ocurre a nivel postranscripcional por medio de metiltransferasas específicas que utilizan S-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilo. Posteriormente, la proteína es escindida por proteólisis en el lisosoma dando lugar a  $\epsilon$ -N-trimetilisinalisina, este compuesto por medio de una aldolasa y una dioxigenasa da lugar a  $\gamma$ -butirobetaina y L(-)-carnitina, respectivamente. En la Figura 1.1 se representa la biosíntesis de L(-)-carnitina en eucariotas (Bremer, 1983; Vaz y Wanders, 2002).

La L(-)-carnitina tiene un papel importante en el metabolismo energético, regulando el nivel de grasas en la sangre. Las dietas deficientes en los aminoácidos precursores y los cofactores que requiere su biosíntesis, generan deficiencia en carnitina en animales superiores. Esta deficiencia conduce a síndromes que pueden producirse por alteraciones en las enzimas de la ruta biosintética de la carnitina, de su transporte, en las enzimas que la utilizan como sustrato, o por alteraciones en la interacción de L(-)-carnitina con otras rutas metabólicas (Vaz y Wanders, 2002).

Los síntomas clínicos asociados en pacientes con déficit en L(-)-carnitina son

entre otros: debilidad muscular, hipertrofia cardíaca, pérdida de apetito, hipertrofia del hígado, alteraciones en el sistema nervioso central, daño muscular, etc (Peggy, 1985). Estos síntomas se pueden paliar con la administración de L(-)-carnitina, lo que la hace un compuesto de interés para la industria farmacéutica.

El transporte de L(-)-carnitina al interior celular en eucariotas superiores consiste en un sistema de cotransporte con sodio y un sistema de antiporte con deoxicarnitina. Para el uso de L(-)-carnitina como fármaco es necesaria la producción en estado puro del isómero L, ya que la administración de la D(+)-carnitina (forma no biológicamente activa) implica que compita con la L(-)-carnitina, produciendo el bloqueo del sistema de transporte, y que afecte también a las reacciones enzimáticas subsiguientes en las que interviene (Meier, 1987).



**Figura 1.1.** Biosíntesis de L(-)-carnitina en mamíferos a partir de lisina (Bieber, 1988).

Actualmente, la L(-)-carnitina es un importante fármaco que se utiliza en medicina para el tratamiento de aquellos pacientes que presentan cuadros clínicos como la encefalopatía metabólica, en pacientes con deficiencias en éste compuesto, en la terapia de varias enfermedades cardíacas, en hiperlipoproteinemias y en pacientes

sometidos a hemodiálisis (Brenningstall, 1990; Calvani y Arrigoni-Martelli, 1999; Calvani *et al.*, 2000). En la actualidad, su uso en la elaboración de dietas específicas para deportistas y lactantes ha llevado a su consideración como una vitamina más en la dieta y a su calificación como compuesto nutracéutico (Seim *et al.*, 2001). Debido a estos usos, las investigaciones sobre sistemas de producción de L(-)-carnitina tienen un gran interés comercial (Obón *et al.*, 1999; Castellar *et al.*, 2001; Cánovas *et al.*, 2001).

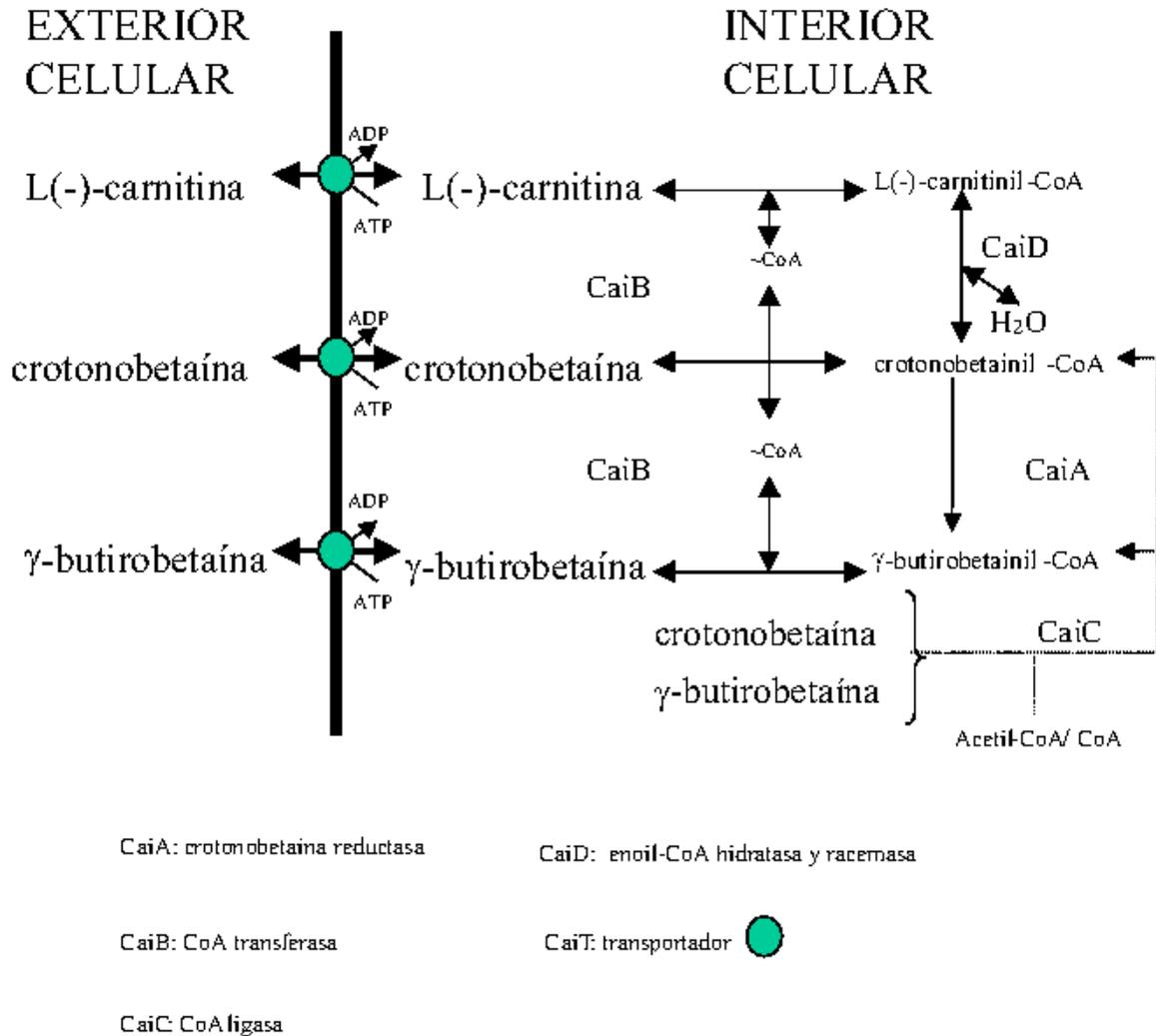
### 1.1.2. Metabolismo de los compuestos de trimetilamonio en *E. coli*.

Diferentes organismos pertenecientes a las enterobacterias, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Proteus vulgaris*, son capaces de metabolizar L(-)-carnitina en presencia de otras fuentes de carbono y nitrógeno bajo condiciones anaerobias; sin embargo, estos microorganismos no pueden asimilar el esqueleto carbonado ni el nitrógeno de la carnitina. *E. coli* presenta además un sistema de transporte activo inducible para L(-)-carnitina (Jung *et al.*, 1990b). En el metabolismo de la carnitina en enterobacterias se obtiene también crotonobetaina, que es utilizada por las células como aceptor externo de electrones en condiciones anaerobias, dando como producto  $\gamma$ -butirotetaina. En la Figura 1.2 se recoge el metabolismo postulado de L(-)-carnitina en *E. coli* (Ramirez, 2001).

Se han determinado las enzimas implicadas en el metabolismo de la carnitina en el operón *cai*TABCDE del genoma de *E. coli* (Eichler *et al.*, 1994a, 1994b). Este operón está formado por seis genes y se ha identificado la función de cinco de ellos que codifican para las siguientes enzimas: 1) CoA transferasa (*caiB*), que transfiere grupos CoA a partir de un depósito celular de acetyl-CoA/CoA de manera reversible a crotonobetaina,  $\gamma$ -butirotetaina y L(-)-carnitina, activándolos para que sirvan de sustrato para las otras enzimas del metabolismo de carnitina; 2) crotonobetaina reductasa (*caiA*), que reduce la crotonobetainil-CoA a  $\gamma$ -butirotetainil-CoA cediendo electrones en condiciones anaerobias (Jung *et al.*, 1991; Eichler *et al.*, 1994a); 3) una enzima bifuncional, enoil-CoA hidratasa (L-carnitina deshidratasa) y racemasa (*caiD*), que es capaz de hidratar crotonobetainil-CoA a L(-)-carnitinil-CoA y de biotransformar D(-)-carnitina a L(-)-carnitina; 4) también se conoce que el operón *cai* dirige la síntesis de un sistema de transporte de carnitina al interior celular, que estaría codificado por el gen *caiT* (Jung *et al.*, 2002), y 5) de una crotonobetaina/carnitina coenzima A ligasa,

codificado por el gen *caiC*. Además, se ha sugerido la existencia de una enzima involucrada en la síntesis o en la activación de un cofactor, que es el crotonobetainil-CoA o  $\gamma$ -butirobetainil-CoA (Elssner *et al.*, 2000), que es necesario para las actividades camitina racemasa y L-camitina deshidratasa (*caiE*).

**Figura 1.2.** Mecanismo de transformación de crotonobetaina y  $\gamma$ -butirobetaina en L(-)-camitina en *Escherichia coli* (Ramirez, 2001).

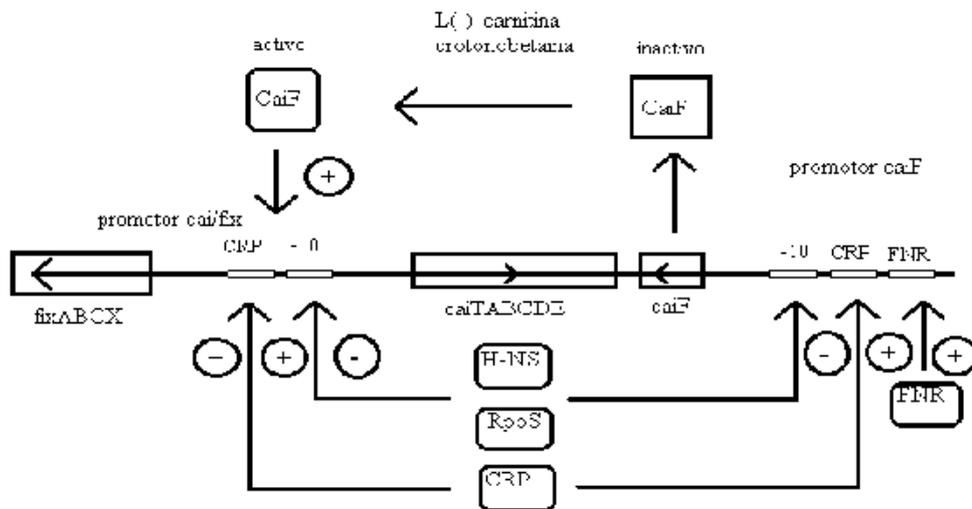


Las enzimas L-camitina deshidratasa y crotonobetaina deshidrogenasa se han purificado y caracterizado (Seim *et al.*, 1982; Jung *et al.*, 1991; Roth *et al.*, 1994; Preusser *et al.*, 1999). La enzima L-camitina deshidratasa está formada por dos subunidades idénticas de masa molecular 45.000 Da y crotonobetaina reductasa está constituida por cuatro subunidades idénticas de masa molecular 41.500 Da (Preusser *et al.*, 1999). Ambas enzimas necesitan como cofactor crotonobetainil-CoA y/o  $\gamma$ -

butirobetainil-CoA para realizar su función (Jung *et al.*, 1989; Elssner *et al.*, 2000, 2001). Tanto la enzima L-carnitina deshidratasa como crotonobetaina reductasa son inducibles en presencia de L(-)-carnitina o crotonobetaina en el medio de crecimiento bajo condiciones anaeróbicas (Jung y Kleber, 1987; Roth *et al.*, 1994). Además, *E. coli* O44 K74 es capaz de convertir D(+)-carnitina en L(-)-carnitina, y aunque el mecanismo es desconocido, se ha postulado la existencia de la enzima carnitina racemasa (Jung *et al.*, 1991; Elssner *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha descrito que bajo condiciones anaerobias, el fumarato causa una estimulación del crecimiento de *E. coli* al ser utilizado como aceptor externo de electrones, sustituyendo a la crotonobetaina en esta función (Seim y Kleber, 1988; Roth *et al.*, 1994; Obón *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha descrito la existencia de otro operón *fixABCX*, que es transcrito en sentido opuesto al operón *cai*, que contiene las secuencias para la síntesis de cuatro proteínas reguladoras, postulándose que facilitan la transferencia de electrones a la enzima crotonobetaina reductasa (Eichler *et al.*, 1996). Estas proteínas son: FixA y FixB, que transfieren electrones a flavoproteínas; FixC, que presenta regiones similares a la proteína ubiquinona oxidoreductasa y FixX, que parece ser un nuevo tipo de ferredoxina (Walt y Kahn, 2002).

Los genes de los operones *cai* y *fix* involucrados en la ruta de la carnitina están situados en el primer minuto del cromosoma de *E. coli* (Eichler *et al.*, 1994a, 1994b, 1995; Buchet *et al.*, 1999). En la Figura 1.3, se presenta un esquema de estos operones, así como la regulación génica a la que están sometidos (Eichler *et al.*, 1996). Además, en la región 3' adyacente al operón *cai*TABCDE, se ha determinado la existencia de un gen designado como *caiF*. Este gen codifica para una proteína designada como proteína CaiF, la cual ejerce un efecto de activador transcripcional sobre los operones *cai* y *fix*, estimulando además la actividad de la enzima L-carnitina deshidratasa. El gen *caiF* es transcrito en condiciones anaerobias e independientemente de la presencia de inductor en el medio de crecimiento, en contraste con los operones *cai* y *fix*, cuya expresión es fuertemente dependiente de la presencia de inductor en el medio; esto indica que el inductor actuaría como modulador de la actividad de la proteína CaiF (Eichler *et al.*, 1996).



**Figura 1.3.** Esquema de la regulación de los operones *cai* y *fix* de *Escherichia coli*. (Eichler *et al.*, 1996).

La expresión de estos operones también está controlada por un conjunto de proteínas reguladoras del metabolismo global, como son: a) la proteína represora de catabolito (CRP) dependiente de AMPc, lo que sugiere que existe un control de la expresión del metabolismo de la carnitina por los niveles de AMPc en la bacteria; b) las histonas (H-NS) y el factor transcripcional  $\sigma^s$  (RpoS), que se expresa cuando la célula entra en fase estacionaria de crecimiento, por lo que ejercen un efecto represor sobre el metabolismo de la carnitina, y c) el factor FNR, que es un regulador transcripcional del metabolismo bajo condiciones anaerobias (Eichler *et al.*, 1996).

### 1.1.3. Producción de L(-)-carnitina.

Fundamentalmente la producción de L(-)-carnitina a escala industrial se realiza mediante métodos químicos (Müller y Strack, 1972; Fiorini y Valentini, 1982), aunque se han desarrollado diversos métodos biológicos (Jung *et al.*, 1993; Naidu *et al.*, 2000). Mediante procesos químicos se obtienen mezclas racémicas, por lo que es necesaria la purificación posterior del isómero biológicamente activo, produciendo D(+)-carnitina como producto residual. Otros procedimientos de producción de L(-)-carnitina se basan en la extracción y purificación a partir de tejidos animales o de extractos de levaduras y

también mediante la resolución química de la mezcla racémica o de derivados de la camitina.

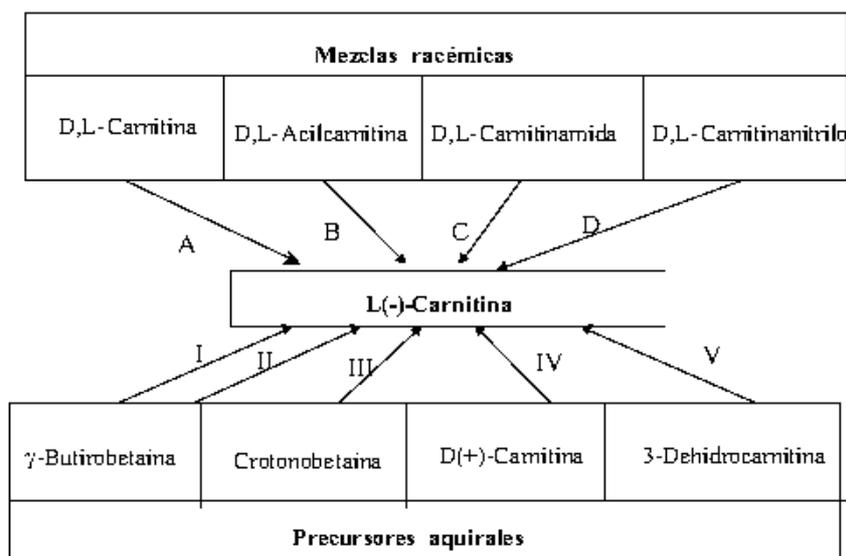
También, se pueden desarrollar procesos alternativos a los anteriormente expuestos, que sean enantioselectivos o que puedan utilizar los productos residuales de los procesos químicos. Así, el empleo de métodos biotecnológicos con enzimas o microorganismos, permitiría obtener L(-)-camitina de manera controlada y bajo condiciones suaves, eliminando los problemas ambientales que generan los procesos químicos al requerir condiciones drásticas de pH y temperatura, generando con ello compuestos de difícil eliminación. En la Figura 1.4 se recoge una relación de procedimientos biológicos diseñados para la producción de L(-)-camitina a partir de mezclas racémicas y precursores aquirales.

#### ***Resolución de mezclas racémicas.***

Se han descrito procedimientos basados en el metabolismo selectivo del D(+)-enantiómero por *Acinetobacter calcoaceticus* y en el aislamiento posterior de la L(-)-camitina no metabolizada, obteniendo un rendimiento de 38% (Sih, 1985). Mediante este método se pierde la D(+)-camitina no pudiendo ser utilizada como precursor en otros procesos de producción L(-)-camitina. Por otro lado, *Pseudomonas fluorescens* y *Fusarium oxysporum s.p lini* hidrolizan selectivamente el isómero L-octanoilcamitina de la mezcla racémica, obteniendo L(-)-camitina con un rendimiento del 40% (Aragozzini *et al.*, 1987) y *E. coli* se utiliza de manera similar para la hidrólisis enantioselectiva de D,L-acetilcamitina (Kawamura *et al.*, 1987).

Debido a las similitudes estructurales entre camitina y colina, se ha propuesto otro método de resolución racémica de camitina, basado en la utilización de la enzima acetilcolinesterasa en la hidrólisis de derivados racémicos de D-L-acetilcamitina, dejando intacto el L-enantiómero que es purificado con posterioridad, resultando el proceso con un rendimiento del 30% (Dropsy y Klivanov, 1984). También, mediante hidrólisis específica de ésteres de camitina o de sus precursores, se puede producir L(-)-camitina, utilizando la esterificación enantioselectiva de D-L camitina por la camitina acetil transferasa (E.C 2.3.1.7). Esta enzima, que se puede aislar a partir de distintos microorganismos como *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, cataliza la reacción de esterificación, transfiriendo grupos acetilo a expensas de acetil-CoA, dando lugar a

L(-)-acetilcarnitina a partir de la mezcla racémica D-L-carnitina, que se purifica posteriormente. Este sistema necesita reciclar acetil-CoA, por lo que usa la fosfotransacetilasa para éste propósito, obteniendo un rendimiento del 60%.



**Figura 1.4.** Diferentes sustratos usados en la producción de L(-)-carnitina. A: Asimilación enzimática(s) de D-carnitina; B: L-carnitina acilasa; C: L-carnitina amidasa; D: L-carnitina nitrilasa; I: L-carnitina hidroxilasa; II: Sintetasa, Deshidrogenasa, Hidroxilasa y Tioesterasa; III: L-carnitina deshidratasa; IV: carnitina racemasa (postulada); V: L-carnitina deshidrogenasa.

Por otro lado, diferentes especies de *Pseudomonas* pueden realizar la hidrólisis enzimática enantioselectiva de D-L-carnitinamida mediante la enzima L-carnitina amidasa, obteniendo L(-)-carnitina con un rendimiento del 81,6% y D(+)-carnitinamida como subproducto (Nakayama *et al.*, 1989a). Por procedimientos similares, *Rhodococcus sp.* hidroliza el D-L-carnitinanitrilo con la enzima nitrilasa (Nakayama *et al.*, 1989b).

#### ***Producción de L(-)-carnitina utilizando precursores aquirales***

La resolución de mezclas racémicas tiene la desventaja que sólo se consigue como máximo un rendimiento del 50%, además, es necesario separar los enantiómeros no transformados, siendo este proceso muy caro. Un método alternativo es la utilización de precursores aquirales. Dentro de los precursores aquirales existentes, los más utilizados para la producción de L(-)-carnitina son:  $\gamma$ -butirotetaina, 3-dehidrocarnitina,

crotonobetaina y D(+)-camitina.

El compuesto  $\gamma$ -butirotetaina, junto con  $\alpha$ -oxoglutarato y en presencia de oxígeno, se puede biotransformar en L(-)-camitina, dando como subproductos succinato y dióxido de carbono, mediante la reacción catalizada por la enzima butirotetaina hidrolasa (EC 1.14.11.1), la cual se puede aislar de hígado de ternero o de microorganismos como *Neurospora crassa* y *Pseudomonas sp* AK1 (Kondo, 1981). Recientemente, se ha propuesto el uso de *Achromobacter cycloclast* que es capaz de obtener rendimientos del 45% mediante el empleo de células enteras, por lo que no se necesita de la regeneración de cofactores (Naidu *et al.*, 2001).

Por otro lado, la 3-dehidrocarnitina, se convierte en L(-)-camitina mediante la enzima L-carnitina deshidrogenasa (EC 1.1.1.108), a expensas de consumir poder reductor en la forma de NADH, por lo que este método necesita regenerar dicho coenzima por medio de otras enzimas como glucosa deshidrogenasa (Vandecasteele *et al.*, 1980) o formiato deshidrogenasa (Soupe *et al.*, 1987). La enzima L-carnitina deshidrogenasa está presente en varias especies de *Pseudomonas*, *Xanthomonas translucens* y *alcaligenes* (Aurich *et al.*, 1968; Goulas, 1988; Takahashi *et al.*, 1991). Este método junto con los demás procedimientos enzimáticos, tienen las ventajas de una alta especificidad de sustrato, evitando reacciones no deseadas y una alta velocidad de reacción, pero en cambio requiere una purificación previa del biocatalizador, y en enzimas que necesitan la presencia de coenzimas, la regeneración de las mismas, lo que encarece los procesos. Con el empleo de células, se evita la regeneración de las coenzimas, lo que abarata considerablemente el proceso. Por contra, el uso de células presenta una menor velocidad de reacción respecto a las enzimas, se pueden producir reacciones no deseadas, consume sustratos del medio de reacción y son necesarias condiciones estériles durante todo el proceso.

Los microorganismos pertenecientes a las enterobacterias como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhimurium* son capaces de sintetizar L(-)-camitina a partir de crotonobetaina (Seim y Kleber, 1988; Jung *et al.*, 1989, 1990, 1993; Obón *et al.*, 1997; Obón *et al.*, 1999; Elssner *et al.*, 1999; Castellar *et al.*, 2001; Cánovas *et al.*, 2001; Cánovas *et al.*, 2002; Engemann *et al.*, 2001a y 2001b) y de D(+)-camitina (Jung y Kleber, 1991; Castellar *et al.*, 1998). Ambos sustratos tienen la ventaja de ser productos residuales de los sistemas de producción química: la D(+)-camitina directamente de la resolución racémica, y la crotonobetaina mediante la deshidratación

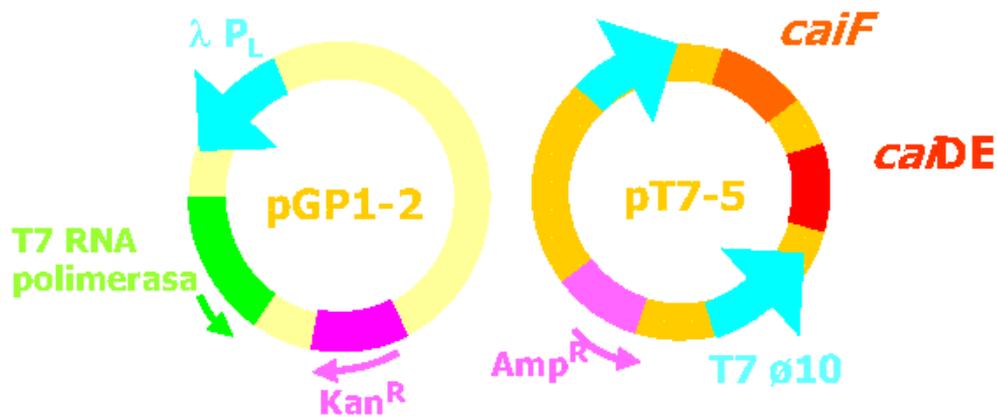
química de D(+)-carnitina. De este modo, se pueden convertir la D(+)-carnitina y la crotonobetaina en un compuesto farmacéutico de elevado valor añadido, como es la L(-)-carnitina. Además, la L(-)-carnitina se puede obtener a partir de precursores aquirales con elevada pureza y altos rendimientos, lo que supone una mejora en la etapa de purificación. En la Tabla 1.1, se recoge un resumen de las principales ventajas e inconvenientes del uso de mezclas racémicas y precursores aquirales para la producción de L(-)-carnitina

**Tabla 1.1.** Principales ventajas e inconvenientes en el uso de los diferentes sustratos para la producción de L(-)-carnitina.

		<i>VENTAJAS</i>	<i>INCONVENIENTES</i>
<b>SUSTRATOS</b>	<b>MEZCLAS RACÉMICAS</b>	-Sustratos baratos.	-Máximo rendimiento de 50%. -Difícil recuperación del producto.
	<b>PRECURSORES AQUIRALES</b>	-Sustratos baratos. -Altos rendimientos. -Fácil recuperación del producto en caso de altos rendimientos.	-Difícil recuperación del producto en caso de rendimientos bajos.

En los últimos años, una de las líneas de investigación que se lleva a cabo en el Dpto de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología de la Universidad de Murcia consiste en el análisis de la producción de L(-)-carnitina con células de la cepa de *E. coli* O44 K74 y una cepa transformada denominada *E. coli* K38 pT7-5 KE32, a partir de crotonobetaina y D(+)-carnitina, con células en crecimiento y en estado durmiente, en sistemas libres e inmovilizados y en procesos desarrollados en continuo y en discontinuo. Así, en sistemas operados en discontinuo y utilizando células en estado durmiente de *E. coli* O44 K74, se consiguieron unos rendimientos del 44% en producto usando una concentración de crotonobetaina de 50 mM. En cambio, mediante un proceso en continuo y con células inmovilizadas se obtuvieron unos rendimientos del 26% y una productividad de 1,8  $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Obón *et al.*, 1997). Además, mediante un sistema de inmovilización por retención en membrana de filtración se alcanzaron altas densidades celulares (27  $\text{gl}^{-1}$ ), dando como resultado una productividad cercana a los 6,2  $\text{gl}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Obón *et al.*, 1999). Recientemente, se han desarrollado modelos matemáticos

que permiten simular y representar la evolución del proceso de biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina (Cánovas *et al.*, 2002 y Alvarez-Vasquez *et al.*, 2002). También se ha estudiado la producción de L(-)-carnitina utilizando D(+)-carnitina como sustrato de biotransformación en un sistema operado en discontinuo con células durmientes de *E. coli* O44 K74, habiéndose determinado las concentraciones óptimas de biomasa y sustrato y obteniendo un rendimiento del 44% con una concentración de sustrato de 100 mM (Castellar *et al.*, 1998).



**Figura 1.5.** Plásmidos presentes en *Escherichia coli* K38 pT7-5 KE32.

El uso de cepas de *E. coli* que puedan ser superproductoras de las enzimas implicadas en la biotransformación y se han dirigido a conseguir el aumento de la producción de L(-)-carnitina. Así, Eichler *et al.*, 1996, obtuvieron una cepa transformada de *E. coli* con la clonación de algunos genes del metabolismo de la carnitina. Esta cepa denominada *E. coli* K38 pT7-5 KE32 lleva el operón *caiTABCDE* propio de la bacteria y los plásmidos pGP1-2 y pT7-5. La Figura 1.5 muestra una representación de estos plásmidos. El primero de ellos contiene un gen que codifica para una enzima RNA polimerasa del fago T7, bajo el control de un promotor inducible por calor  $\lambda p_L$  (Tabor y Richarson, 1985). El segundo plásmido lleva un inserto con los genes *caiD*, *caiE* (Eichler *et al.*, 1994a) y *caiF* (Eichler *et al.*, 1996) del operón *cai* de *E. coli* y, además, el promotor  $\phi$  del fago T7. Los genes *caiD* y *caiE* están sujetos al control del promotor  $\phi$ , y el gen *caiF*, que presenta un sentido de transcripción divergente con respecto a *caiD* y *caiE*, es expresado desde su propia región promotora-operadora (Eichler *et al.*, 1996). El plásmido pGP1-2 contiene el gen de resistencia a kanamicina, mientras que el pT7-5 el de resistencia a ampicilina. Esta cepa mostró actividades de

camitina deshidratasa y camitina racemasa que fueron 31 y 75 veces superiores a las de la cepa silvestre de *E. coli* O44 K74, respectivamente. Mediante la utilización de esta cepa recombinante se han alcanzado unos rendimientos en torno al 70% y 22% utilizando como sustrato crotonobetaina y D(+)-camitina, respectivamente, ambos a una concentración de 100 mM (Castellar *et al.*, 2001).

## 1.2. Objeto del trabajo.

El estudio de sistemas de producción de L(-)-camitina por medios biotecnológicos presenta un gran interés industrial debido al uso cada vez mayor de este compuesto en en farmacia. La cepa de *E. coli* O44 K74, es capaz de biotransformar crotonobetaina y L(-)-camitina bajo condiciones anaerobias en procesos de crecimiento celular. Además, esta cepa puede realizar la biotransformación de D(+)-camitina en estado durmiente con las ventajas que ello supone como la fácil recuperación del producto, evita el efecto negativo de sustratos y/o productos del crecimiento celular, no son necesarias condiciones estrictas de esterilidad, etc. Recientemente, se han caracterizado los operones *cai* y *fix* del metabolismo de la camitina en *E. coli*, lo cual ha permitido identificar los genes implicados en el proceso de biotransformación de crotonobetaina y la racemización de D(+)-camitina. Así, se ha conseguido la cepa modificada *E. coli* K38 pT7-5 KE32. Esta cepa, que emplea un sistema de sobreexpresión con dos plásmidos, va a permitir disponer de un sistema biológico capaz de biotransformar crotonobetaina y racemizar D(+)-camitina con una mayor eficacia.

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral se centra en profundizar en el análisis de una metodología económica y eficaz para la producción de L(-)-camitina, a partir de sustratos baratos como crotonobetaina y D(+)-camitina, utilizando células de *E. coli* en estado durmiente. La utilización de células en estado durmiente se basa en la necesidad de conocer los factores fisiológicos y tecnológicos que condicionan el uso de este estado celular en procesos de biotransformación de la biocatálisis aplicada. El hecho de que los sustratos D(+)-camitina y crotonobetaina, y el producto de la biotransformación L(-)-camitina, sean osmoprotectores requiere que se estudie el efecto de choques osmóticos en el reactor sobre el proceso de producción ya que no se han realizado con anterioridad, así como también realizar estudios de permeabilización de la membrana celular a fin de incrementar el rendimiento del proceso. Además, como parte

de este objetivo, se realiza la caracterización de los estados fisiológicos de la célula durante el crecimiento y el proceso paralelo de biotransformación de compuestos trimetilamonio en L(-)-carnitina. Todo ello se completa con la determinación de los pasos limitantes en dicho proceso de biotransformación, con el fin de describir la evolución de la población bacteriana en dicho estadio y optimizar su uso como biocatalizador.

Por tanto, para abordar este trabajo se han planteado los siguiente objetivos parciales:

1. Optimizar las condiciones de la biotransformación y de la reutilización celular en la biotransformación de D(+)-carnitina en L(-)-carnitina con *E. coli* O44 K74, tanto en condiciones de crecimiento como en estado durmiente.
2. Conocer el efecto que provoca el estrés osmótico en el proceso de biotransformación de los compuestos trimetilamonio en L(-)-carnitina con células de *E. coli* O44 K74 K38 pT7-5 KE32, así como analizar los transportadores y factores que intervienen en dicha biotransformación,
3. Permeabilizar las células de *E. coli* O44 K74 y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 mediante diferentes compuestos con el fin de incrementar el rendimiento en la biotransformación de crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina con células en estado durmiente,
4. Buscar el punto de unión entre el metabolismo primario y el metabolismo de los compuestos de trimetilamonio en *E. coli* O44 K74, mediante el análisis de las enzimas implicadas en el mantenimiento del estado energético y el poder reductor de las células, con tal de delimitar las dianas sobre las que actuar para modificar los flujos metabólicos y hacer que éstos fluyan hacia un mayor rendimiento del bioproceso de transformación de crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina, y
5. Aplicar la citometría de flujo al seguimiento de la evolución de la biotransformación realizada por células en crecimiento y en estado durmiente, mediante la determinación de la cantidad de ADN, ARN y proteína por unidad de célula y el conocimiento del estado fisiológico celular de células de *E. coli* O44 K74 en las condiciones utilizadas a lo largo del tiempo de estudio.

Todo ello puede permitir abordar la optimización del biocatalizador y elegir el entorno de reactor más acuerdo al proceso de biotransformación.

## 2.1. Introducción. *E. coli* como productora de L(-)-carnitina.

*Escherichia coli* O44 K74 puede biotransformar crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina (Jung *et al.*, 1987; Seim y Kleber, 1988; Jung y Kleber, 1991; Obón *et al.*, 1997; 1999). En la Figura 2.1, está representado el metabolismo anaerobio de carnitina en *Escherichia coli*. Aunque los mecanismos de reacción no están totalmente establecidos, se conoce la existencia de la enzima carnitina L(-)-deshidratasa, que cataliza la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina y de la enzima crotonobetaina reductasa, que lleva a cabo la conversión de crotonobetaina a  $\gamma$ -butirobetaina bajo condiciones anaeróbicas y su actividad es inhibida en presencia oxígeno (Roth *et al.*, 1994; Kleber, 1997 y Obón *et al.*, 1999).

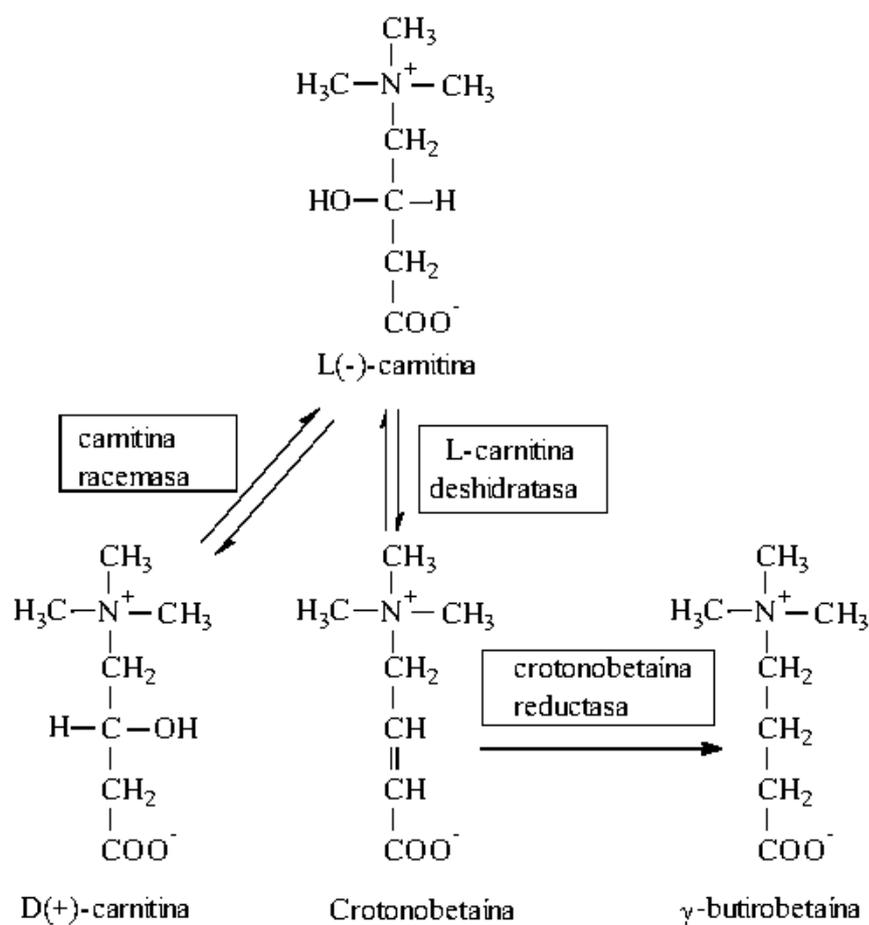


Figura 2.1. Metabolismo anaerobio de carnitina en *Escherichia coli* (Kleber, 1997).

Además, se han postulado la existencia de las enzimas carnitina racemasa, que catalizaría la biotransformación de D(+)-carnitina en L(-)-carnitina (Jung *et al.*, 1987 y Jung y Kleber, 1991), y recientemente la existencia de una D(+)-carnitina deshidratasa, que catalizaría la biotransformación de D(+)-carnitina a crotonobetaina (Cánovas *et al.*, en revisión). Estas enzimas son citoplasmáticas y se inducen anaeróticamente en presencia de L(-)-carnitina y/o crotonobetaina. Este metabolismo no solo se expresa en células crecidas anaeróticamente sino también, en menor medida, en aerobiosis en presencia de inductores (Kleber, 1997; Obón *et al.*, 1997; Elssner *et al.*, 1999; Cánovas *et al.*, 2002).

Por otro lado, está aceptado que la utilización de compuestos como el fumarato como aceptor externo de electrones bajo condiciones anaerobias, puede incrementar el crecimiento celular y/o el rendimiento celular, así como la inducción de reacciones dependientes de energía como la producción de ATP o el transporte activo de metabolitos (Kröger, 1987). También, el fumarato estimula la síntesis de L(-)-carnitina, disminuyendo la reducción de crotonobetaina a  $\gamma$ -butiobetaina catalizada por la crotonobetaina reductasa (Roth *et al.*, 1994).

Los estudios realizados de la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina mediante el uso de enterobacterias concluyeron que *E. coli* O44 K74 es una de las mejores cepas productoras de L(-)-carnitina (Seim y Kleber, 1988; Jung *et al.*, 1989; Jung y Kleber, 1993; Roth *et al.*, 1994).

En el presente capítulo, se incluye el trabajo experimental encaminado a la optimización de las condiciones para realizar la biotransformación de D(+)-carnitina en L(-)-carnitina con células en estado durmiente de *E. coli* O44 K74, completando así el trabajo anteriormente realizado sobre la biotransformación de D(+)-carnitina en L(-)-carnitina (Castellar *et al.*, 1998). La optimización de la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina no se presenta en esta Memoria ya que se realizó con anterioridad dentro de la línea de investigación que se desarrolla en nuestro Dpto (Obón *et al.*, 1997; Obón *et al.*, 1999; Castellar *et al.*, 2001; Cánovas *et al.*, 2001).

## **2.2. Resultados y discusión.**

### **2.2.1. Estudios preliminares del sistema de biotransformación.**

Con objeto de seleccionar las mejores condiciones para producir L(-)-carnitina, se ensayó la biotransformación tanto con células en crecimiento como en estado durmiente.

Para analizar la biotransformación con células en crecimiento se realizaron cuatro ensayos, dos en aerobiosis con y sin inductor, respectivamente; y dos en anaerobiosis, también en presencia y ausencia de inductor. Los procesos se realizaron en medio complejo (descrito en Materiales y Métodos), con D(+)-carnitina 100 mM como sustrato de la biotransformación y crotonobetaina 35 mM como inductor, a una temperatura de 37 °C.

En los ensayos realizados con células en crecimiento tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y en ausencia de inductor, no se detectó L(-)-carnitina. Aunque en presencia de inductor, se produjeron 6 mM de L(-)-carnitina en el ensayo aerobio y 12 mM en el anaerobio, en tiempos de 30 y 10 horas, respectivamente, la concentración de D(+)-carnitina se mantuvo en su valor inicial de 100 mM, pero sin embargo, disminuyó la concentración de crotonobetaina que se había adicionado como inductor de la síntesis enzimática. Es decir, las células en crecimiento fueron capaces de transformar la crotonobetaina en L(-)-carnitina, como se ha descrito previamente (Seim y Kleber, 1988), pero fueron incapaces de biotransformar D(+)-carnitina en L(-)-carnitina, bajo estas condiciones.

Teniendo en cuenta estos resultados, se analizó la biotransformación de D(+)-carnitina con células en estado durmiente (ver Materiales y métodos). Se realizaron dos ensayos de biotransformación paralelos, en presencia y ausencia de oxígeno respectivamente. La concentración celular en ambos ensayos se mantuvo constante a lo largo de todo el proceso. Los valores de biotransformación obtenidos se recogen en la Tabla 2.1. Como se puede observar, hubo una mayor producción de L(-)-carnitina en el sistema aerobio que en el anaerobio. En anaerobiosis, la velocidad de producción de L(-)-carnitina fue menor, aunque el tiempo invertido en alcanzar el máximo fue más corto que en aerobiosis. En cambio, el sistema aerobio permitió alcanzar valores ligeramente más altos de velocidad de producción de L(-)-carnitina, productividad y mayor rendimiento, y por tanto, una mayor concentración final de L(-)-carnitina producida.

Además, los rendimientos en producto obtenidos son comparables con los referenciados en trabajos anteriores con células durmientes de *E. coli* y utilizando como sustrato de biotransformación D(+)-camitina 100 mM, un pH de 7,5 a 37 °C y en condiciones aerobias, donde se han descrito valores del 40% bajo estas condiciones (Jung y Kleber, 1991).

**Tabla 2.1.** Parámetros de la biotransformación de D(+)-camitina en L(-)-camitina obtenidos con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Condiciones de biotransformación	Velocidad de producción (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rendimiento (%)	Productividad* (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Aerobiosis	0,47	40	0,22
Anaerobiosis	0,43	25	0,13

\*Los valores de productividad fueron calculados a las 30 h del inicio del proceso de biotransformación.

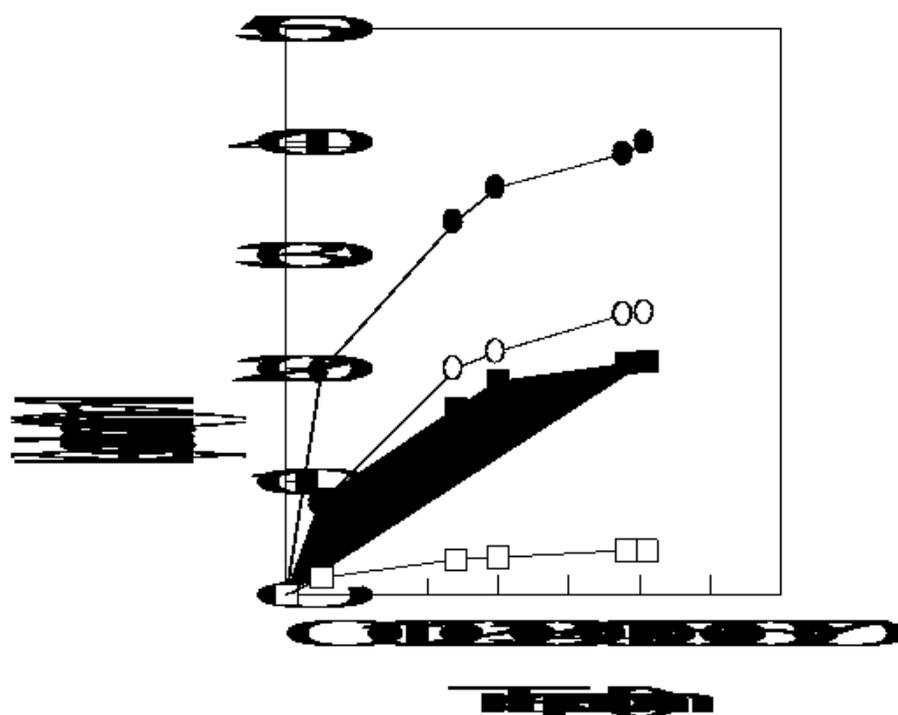
Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó, para producir L(-)-camitina a partir de D(+)-camitina, la condición de aerobiosis como la mejor con células durmientes.

### 2.2.2. Optimización de la fase de crecimiento e inducción enzimática.

Para determinar las condiciones óptimas de inducción de las enzimas responsables de la biotransformación, se estudió el efecto del oxígeno, la presencia o ausencia de inductor durante la fase de crecimiento celular, así como el tiempo de incubación de las células en el medio de crecimiento.

En los ensayos realizados en presencia de inductor no hubo diferencia entre inducir con L(-)-camitina o con crotonobetaina, por lo que en la Figura 2.2 sólo se recogen los resultados de la biotransformación en presencia y ausencia de crotonobetaina. Como se puede apreciar, en presencia de oxígeno y sin inductor la producción de L(-)-camitina fue muy baja, alcanzando un valor máximo de 4 mM al final del ensayo. La presencia de inductor en aerobiosis y ausencia de inductor y condiciones anaerobias en la etapa de crecimiento permitieron obtener una mayor producción de L(-)-camitina, que estuvo en torno a 20 mM. Sin embargo, el efecto

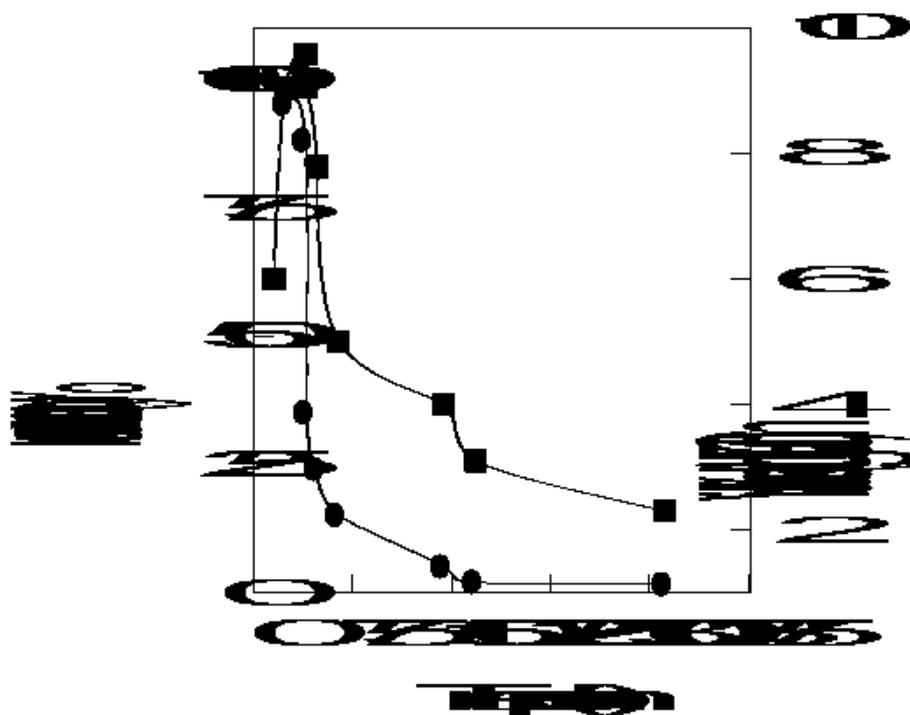
conjunto de las condiciones anaerobias y de la presencia de inductor, condujo a los mejores resultados, alcanzándose una concentración máxima de L(-)-carnitina de 40 mM. El metabolismo de L(-)-carnitina en *E. coli* está relacionado con condiciones ambientales anaerobias. Según éstos resultados, el efecto conjunto de anaerobiosis y presencia de inductor, estimularía la síntesis de las enzimas implicadas en el metabolismo de L(-)-carnitina.



**Figura 2.2.** Producción de L(-)-carnitina con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente previamente crecidas en ausencia (□, ■) y presencia (○, ●) de crotonobetaina como inductor, bajo condiciones aerobias y anaerobias, respectivamente.

Además de la presencia de inductor y de la ausencia de oxígeno, es necesario establecer el tiempo de crecimiento óptimo de las células. Para ello se crecieron las células en presencia de inductor y de las condiciones anaerobias anteriormente seleccionadas, y se recogieron las células en distintos tiempos de crecimiento y se resuspendieron con el sustrato a biotransformar. Como se puede apreciar en la Figura

2.3, el metabolismo de los compuestos de trimetilamonio coincide con la manifestación del metabolismo primario durante el mayor crecimiento celular, ya que al recoger las células después de la fase exponencial de crecimiento (12-15 horas), se produjo una disminución de los rendimientos de biotransformación paralelo al descenso de la viabilidad celular, llegando a perder prácticamente su actividad catalítica tras 6 días de cultivo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los apartados 5.2.1 y 6.2.2 de la presente Memoria, en donde se demuestra que existe una concentración máxima de proteína, ADN, ARN y de las enzimas del metabolismo de L(-)-carnitina por unidad de célula en dicho estadio celular.



**Figura 2.3.** Producción de L(-)-carnitina (●) y viabilidad celular (■) con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente, creciendo en medio complejo anaerobio en presencia de inductor y realizando la biotransformación tras recoger las células a diferentes tiempos.

Así, las condiciones seleccionadas como óptimas de crecimiento e inducción enzimática en *E. coli* O44 K74 fueron: ausencia de oxígeno, presencia de inductor y una recogida de las células del medio de cultivo en la fase exponencial de crecimiento (15

horas). Puesto que no hubo diferencia entre L(-)-carnitina y crotonobetaina como inductor, se seleccionó este último dado que su coste es más bajo.

### 2.2.3. Optimización de la fase de biotransformación.

El pH y la temperatura influyen en el transporte de L(-)-carnitina y otras betainas al interior celular en *Escherichia coli* (Jung *et al.*, 1990b) y también en la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de la carnitina, carnitina deshidratasa y crotonobetaina reductasa (Jung *et al.*, 1989; Roth *et al.*, 1994). Por lo que es necesaria la optimización de estas variables en el sistema de biotransformación, aún cuando las enzimas estén protegidas por la estructura celular en el medio de reacción.

#### 2.2.3.1. Determinación del pH óptimo.

Se estudió la biotransformación en un rango de pH comprendido entre 6 y 8. Se realizaron 4 ensayos utilizando tampón fosfato potásico para los valores de pH 6, 7, 7,5 y 8, respectivamente. Debido a que a pH 8 el tampón fosfato potásico está en el límite de su capacidad tamponadora se realizó un ensayo adicional, también a pH 8, utilizando tampón Tris-ClH. Como se puede observar en la Tabla 2.2, a pH 8 con tampón Tris, la producción de L(-)-carnitina fue la más baja de los cinco ensayos realizados, obteniéndose menos del 13 % de rendimiento y una productividad de  $0,07 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , mientras que con tampón fosfato potásico, se alcanzaron concentraciones más altas de producto para los valores de pH ensayados, siendo el pH 7,5 el que condujo a la mayor producción de L(-)-carnitina. A este valor de pH se obtuvieron también los mejores valores de rendimiento (40%) y productividad ( $0,22 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

Las velocidades de producción de L(-)-carnitina también fueron mayores con tampón fosfato potásico que con tampón Tris, alcanzando el valor más alto a pH 7,5. En nuestro sistema de biotransformación actúa la enzima Cai D (actividades enoil-CoA deshidratasa y D(+)-carnitina racemasa). Por ello, estos resultados son coincidentes con el comportamiento de dicha enzima frente al pH (Jung *et al.*, 1989), puesto que la L(-)-carnitina deshidratasa purificada muestra muy poca actividad con tampón Tris, y la máxima con tampón fosfato potásico. Sin embargo, el máximo de actividad con la enzima libre en suspensión está descrito a pH 8, mientras que en nuestro sistema con células intactas, la mejor biotransformación se obtuvo a pH 7,5. El hecho de trabajar con células intactas pudo ser el origen de esta diferencia.

**Tabla 2.2.** Parámetros de la biotransformación con células de *E. coli* 044 K74 en estado durmiente bajo distintos pHs y tampones.

Tampón	pH	Velocidad de producción (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rendimiento (%)	Productividad* (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Fosfato potásico	6,0	0,44	31	0,17
Fosfato potásico	7,0	0,45	37	0,20
Fosfato potásico	7,5	0,47	40	0,22
Fosfato potásico	8,0	0,36	22	0,12
Tris	8,0	0,15	13	0,07

\* Los valores de productividad fueron calculados a las 30 h del inicio del proceso de biotransformación.

En cualquier caso, esta coincidencia de comportamiento frente al pH podría evidenciar, además, que el transporte de L(-)-carnitina es también dependiente de pH, siendo el óptimo a pH 7,5 con tampón fosfato potásico (Jung *et al.*, 1990), valor que coincide con el obtenido en nuestro sistema como óptimo.

### 2.2.3.2. Temperatura óptima de biotransformación.

Para estudiar el efecto de la temperatura se realizaron dos series de ensayos, una con 100 mM de D(+)-carnitina como sustrato de biotransformación a 25, 37 y 40 °C, respectivamente, y otra con 500 mM a 25 y 37 °C. Esta última concentración se ensayó para comprobar si un aumento en la concentración de sustrato podía conducir a un incremento en la productividad y observar a la vez la dependencia del efecto de la temperatura. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo y se determinó la L(-)-carnitina producida. Los resultados de los ensayos se recogen en la Tabla 2.3. Como se puede observar los mejores resultados en producción de L(-)-carnitina se obtuvieron a 37 °C, valores de temperatura superiores o inferiores a ésta, condujeron a una menor producción. Esta última observación se deduce también a partir de los parámetros de biotransformación, donde la máxima productividad, rendimiento y velocidad de producción se obtuvieron a 37 °C. Estos resultados son coincidentes con los publicados por otros autores relativos al efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima L(-)-carnitina deshidratasa, la cual, una vez purificada, tiene una temperatura óptima

comprendida entre 37 y 40 °C (Jung *et al.*, 1989), y sobre el transportador de L(-)-carnitina, que también muestra su máxima actividad a 37 °C (Jung *et al.*, 1990). Teniendo en cuenta estos resultados la temperatura óptima para la operación del sistema fue de 37 °C, por lo que se seleccionó este valor para posteriores ensayos.

Adicionalmente, se estudió la producción de L(-)-carnitina a una alta concentración de sustrato (500 mM). La temperatura influyó en la velocidad inicial de producción de L(-)-carnitina, pero, en el intervalo de tiempo estudiado, la concentración final alcanzada fue la misma en los dos sistemas, por lo que el rendimiento y la productividad fueron iguales a 25 y a 37 °C. Por tanto, el sistema mostró una baja dependencia de la temperatura a alta concentración de sustrato. Por otro lado, la máxima concentración de L(-)-carnitina producida tanto a 25 como a 37 °C fue mayor que con 100 mM de sustrato, incrementándose la productividad casi tres veces. Sin embargo, el rendimiento en producto obtenido descendió a la mitad, quedando un 78 % del sustrato inicial sin consumir (Tabla 2.5).

**Tabla 2.3.** Parámetros de la biotransformación con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente bajo distintas temperaturas y concentraciones de sustrato.

Condiciones de biotransformación		Velocidad de Producción	Rendimiento	Productividad*
Temperatura (°C)	D(+)-carnitina (mM)	(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	(%)	(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
25	100	0,22	34	0,18
37	100	0,47	40	0,22
40	100	0,41	30	0,16
25	500	1,21	22	0,60
37	500	2,45	23	0,60

\* Los valores de productividad fueron calculados a las 30 h del comienzo del proceso de biotransformación.

Esta respuesta inversa de la variación entre productividad y rendimiento al incrementar la concentración de sustrato es habitual en este tipo de sistema, y conduce a fijar la concentración de sustrato óptima en función de las necesidades de consumir todo el sustrato u obtener un máximo de concentración de producto.

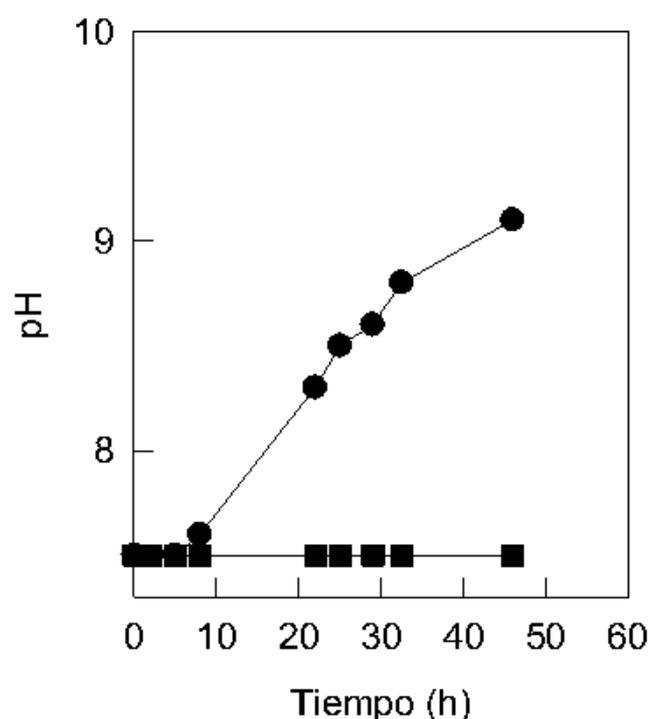
Estos resultados son importantes para una posible aplicación industrial del proceso, ya que la temperatura de trabajo es una variable que afecta en gran medida los costes de producción. Así, se ha demostrado que el sistema puede alcanzar una

productividad de  $0,60 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a temperatura ambiente, suministrando una alta concentración de sustrato (500 mM), aunque quedaría una fracción importante de éste sin consumir.

### 2.2.3.3. Efecto del fumarato.

El fumarato es utilizado por bacterias entéricas como aceptor externo de electrones bajo condiciones anaerobias (Cole *et al.*, 1985; Kroger, 1987). Se ha comprobado que en células de *E. coli* provoca un aumento en el crecimiento celular cuando éstas se cultivan bajo condiciones anaerobias (Jung *et al.*, 1987; Obón *et al.*, 1997). Relacionado con el metabolismo de la L(-)-carnitina, el fumarato actúa como aceptor externo de electrones, evitando la reducción de crotonobetaina a  $\gamma$ -butirobetaina y favoreciendo con ello la formación de L(-)-carnitina a partir de crotonobetaina por actuación de la enzima L(-)-carnitina deshidratasa (Jung *et al.*, 1987). Además, se han estudiado varios sistemas de producción de L(-)-carnitina con *E. coli* O44 K74 en presencia de fumarato bajo condiciones anaerobias (Seim y Kleber, 1988; Roth *et al.*, 1994, Obón *et al.*, 1999).

A pesar de que nuestro sistema es aerobio y el paso de crotonobetaina a  $\gamma$ -butirobetaina está bloqueado al inactivarse la enzima crotonobetaina reductasa en presencia de oxígeno, se decidió estudiar el efecto del fumarato en el medio de biotransformación. Se realizaron cuatro ensayos, dos de ellos con 100 mM de D(+)-carnitina en presencia y ausencia de 50 mM de fumarato, respectivamente y otros dos con 500 mM de D(+)-carnitina también en presencia y ausencia de 50 mM de fumarato, respectivamente. Las condiciones de ensayo fueron: estado durmiente, concentración de biomasa 4,2 g/l, condiciones aerobias, pH 7,5 y 37 °C. Se tomaron muestras con el tiempo a las que se les determinó la L(-)-carnitina producida y se siguió la variación del pH a lo largo del ensayo. La Figura 2.4 muestra la evolución del pH en presencia y ausencia de 50 mM de fumarato con 100 mM de D(+)-carnitina.



**Figura 2.4.** Variación del pH durante la biotransformación con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente con 100 mM de D(+)-carnitina, 4,2 g/l de biomasa, 37 °C, pH inicial 7,5 y condiciones aerobias, en presencia de fumarato 50 mM(●) y en su ausencia (■).

Como se puede observar en la Figura 2.4, la presencia de fumarato produjo un incremento en el pH del medio durante la biotransformación con ambas concentraciones de D(+)-carnitina, alcanzándose valores hasta de pH 9 al final del ensayo. Por el contrario, en ausencia de fumarato en el medio de biotransformación no se modificó el pH del medio.

Por otro lado, al igual que en el estudio de temperatura, aquí también se realizó un ensayo paralelo con una alta concentración de sustrato (500 mM), a fin de comprobar si se podía mejorar la producción de L(-)-carnitina. La Tabla 2.4 muestra la producción de L(-)-carnitina en presencia y ausencia de fumarato con 100 y 500 mmol l<sup>-1</sup> de D(+)-carnitina. Como se puede observar, el fumarato no afectó significativamente a la producción de L(-)-carnitina a concentraciones bajas de D(+)-carnitina, mientras que a concentraciones altas, se produjo un aumento en la formación de L(-)-carnitina. El

fumarato no modificó la velocidad de producción de L(-)-carnitina a cada concentración de sustrato ensayada, aunque a 500 mM esta velocidad fue mayor que a 100 mM de sustrato (Tabla 2.4).

Además, la presencia de fumarato no afectó a los valores de biotransformación del sistema con 100 mM de sustrato. Sin embargo, produjo un incremento del rendimiento en L(-)-carnitina del 22 al 31 % a 500 mM de sustrato, incrementándose la productividad 4 veces. Por tanto, se puede establecer que el fumarato favoreció el desarrollo del proceso a altas concentraciones de sustrato al actuar probablemente como sustrato energético, tal como ha sido descrito previamente (Castellar *et al.*, 1998).

En otros trabajos realizados y utilizando crotonobetaina 35 mM como sustrato de la biotransformación, no se observaron diferencias significativas en presencia y ausencia de fumarato (Obón *et al.*, 1997). Estos resultados son comparables a los obtenidos en nuestro sistema utilizando 100 mM de D(+)-carnitina, ya que el fumarato sólo mostró un efecto significativo cuando la concentración de sustrato fue más alta.

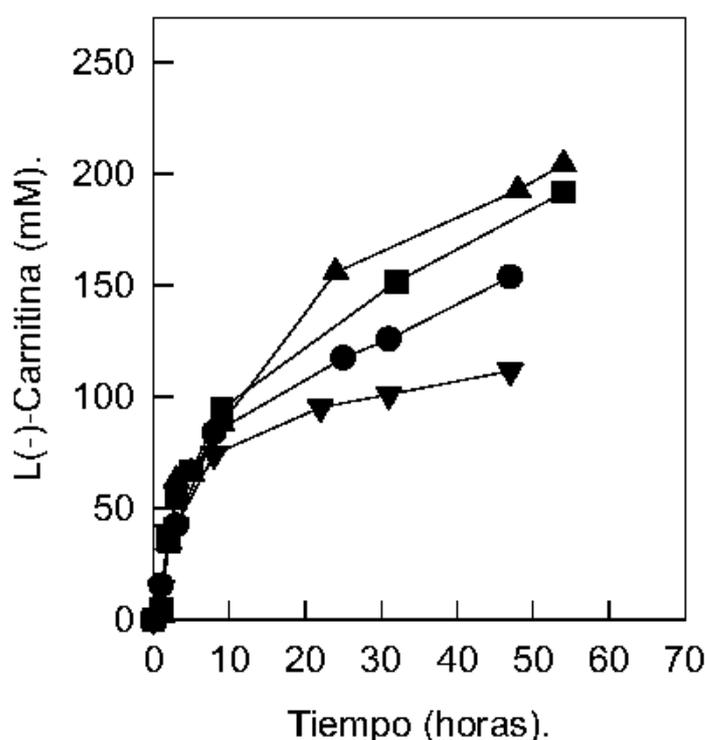
**Tabla 2.4.** Parámetros de la biotransformación en presencia y ausencia de fumarato con distintas concentraciones de sustrato.

Condiciones de biotransformación		Velocidad de producción	Rendimiento	Productividad*
D(+)-carnitina (mM)	Fumarato (mM)	(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	(%)	(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
100	0	0,47	40	0,22
100	50	0,47	40	0,22
500	0	2,45	22	0,59
500	50	2,45	31	0,83

\*Los valores de productividad se calcularon a las 30 h del inicio del proceso de biotransformación.

Por otro lado, otros autores han descrito que utilizando 500 mM de D(+)-carnitina obtuvieron un rendimiento del 17 % en ausencia de fumarato (Jung y Kleber, 1991). Estos resultados se han mejorado ligeramente en el presente trabajo al aumentar el rendimiento al 22 %.

Con los datos obtenidos anteriormente y dado que a concentraciones altas de sustrato se produjo un aumento en los valores de la biotransformación en presencia de fumarato, se decidió estudiar la biotransformación con 500 mM de D(+)-carnitina en presencia de distintas concentraciones de fumarato. Para ello se realizaron cuatro ensayos en un rango de concentración de fumarato de 0 a 200 mM. Se tomaron muestras con el tiempo y se determinó la L(-)-carnitina producida. Los resultados de producción de L(-)-carnitina quedan recogidos en la Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Producción de L(-)-carnitina con *E. coli* O44 K74 en estado durmiente en ausencia de fumarato ( $\tau$ ) y con fumarato 50 ( $\bullet$ ), 100 ( $\nabla$ ) y 200 mM ( $\sigma$ ). La biotransformación se realizó con 500 mM de D(+)-carnitina, 4,2 g/l de biomasa, en condiciones aerobias, pH 7,5 y 37 °C

Al aumentar la concentración de fumarato se produjo un incremento progresivo en la producción y el rendimiento en L(-)-carnitina, alcanzándose un rendimiento en producto máximo del 41 % y una productividad de 1,10 g l<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> con 200 mM de fumarato. Así, bajo estas condiciones, se amortiguó el efecto de caída del rendimiento al

aumentar la concentración de sustrato, observado en los ensayos anteriores; alcanzándose valores de rendimiento en L(-)-carnitina próximos a los obtenidos con 100 mM de sustrato, aunque con una productividad 5 veces superior. Este efecto positivo de fumarato pudo ser debido a que las células lo incorporan en su metabolismo y como consecuencia reducen moléculas (NADH, FADH<sub>2</sub>). Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios posteriores, donde se observó un aumento considerable en la relación de NADH/NAD durante la biotransformación en presencia de fumarato respecto de su ausencia. Por lo tanto, puede postularse que el fumarato podría ser tomado por células e incorporado en el metabolismo celular, con un aumento consiguiente en la concentración de coenzimas reducidos (NADH, FADH<sub>2</sub>), que a la vez proveería de una disponibilidad mayor de energía usada por el sistema de transporte de carnitina o el mantenimiento del proceso. Además, el incremento de NADH y FADH<sub>2</sub> podría explicar el incremento del pH del medio en que se encuentran las células, que intentan equilibrar su pH interno a costa de variar el externo (Figura 2.4).

Estas condiciones significaron que la concentración de producto producido y la productividad aumentarían de manera considerable de 40 mol l<sup>-1</sup> a 205 mol l<sup>-1</sup> y de 0,22 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 1,10 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente, por lo que se consigue así una importante mejora en la productividad del proceso.

#### 2.2.3.4. Efecto de otros sustratos energéticos.

La adición de sustratos tales como el fumarato durante el estado durmiente puede ayudar a la célula a mantener el proceso de transporte, asegurando una estabilidad catalítica mayor, una mayor integridad celular y la posibilidad de aumentar el tiempo de ensayo del proceso. Por lo tanto, es necesario el estudio adicional de otros sustratos energéticos con el fin de mejorar el uso de células durmientes que poseen un sistema de transporte de sustrato dependiente de energía que limita el bioproceso. Así, se estudiaron los efectos en la biotransformación de D(+)-carnitina en L(-)-carnitina de los siguientes compuestos: citrato, glicerol y acetato, todos a la misma concentración seleccionada como óptima para el fumarato (200 mM). Se tomaron muestras con el tiempo a las que se les determinó la L(-)-carnitina producida y se siguió la variación del pH a lo largo del proceso.

**Tabla 2.5.** Efecto de sustratos energéticos en la biotransformación de D(+)-carnitina 500 mmol l en L(-)-carnitina con células de *E. coli* O44 K74 en estado dormiente.

Sustrato energético (200 mM)	pH <sup>1</sup>	Velocidad de Producción (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Rendimiento (%)	Productividad <sup>2</sup> (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Control	7.5	2.45	22	0,59
Fumarato	9.1	3.50	41	0,83
Citrato	7.5	2.45	22	0,59
Acetato	9.1	2.45	22	0.59
Glicerol	7.5	2.05	10	0,30

<sup>1</sup>pH al final del proceso de biotransformación.

<sup>2</sup>Los valores de productividad se calcularon a las 24 h del inicio del proceso de biotransformación.

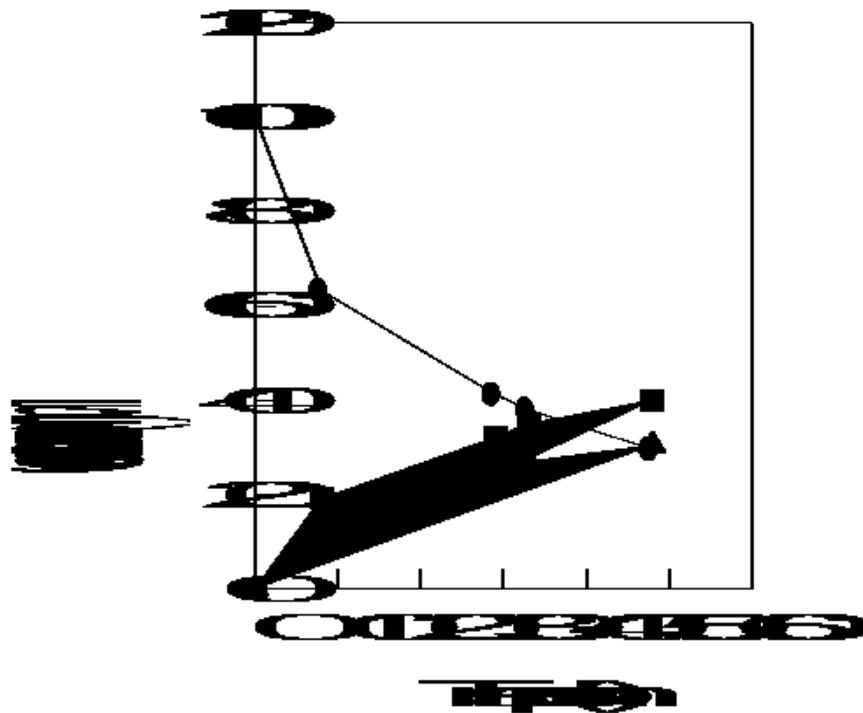
Como se puede apreciar en la Tabla 2.5, el citrato y el acetato no produjeron aumento en la biotransformación, en cambio el glicerol condujo a una disminución significativa en el rendimiento del proceso (10%). Por otro lado, el pH del medio al utilizar acetato tuvo un comportamiento similar al obtenido con fumarato, mientras que la adición de glicerol y citrato no alteró el pH a lo largo de todo el proceso.

#### 2.2.4. Análisis de los metabolitos implicados en la biotransformación.

Con objeto de determinar las etapas enzimáticas posiblemente implicadas en el proceso de biotransformación, se estudió la producción de otros metabolitos distintos al sustrato D(+)-carnitina y al producto L(-)-carnitina. Así, en el medio de biotransformación se analizaron los metabolitos implicados en la biotransformación con 100 mM de D(+)-carnitina a pH 7,5, 37 °C, una biomasa de 4,2 g/l y bajo condiciones aerobias. Se tomaron muestras a lo largo del proceso y se realizó un análisis por HPLC para determinar la carnitina total, la crotonobetaina, la  $\gamma$ -butirotetaina y otros compuestos relacionados estructuralmente con éstos. No obstante, sólo se detectó la presencia de carnitina y crotonobetaina. En la Figura 2.6, se representan los resultados de los metabolitos analizados.

La ausencia de  $\gamma$ -butirotetaina está claramente justificada debido a que bajo condiciones aerobias la enzima responsable de su formación, crotonobetaina reductasa,

está inhibida. Sin embargo, sí hubo producción de crotonobetaina, que llegó aproximadamente a 30 mM. Aunque se ha postulado la existencia de una enzima carnitina racemasa (Jung y Kleber, 1991) que catalizaría la biotransformación de D(+)-carnitina a L(-)-carnitina, la presencia de crotonobetaina evidencia la existencia de una actividad carnitina deshidratasa. Teniendo ésto en cuenta, la biotransformación podría ocurrir por la acción conjunta de dos enzimas D(+)-carnitina y L(-)-carnitina deshidratasas. La D(+)-carnitina deshidratasa deshidrataría D(+)-carnitina para producir crotonobetaina, que a su vez sería hidratada estereoselectivamente por la L(-)-carnitina deshidratasa presente en *E. coli* O44 K74 dando lugar a la formación de L(-)-carnitina.



**Figura 2.6.** Variación de la concentración de los metabolitos detectados en la biotransformación de D(+)-carnitina a L(-)-carnitina. D(+)-carnitina (●), L(-)-carnitina (■) y crotonobetaina (σ).

## 2.2.5. Optimización del uso de las células durmientes.

### 2.2.5.1. Estabilidad de las células al almacenamiento.

Dado que la obtención de células en estado durmiente es un proceso laborioso y costoso en cuanto al tiempo invertido, es importante conocer la estabilidad de las mismas al almacenamiento una vez que han sido crecidas y recogidas. La actividad celular se comprobó realizando la biotransformación en las condiciones seleccionadas como óptimas a distintos intervalos de tiempo de almacenamiento. El rendimiento en producto respecto al inicial obtenido en las sucesivas biotransformaciones se expresa en la Tabla 2.6. Como se puede observar, el rendimiento en producto disminuyó rápidamente en los primeros días de almacenamiento, manteniéndose a partir del sexto día.

**Tabla 2.6.** Parámetros de la biotransformación con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente almacenadas a 4 °C, durante distintos intervalos de tiempo.

Almacenamiento	Biomasa	Velocidad de producción	Rendimiento	Productividad*
(d)	(g l <sup>-1</sup> )	(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	(%)	(g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
0	4,15	0,47	35	0,23
1	4,15	0,50	34	0,23
2	4,05	0,56	31	0,21
6	3,98	0,61	27	0,18
8	3,94	0,91	27	0,18
15	3,94	0,93	27	0,18
21	3,39	0,96	26	0,17
34	3,15	1,18	26	0,17
65	2,25	1,76	23	0,15

\*Los valores de productividad se calcularon a las 24 h del inicio del proceso de biotransformación.

La velocidad de producción de L(-)-carnitina aumentó con el tiempo de almacenamiento, al mismo tiempo que se producía una disminución en la concentración de biomasa. Este efecto pudo ser debido a la rotura de las células con la consiguiente

salida al exterior de las enzimas implicadas en el metabolismo de la carnitina, lo que incrementaría la velocidad de reacción bien por una mayor accesibilidad del sustrato a la enzima, o bien por no depender la biotransformación del transporte de sustrato hacia el interior celular. Con respecto al rendimiento en producto y a la productividad, ambos parámetros disminuyeron con el tiempo de almacenamiento, como consecuencia probablemente de la pérdida de actividad de las enzimas implicadas en el proceso. No obstante, tras la primera caída brusca, el rendimiento se mantuvo durante varios días por encima del 65 % del inicial. Así, al cabo de 34 días, las células almacenadas conservaban un 75 % de su actividad inicial, manteniéndose este valor por encima del 65 % tras 65 días de almacenamiento, lo que puso de manifiesto la posibilidad de almacenarlas una vez producidas, durante periodos de tiempo prolongados conservando gran parte de su actividad biotransformadora.

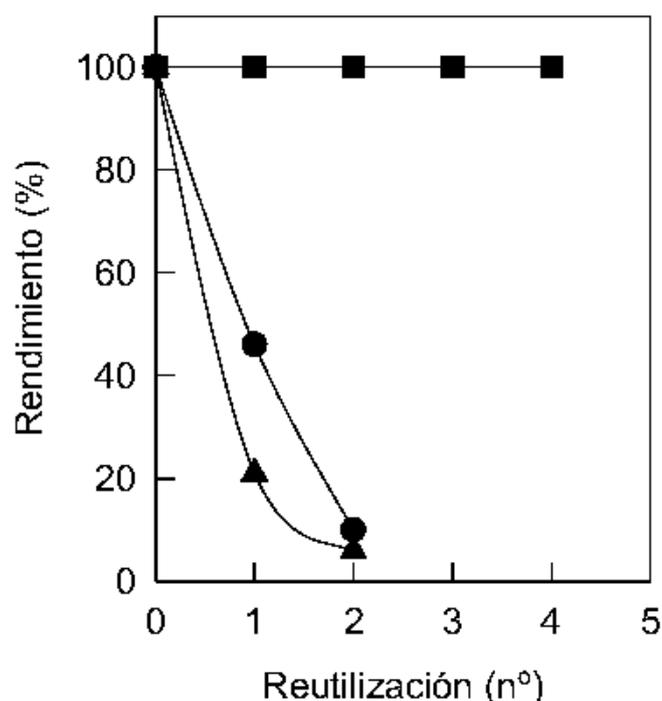
#### *2.2.5.2. Reutilización celular y ciclos de biotransformación/regeneración celular.*

Para un mejor aprovechamiento de las células, se realizó un estudio de reutilización celular. Así, las células se sometieron a periodos de biotransformación bajo las condiciones seleccionadas como óptimas a intervalos de tiempo de 24 horas. Se escogió este periodo de tiempo ya que a dicho valor se alcanzaba prácticamente un rendimiento en producto muy próximo al máximo.

Después de cada ciclo de biotransformación de 24 horas, las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en medio de biotransformación fresco. Se realizaron dos ensayos paralelos, uno a concentraciones bajas de D(+)-carnitina (100 mM) y otro a concentraciones altas (500 mM) con fumarato 200 mM. Se realizaron 2 reutilizaciones en cada ensayo, tomando muestras a lo largo del tiempo y analizando la L(-)-carnitina producida. La Figura 2.7, recoge el rendimiento en producto respecto al inicial obtenido en cada biotransformación. Como puede observarse, hubo una caída brusca del rendimiento, siendo éste inferior al 50 % del inicial ya en la primera reutilización. Esta caída fue más pronunciada para el ensayo realizado a alta concentración de sustrato. Según estos resultados, la reutilización celular no condujo a un buen mantenimiento del rendimiento en producto.

Debido a que no se consiguió mantener el rendimiento por encima del 50% del valor inicial en los ciclos de reutilización celular, se decidió estudiar la

biotransformación realizando ciclos sucesivos de biotransformación/regeneración celular. Para ello, se hicieron crecer las células durante 6 horas en medio complejo bajo condiciones óptimas de inducción enzimática a 37 °C, tras cada proceso de biotransformación de 24 horas, con lo cual las células se recuperaron, pudiendo sintetizar el material celular deteriorado y nuevas enzimas implicadas en la biotransformación. Tras cada fase de regeneración celular, se realizó una nueva biotransformación tomando muestras a lo largo del tiempo y analizando la L(-)-carnitina



producida.

**Figura 2.7.** Rendimiento en producto respecto al inicial en función del número de reutilizaciones sin regeneración celular, en un sistema con 100 mM de sustrato (●) y con 500 mM de sustrato y 200 mM de fumarato (▲), y con regeneración celular en un sistema de 100 mM de sustrato (■).

Este sistema semicontinuo permitió reducir en un 25 % el tiempo invertido en cada etapa de biotransformación, al sustituir la fase de crecimiento celular de 16 horas, por una de regeneración de 6 horas de duración.

Por otro lado, en el sistema semicontinuo se empleó un tiempo de 160 horas en realizar los cinco ciclos de biotransformación/regeneración celular y se obtuvo una productividad global del proceso de  $0,15 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Por el contrario, si se realizaran cinco biotransformaciones independientes se emplearía un tiempo de 200 horas y se obtendría una productividad global del proceso de  $0,16 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , lo cual indica que los ciclos de regeneración conducen a un ahorro de tiempo y de trabajo, al mismo tiempo que no se perdería nada en la productividad global del proceso.

### 2.3. Conclusiones.

1. Las condiciones óptimas de crecimiento e inducción enzimática en *E. coli* O44 K74 fueron: ausencia de oxígeno, presencia de inductor (L(-)-camitina o crotonobetaina) y un estadio celular en fase exponencial de crecimiento.
2. Las condiciones óptimas de biotransformación fueron: presencia de oxígeno, pH 7,5 y 37 °C. Bajo estas condiciones se obtuvieron rendimientos en producto del 40 % y productividades de  $0,22 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , después de 30 horas de inicio de la biotransformación. No obstante, el tiempo de biotransformación se puede reducir a 24 horas, lo que conlleva una disminución del rendimiento al 35 % y un incremento ligero de la productividad a  $0,23 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .
3. La adición de fumarato al medio de biotransformación se manifiesta en un aumento de la productividad hasta  $1,10 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , con un rendimiento del 41 %, a altas concentraciones iniciales de sustrato (500 mM).
4. Las células en estado durmiente fueron estables al almacenamiento, manteniendo el 75 % de su actividad inicial después de 65 días, conservadas a 4 °C en ausencia de nutrientes.
5. La realización de ciclos de biotransformación/regeneración celular permitió obtener un sistema capaz de funcionar repetidas veces conservando altos niveles de actividad celular.

### 3.1 Introducción.

El papel de la carnitina en *E. coli* es de protección de la célula ante choques osmóticos, y tanto ella como la crotonobetaina y la  $\gamma$ -butirobetaina se han aplicado como osmoprotectores (Jung *et al.*, 1990a y 2002). La respuesta fisiológica de *Escherichia coli* a un incremento de la osmolaridad en el medio de crecimiento, es un aumento de la presión osmótica en el interior celular para evitar así su deshidratación (Le Rudulier *et al.*, 1984). Se han realizado gran número de trabajos dedicados al estudio de la osmorregulación en *E. coli* (Martinac *et al.*, 1990; Sigiura *et al.*, 1994; Sukharev *et al.*, 1997; MacMillan *et al.*, 1999). En general, las células responden al incremento de la osmolaridad reteniendo agua mediante la acumulación de algunos solutos a altos niveles, mediante transporte del medio exterior o por síntesis de novo (Wieland *et al.*, 1985; Martinac *et al.*, 1990; Csonka, 1991; Verheul *et al.*, 1995). Estos osmorreguladores, también llamados osmoprotectores o solutos compatibles, incluyen al ion  $K^+$ , a aminoácidos (p. ej. glutamato y prolina), polioles (p. ej. trehalosa y glicerol) y otros solutos orgánicos con propiedades de iones dipolares (p. ej. glicina betaina,  $\gamma$ -butirobetaina, crotonobetaina y carnitina) (Kempf y Bremer, 1998). Las fases de osmoadaptación en *E. coli* han sido ampliamente revisadas (Csonka, 1991 y Wood, 1999).

Las bacterias entéricas responden al estrés osmótico por medio de la entrada de osmoprotectores a través de la membrana citoplasmática que posee dos transportadores: ProP y ProU. Estos sistemas se han presentado como responsables de la acumulación de prolina y betaina bajo condiciones hiperosmóticas. El transportador ProP, es un transportador simporte soluto compatible/ $H^+$  y su actividad es dependiente de  $K^+$  (Cairney *et al.*, 1985; Csonka, 1991; MacMillan *et al.*, 1999). En cambio, el sistema ProU pertenece a los sistemas de transportadores dependientes de ATP, siendo el transporte mediado por betaina estimulado a nivel de la expresión genética por una alta osmolaridad (Csonka, 1991). Además, ambos sistemas, ProU y ProP, están implicados en el transporte de carnitina y otras betainas bajo altas osmolaridades (Verheul *et al.*, 1998). Por otra parte, la proteína CaiT es un transportador antiporte de L(-)-carnitina y  $\gamma$ -butirobetaina en *E. coli* (Jung *et al.*, 2002), aunque se ha observado que el transportador CaiT no juega un papel significativo en la osmoregulación (Verheul, *et al.*, 1998). También, *E. coli* contiene canales iónicos mecanosensitivos en la membrana

plasmática, que responden ante cambios osmóticos en el medio de crecimiento. Los mejores osmosensores estudiados son las proteínas KdpD y MscL (Sigiura *et al.*, 1994; Sukharev *et al.*, 1997). También, los compuestos anfipáticos como clorpromazina se intercalan en la bicapa lipídica, simulando el mismo efecto que provocaría una subida osmótica que afectaría a la fosforilación y por consiguiente a la activación de las proteínas KdpD y MscL, de manera similar a lo que ocurriría ante un aumento en la osmolaridad del medio (Glassker *et al.*, 1998; Poolman y Glaasker, 1998).

En la actualidad no existe información disponible de cómo afecta el estrés osmótico a las células durante las biotransformaciones en estado durmiente, más aun cuando los sustratos y los productos pueden actuar como osmoprotectores. Teniendo en cuenta los conocimientos recientes sobre el papel de la carnitina y de los transportadores de compuestos relacionados, las biotransformaciones con células en estado durmiente se podrían mejorar y/o acelerar ajustando apropiadamente las condiciones de entrada y de salida de sustratos y productos. Así, el objetivo principal de este trabajo es el de analizar la biotransformación de D(+)-carnitina y crotonobetaina en L(-)-carnitina por células durmientes de dos cepas de *E. coli* una silvestre y otra transformada, que sobreexpresa las enzimas L(-)-carnitina deshidratasa y carnitina racemasa, bajo diferentes condiciones de estrés osmótico. Para ello, se han analizado las condiciones óptimas de biotransformación estimulando los transportadores de compuestos de trimetilamonio, mediante el crecimiento de las células en condiciones de un aumento de la osmolaridad en presencia y ausencia de crotonobetaina como inductor del metabolismo de L(-)-carnitina. Se estudió el efecto del estrés osmótico sobre la cinética de transporte de L(-)-carnitina en ambas cepas de *E. coli*, con el fin de obtener más información sobre el proceso de biotransformación. Durante el transporte, además se ha determinado el efecto de agentes modificadores de grupos sulfidrilos tales como el Pb, Cu y el Hg y análogos de fosfato como el arsenato y el vanadato en presencia y ausencia de estrés osmótico. Finalmente, se ha utilizado el ensayo de la incorporación de 1-N-fenilnaftilamino (NPN) para determinar si el estrés osmótico podría producir algún efecto permeabilizador en las células (Alakomi *et al.*, 2000).

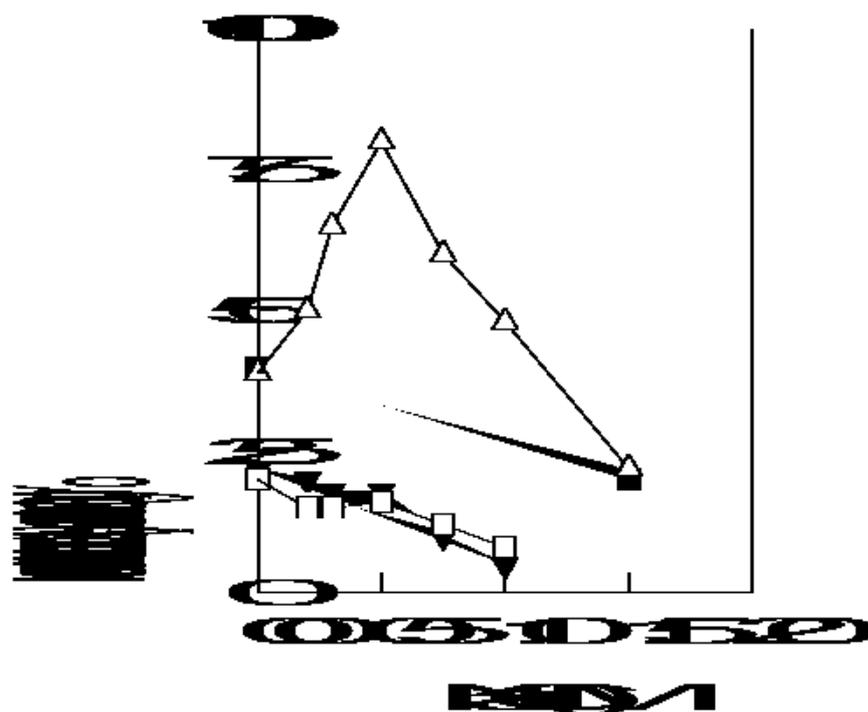
### **3.2. Resultados y discusión.**

#### **3.2.1. Efecto del estrés osmótico en las biotransformaciones de crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina por cepas de *E. coli*.**

Con el fin de estudiar el efecto del estrés osmótico en las biotransformaciones de crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina con células de *E. coli* en estado durmiente, las células se crecieron en medio complejo (Materiales y métodos), se recogieron y se llevó a cabo las biotransformaciones en presencia de concentraciones crecientes de NaCl: 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 1,0 y 1,5 M. La concentración de sustrato fue de 500 mM de crotonobetaina o D(+)-carnitina, la concentración de biomasa de 4,3 g/l y el ensayo fue realizado bajo condiciones aerobias a pH 7,5 y 37°C.

En la Figura 3.1, se representan los resultados obtenidos. Como se puede apreciar, al utilizar crotonobetaina como sustrato, se observó un incremento en la producción de L(-)-carnitina cuando la concentración de NaCl se incrementó hasta llegar a 0,5 M, llegando a alcanzar un 65 y 80% de rendimiento con *E. coli* O44 K74 y *E. coli* K38 pT7-5 KE35, respectivamente. No obstante, no se obtuvo mejoría en el rendimiento a altas concentraciones de NaCl, llegando incluso a disminuir considerablemente. Por el contrario, el estrés osmótico (en este trabajo se considera que la célula está sometida a estrés osmótico a una concentración de NaCl en el medio de 0,5 M) tuvo un efecto negativo en la biotrasformación de D(+)-carnitina, llegando a alcanzar unos rendimientos del 22 y 20% para ambas cepas, respectivamente, en ausencia de NaCl.

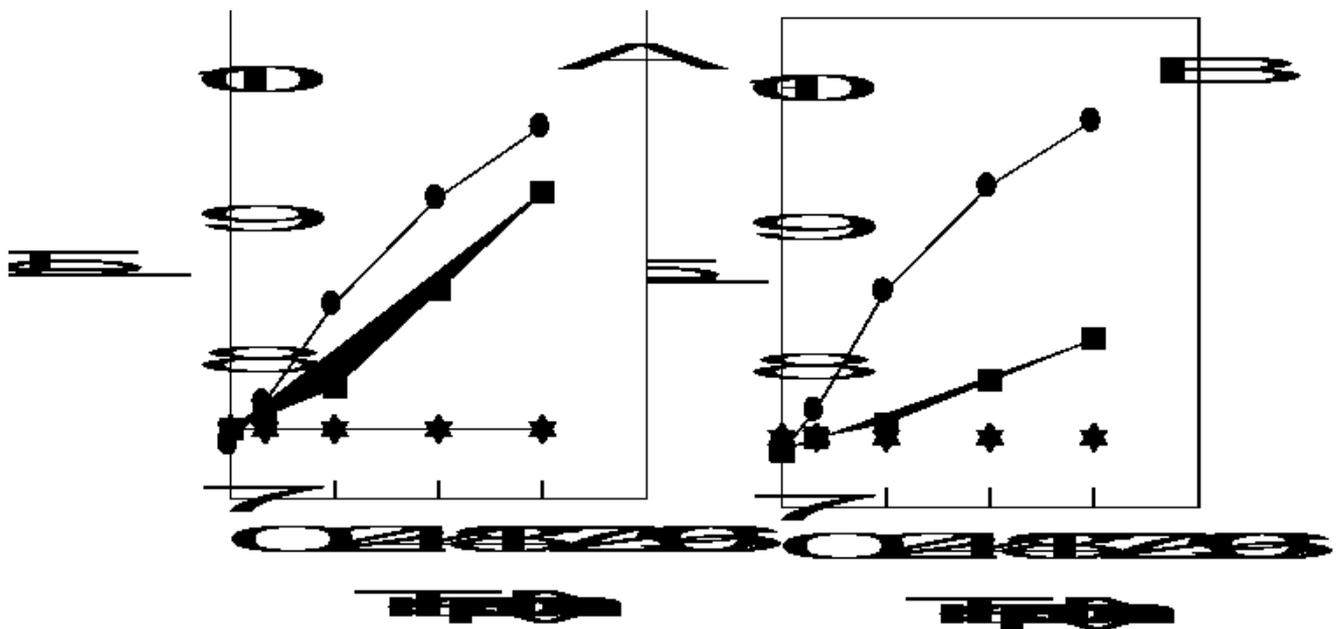
Dado que se ha demostrado que la L(-)-carnitina interviene en la osmoprotección en células creciendo bajo condiciones anaerobias (Verheul *et al.*, 1998) y que la inducción de la enzimas implicadas en el metabolismo de L(-)-carnitina se realiza en condiciones anaerobias, se decidió estudiar la biotransformación con *E. coli* O44 K74 bajo condiciones anaerobias utilizando crotonobetaina como sustrato. El ensayo control sin NaCl, presentó un descenso en la producción obteniendo un rendimiento de un 23% respecto al control aeróbico. Además, no se observó el efecto activador que se produjo al incrementar la concentración de NaCl hasta 0,5 M bajo las condiciones aerobias. A partir de los resultados obtenidos, se eligieron 0,5 M de NaCl y condiciones aerobias para realizar los siguientes estudios de biotransformación.



**Figura 3.1.** Efecto de la concentración de NaCl sobre la biotransformación de crotonobetaina ( $\nabla, \Delta$ ) y D(+)-camitina ( $\square, \triangle$ ) utilizando como biocatalizador *E. coli* O44 K74 (negro) y pT7-5 KE32 (blanco), respectivamente. Los ensayos se realizaron con 500 mM de concentración de sustrato, 4,3 g/l de biomasa en tampón fosfato 67 mM, pH 7,5 y 37°C.

Puesto que el fumarato produjo un incremento en la biotransformación de D(+)-camitina y en el pH del medio de biotransformación (Capítulo 2 de la presente Memoria), se analizaron las biotransformaciones de crotonobetaina y D(+)-camitina 500 mM en presencia de fumarato 200 mM, con concentraciones crecientes de NaCl, utilizando la cepa de *E. coli* O44 K74. El nivel de biotransformación disminuyó al aumentar la concentración de NaCl en el medio para ambos sustratos, y la presencia de fumarato no produjo ningún cambio significativo en la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-camitina. Por otro lado, se midió el pH en el medio durante la biotransformación con ambos sustratos y con distintas concentraciones de NaCl. Los resultados se representan en la Figura 3.2. Como se puede observar, en las biotransformaciones realizadas en ausencia de NaCl se produjo un incremento del pH

del medio a lo largo de la biotransformación (cerca de pH 10 a las 72 horas), sin embargo, al aumentar la concentración de NaCl en el medio de biotransformación el pH final del medio descendió, permaneciendo invariable a partir de 0,75 M de NaCl.



**Figura 3.2.** Variación del pH del medio durante la biotransformación de crotonobetaina (A) y D(+)-carnitina (B) 500 mM en presencia de fumarato 200 mM con distintas concentraciones de NaCl, utilizando células durmientes de *E. coli* O44 K74. Control ( $\lambda$ ), 0,5 ( $\nu$ ), 0,75 ( $\sigma$ ) y 1 M ( $\tau$ ), respectivamente.

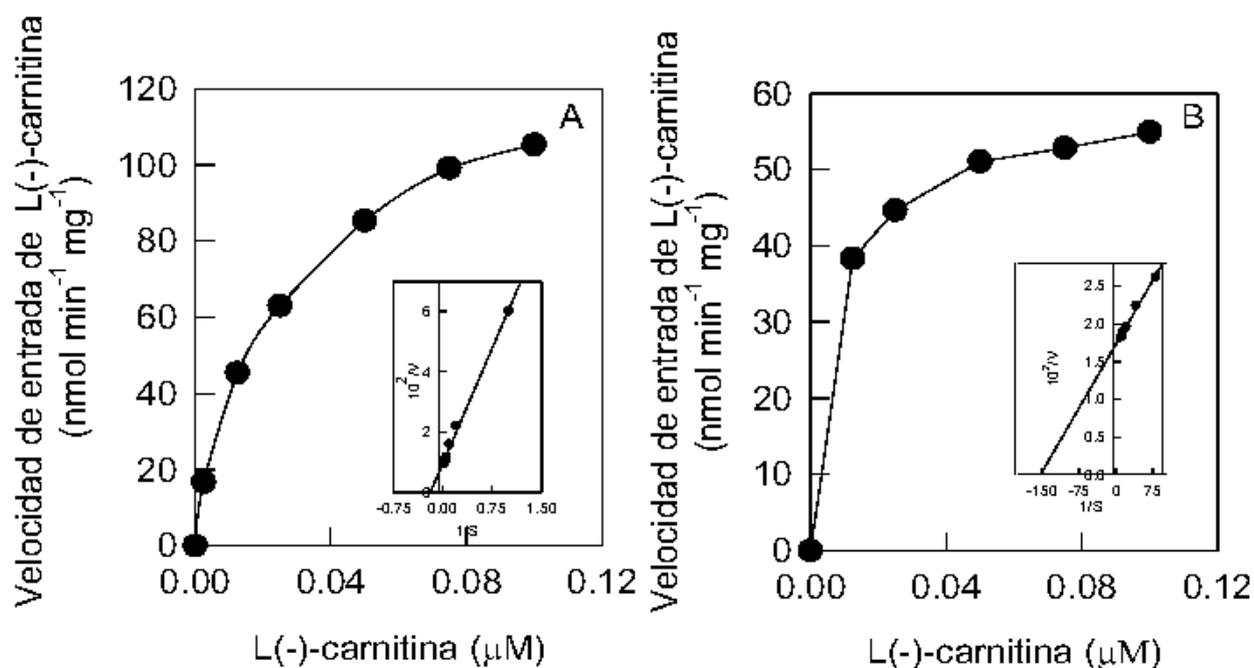
También dependiendo del sustrato utilizado (crotonobetaina o D(+)-carnitina) la variación de pH a lo largo del proceso con el NaCl fue distinta (Figura 3.2). Así, el pH en presencia de NaCl 0,5 M con D(+)-carnitina como sustrato no aumentó tanto como cuando se usó crotonobetaina. Estos resultados indican que intervienen transportadores  $H^+$  dependientes en el proceso de biotransformación y que son afectados por el estrés osmótico. Uno de ellos podría ser el transportador ProP, que es un transportador de solutos compatibles/ $H^+$  simporte y es estimulado en presencia de estrés osmótico (MacMillan *et al.*, 1999).

Así, la presencia de fumarato pudo influir en la biotransformación de crotonobetaina y D(+)-carnitina a nivel del transporte, por ejemplo a nivel del

transportador ProP trimetilamonio/H<sup>+</sup> simporte dependiente de K<sup>+</sup> y el transportador ProP dependiente de ATP, disminuyendo el pH externo y modulando la entrada/salida de los compuestos de trimetilamonio. Además, *E. coli* posee un sistema de antiporte de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> que contribuiría a la alcalinización del citoplasma en estrés osmótico (Wood, 1999).

### 3.2.2. Análisis del transporte de L(-)-carnitina en las cepas de *Escherichia coli* ensayadas.

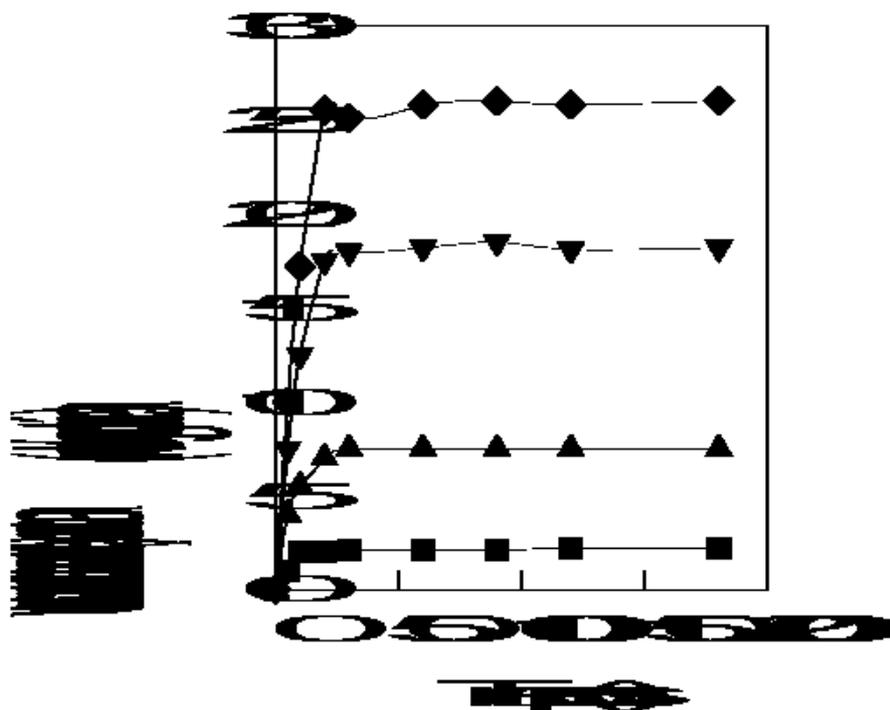
Como el estrés osmótico incrementó la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina y ambos compuestos utilizan el mismo transportador (Jung *et al.*, 1990; Eichler *et al.*, 1996), se analizó el transporte de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina en ambas cepas de *E. coli*. Los experimentos se realizaron como se especifican en Materiales y métodos. En la Figura 3.3 se representan los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros de transporte Km y Vmax aparentes para ambas cepas de *E. coli*.



**Figura 3.3.** Cinéticas del transporte de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina para *E. coli* O44 K74 (A) y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 (B). En los insertos se frente expresan las representaciones dobles recíprocas de 1/V vs 1/S.

Los resultados obtenidos con *E. coli* O44 K74 fueron de una  $K_m$  de  $5,3 \pm 0,2$   $\mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  aparente de  $116,0 \pm 2,5$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína. Estos valores fueron similares a los determinados por Jung et al., 1990. En cambio, no existe información disponible sobre el transporte de compuestos de trimetilamonio en la cepa K38 pT7-5 KE32. En la Figura 3.3, se puede observar que el transporte de L[*N*-metil  $^{14}\text{C}$ ]carnitina presentó una cinética de saturación para ambas cepas. Los ensayos de transporte revelan la presencia de un sistema de transporte de alta afinidad para la cepa transformada con una  $K_m$  de  $2,8 + 0,4$   $\mu\text{M}$  y una  $V_{max}$  de  $57,0 + 3,9$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína. Esta mayor afinidad del transportador con respecto a la cepa silvestre, se debe probablemente al aumento del número de transportadores de betainas, ya que el plásmido posee el gen *CaiF*, cuya proteína induce la transcripción de los operones *cai* y *fix*, sobreexpresando las proteínas de dicho operón del genoma de *E. coli* y aumentando así el número de transportadores *CaiT* en la membrana celular.

También, se analizó el efecto provocado por la presencia de NaCl 0,5 M en el transporte en ambas cepas después de crecerlas en los medios complejo y mínimo (descritos en Materiales y métodos). La concentración de sustrato para todos los ensayos de transporte fue 20  $\mu\text{M}$  de L[*N*-metil  $^{14}\text{C}$ ]carnitina. Las células se crecieron en medio complejo en presencia de 35 mM de crotonobetaina como inductor del metabolismo de carnitina, y fueron usadas en los ensayos de transporte presentando una velocidad inicial de  $105,0 \pm 3,5$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína (expresión del transportador *CaiT* y posiblemente expresión basal de *ProP*) y una entrada de  $25,0 + 1,5$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína. Sin embargo, bajo las mismas condiciones pero con NaCl 0,5 M se observó una disminución de la velocidad inicial, obteniendo  $65,0 \pm 1,8$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína y una velocidad de entrada de  $18,0 \pm 1,8$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína (expresión del transportador *CaiT* y posiblemente inducción de los transportadores *ProU* y basal *ProP*). Por otro lado, utilizando medio mínimo sin NaCl, se observaron resultados similares, siendo la velocidad inicial de  $60,0 \pm 1,5$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína y una velocidad de entrada de carnitina de  $21,0 \pm 0,5$   $\text{nmol}/\text{min}\times\text{mg}$  de proteína.



**Figura 3.4.** Velocidad de entrada de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina con células de *E. coli* O44 K74 inducidas con crotonobetaina y previamente crecidas en ausencia de inductor y NaCl (v), ausencia de inductor y presencia de NaCl (σ), presencia de inductor y presencia de NaCl (τ) y presencia de inductor y ausencia de NaCl (υ). La concentración utilizada en los ensayos de transporte fue de 20 μM (6,6 mCi/mmol). Los ensayos se realizaron a 37 °C.

La velocidad de entrada de L(-)-carnitina en *E. coli* O44 K74 a través de los sistemas de transporte ProP y ProU también fue analizada mediante el uso de células crecidas en ausencia de crotonobetaina (inductor del metabolismo de carnitina) y de NaCl, dando como resultado una expresión basal de los transportadores ProP y caiT (Figura 3.4). Además, en el medio complejo se produjo una velocidad de entrada de  $2,1 \pm 0,8$  nmol/minxmg de proteína, mientras que en medio mínimo la velocidad fue de  $4,8 \pm 1,5$  nmol/minxmg de proteína. Sin embargo, en presencia de NaCl 0,5 M en el medio de crecimiento bajo las mismas condiciones, se produjo un incremento de L[N-metil

$^{14}\text{C}$ ]carnitina  $7,5 \pm 2,1$  nmol/minxmg de proteína, debido probablemente a la inducción de los transportadores ProP y ProU y basal CaiT.

Por otro lado, en *E. coli* K38 pT7-5 KE32 el efecto de NaCl 0,5 M, reveló una reducción de la velocidad inicial de  $60,0 \pm 4,2$  a  $28,0 \pm 2,2$  nmol/minxmg de proteína, cerca del 50%. Así, los valores de control siempre bajaron en presencia de NaCl cuando el transporte y el metabolismo de los compuestos trimetilamonio fueron inducidos con crotonobetaina (siempre 35 mM).

### 3.2.3. Efecto de los análogos de fosfato sobre el sistema de transporte y las biotransformaciones.

Dado que la biotransformación puede estar controlada cinéticamente por el transporte de los compuestos trimetilamonio, se analizó el transporte de L[*N*-metil  $^{14}\text{C}$ ]carnitina, mediante análogos de fosfato, tales como arseniato y vanadato. El estudio se llevó a cabo en presencia y ausencia de NaCl 0,5 M. En la Tabla 3.1 se presentan las velocidades de transporte de L[*N*-metil  $^{14}\text{C}$ ]carnitina usando inhibidores de la ATPasa  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ . Para *E. coli* O44 K74 la velocidad de la entrada de L(-)-carnitina disminuyó como consecuencia del uso de ambos análogos de fosfato, especialmente en presencia de NaCl 0,5 M, sin embargo, para *E. coli* pT7-5KE32 la velocidad de transporte disminuyó en ausencia de NaCl cuando fue tratada con ambos análogos de fosfato.

**Tabla 3.1.** Velocidades de transporte de L[*N*-metil  $^{14}\text{C}$ ]carnitina en presencia de arseniato y vanadato.

Cepa	Control		Arseniato(*)		Vanadato(*)	
	(nmol/mgxmin)		(nmol/mgxmin)		(nmol/mgxmin)	
	NaCl		NaCl		NaCl	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
<i>E. coli</i> O44K74	$28,0 \pm 3,5$	$21,0 \pm 1,8$	$15,0 \pm 2,1$	$5,0 \pm 1,8$	$20,0 \pm 2,1$	$3,8 \pm 1,8$
<i>E. coli</i> K38 pT7-5 KE32	$12,0 \pm 3,5$	$8,0 \pm 2,1$	$6,0 \pm 1,1$	$4,1 \pm 1,5$	$7,0 \pm 1,3$	$10,0 \pm 2,5$

(\*) La concentración en los ensayos de transporte fue de 0,5 mM. Los resultados son la media de tres experimentos

Estos resultados de transporte obtenidos en presencia de análogos de fosfato, podrían indicar que el arseniato y quizás el vanadato, afectan a los transportadores ProU

y CaiT, ya que ambos son dependientes de ATP, y al transportador ProU que es inducido además en presencia de estrés osmótico.

Por otro lado, los análogos de fosfato, arseniato y vanadato, también inhibieron la biotransformación de crotonobetaina (Tabla 3.2). Así, en *E. coli* O44 K74, el arseniato redujo el rendimiento en presencia y ausencia de 0,5 M de NaCl en un 60% y 25%, respectivamente; sin embargo, el vanadato sólo lo redujo en un 25% bajo estrés osmótico. Cuando se utilizó *E. coli* pT7-5 KE32, el vanadato solo afectó la biotransformación en presencia de NaCl 0,5 M (35% de reducción); sin embargo, el arseniato afectó fuertemente al transporte en presencia de NaCl (65%) y solamente en un 25% en su ausencia.

**Tabla 3.2.** Rendimientos en la biotransformación de crotonobetaina utilizando análogos de fosfato arseniato y vanadato como inhibidores de la ATPasa en presencia y ausencia de NaCl 0,5M.

Cepa	Control		Arseniato(*)		Vanadato(*)	
	Rendimiento (%)		Rendimiento (%)		Rendimiento (%)	
	NaCl		NaCl		NaCl	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
<i>E. coli</i> O44K74	40,0 ± 1,0	65,0 ± 3,5	30,0 ± 0,8	29,0 ± 1,1	36,0 ± 2,8	49,0 ± 2,1
<i>E. coli</i> K38 pT7-5 KE32	39,0 ± 2,1	76,0 ± 3,5	10,0 ± 0,5	28,0 ± 2,1	30,0 ± 2,8	50,0 ± 1,3

(\*) Concentración de 0,5 mM. Los ensayos se realizaron con 500 mM de crotonobetaina con 4,3 g/l de biomasa, pH 7,5 y 37°C. Los resultados son la media de tres experimentos.

También se determinó el efecto de los citados análogos en la biotransformación de D(+)-carnitina con *E. coli* O44 K74 sin tratar con NaCl, dando como resultado que el vanadato y el arseniato también redujeron la biotransformación alrededor de un 10% (datos no presentados).

Puesto que ambos análogos de fosfato afectaron a las biotransformaciones de crotonobetaina y D(+)-carnitina, ello puede indicar que los transportadores CaiT y/o el sistema enzimático pudieron ser afectados, incluso con las células no sometidas a estrés osmótico. Estudios previos realizados con *L. monocitogens*, revelaron que el transporte de L(-)-carnitina tiene lugar en ausencia de la fuerza protón motriz y también es fuertemente inhibido por la presencia de análogos de fosfato como vanadato y arseniato (Verheul *et al.*, 1995). También es posible que las proteínas osmosensoras

mecanosensitivas KdpD y MscL, no actúen debidamente al requerir una fosforilación para realizar su función (Sigiura *et al.*, 1994; Sukharev *et al.*, 1997), provocando así los efectos negativos en el transporte y en la biotransformación de los compuestos de trimetilamonio.

### 3.2.4. Efecto de agentes modificadores de grupos sulfidrilo (SH) sobre el sistema de transporte y las biotransformaciones de crotonobetaina y D(+)-carnitina.

Se analizó el efecto de los iones Pb (II), Hg (II) y Cu (II) sobre la velocidad de transporte de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina en presencia y ausencia de NaCl 0,5 M. Los análisis se llevaron a cabo tal y como se han descrito en el apartado anterior, a una concentración de ión de 0,5 mM. Los ensayos de transporte realizados con *E. coli* O44 K74 fueron completamente inhibidos por el uso del ion Hg (II). En cambio, el ion Cu (II), sólo afectó al transporte de L(-)-carnitina en presencia de NaCl, mientras que el ion Pb(II) no lo alteró (Tabla 3.3). Con respecto a *E. coli* pT7-5 KE35, el ion Hg (II) también bloqueó casi por completo el transporte de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina, mientras que el ion Cu (II) lo inhibió en presencia de NaCl en casi un 50% y en su ausencia en casi un 40%. Estos resultados ponen de manifiesto que el Cu (II) afectó principalmente al transporte mediado por estrés osmótico.

**Tabla 3.3.** Velocidades de transporte de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina en *E. coli* O44 K74 con modificadores de grupos sulfidrilo (SH), Cu (II), Pb (II) y Hg (II) en presencia y ausencia de NaCl 0,5 M.

Cepa	Control		Cu (II)(*)		Hg (II)(*)		Pb (II)(*)	
	(nmol/mgxmin)		(nmol/mgxmin)		(nmol/mgxmin)		(nmol/mgxmin)	
	NaCl		NaCl		NaCl		NaCl	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
<i>E. coli</i> O44K74	28,0 ± 3,5	18,0 ± 1,8	25,0 ± 2,1	4,1 ± 1,8	ND	0,5 ± 0,2	29,0 ± 4,5	18,1 ± 1,8
<i>E. coli</i> K38 pT7-5 KE32	12,0 ± 3,5	8,0 ± 2,1	7,1 ± 1,1	2,8 ± 1,5	0,8 ± 0,3	1,0 ± 0,5	11,0 ± 1,3	4,0 ± 2,5

(\*) Concentración en los ensayos de transporte fue de de 0,5 mM. ND: no detectado. Los resultados son la media de tres experimentos.

El efecto de los mismos iones en los rendimientos obtenidos en la biotransformación de crotonobetaina 500 mM en presencia y ausencia de NaCl 0,5 M se

presentan en la Tabla 3.4. Como se puede apreciar, a la concentración ensayada, el ion Pb (II) no afectó al rendimiento de L(-)-carnitina en ausencia de NaCl. Sin embargo, en presencia de estrés osmótico se observó un descenso del 40% en *E. coli* O44 K74. Con respecto al ion Cu(II), éste produjo un descenso en el rendimiento tanto en presencia como en ausencia de NaCl, alrededor de 40 y 55%, respectivamente. En el caso de *E.coli* K38 pT7-5 KE35, los iones Cu(II) y Pb(II), inhibieron la biotransformación en presencia de NaCl en un 65 y 25%, respectivamente, mientras que en ausencia de estrés osmótico el ion Cu(II) produjo un 30% de inhibición. Además, como en los casos anteriores, el ion Hg(II), inhibió casi por completo el proceso de biotransformación en ambas cepas.

**Tabla 3.4.** Rendimiento de biotransformación de crotonobetaina en presencia de modificadores de grupos sulfidrilos (SH).

Cepa	Control		Cu (II)(*)		Hg (II)(*)		pb (II)(*)	
	Rendimiento(%)		Rendimiento(%)		Rendimiento(%)		Rendimiento(%)	
	NaCl		NaCl		NaCl		NaCl	
	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
<i>E. coli</i> O44K74	41,0 ± 3,8	65,0 ± 2,5	22,0 ± 1,8	38,0 ± 3 1	4,0 ± 0,2	3,0 ± 0,8	43,0 ± 0,8	40,0 ± 5,5
<i>E. coli</i> K38 pT7-5 KE32	39,0 ± 2,8	76,0 ± 3,0	30,0 ± 0,5	30,0 ± 1,8	2,0 ± 0,9	2,0 ± 0,5	39,0 ± 2,8	58,0 ± 2,3

(\*) Concentración utilizada en los ensayos de biotransformación fue de de 0,5 mM para todas las sales utilizadas. Los resultados son la media de tres experimentos.

Por otro lado, el ion Pb (II), no afectó a la biotransformación de D(+)-carnitina, sin embargo, el ion Cu (II), la redujo en un 20% y el ion Hg (II) la inhibió completamente como en el caso de crotonobetaina.

Bajo estrés osmótico, el ion Pb (II) generó una disminución del 25% en el rendimiento de L(-)-carnitina con crotonobetaina como sustrato en ambas cepas de *E. coli*. Además, Los resultados del transporte y biotransformación con el ion Cu (II) en presencia de estrés osmótico (p. ej., expresión de ProU), afectó apreciablemente a la biotransformación. Sin embargo, en ausencia de estrés osmótico solo CaiT pudo estar modificado. Con respecto a la D(+)-carnitina, el ion Cu(II) inhibió fuertemente la biotransformación. La disminución de los valores producida por el ion Cu(II), pudieron ser debidos al efecto provocado sobre el transportador o sobre las enzimas de la biotransformación, así como al bloqueo de los grupos SH de las proteínas (Dâmelio *et*

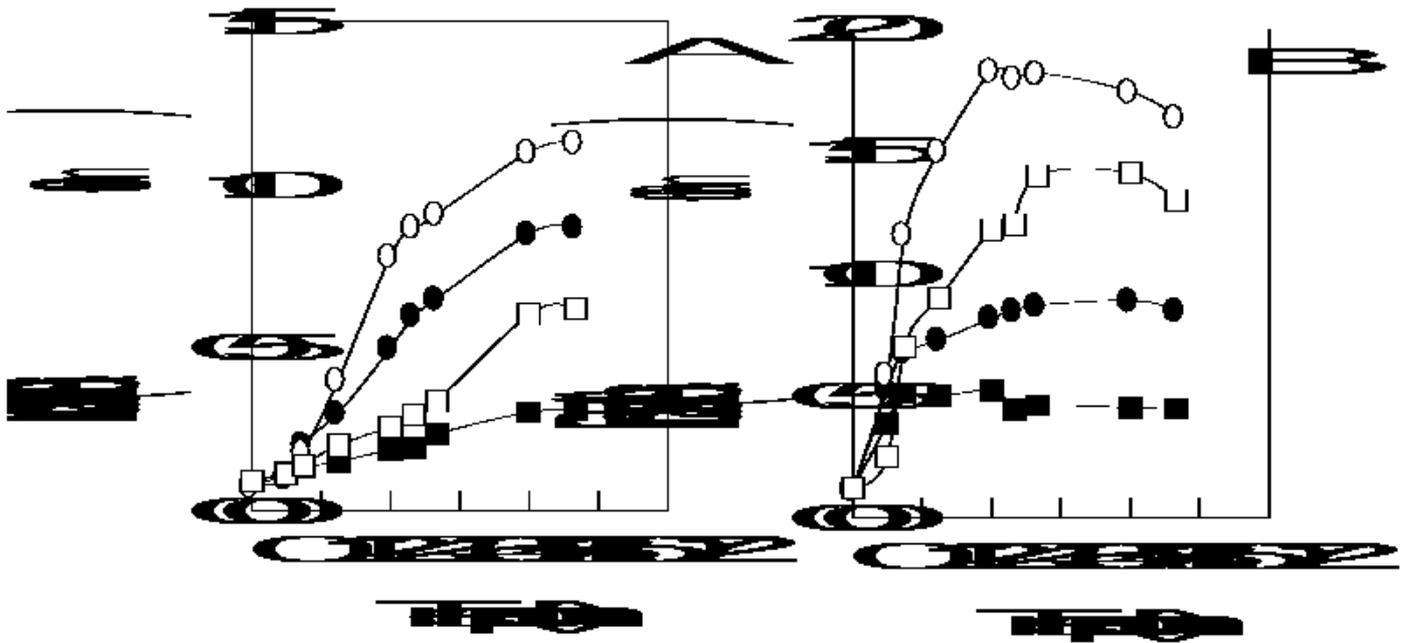
*al.*, 1974; Chisholm, 1970). En estudios realizados con anterioridad con la bacteria *L. monocitogenens*, la adición de  $\text{HgCl}_2$ , produjo una completa disipación de la fuerza protón motriz y de la concentración intracelular del ATP (Verheul *et al.*, 1995). Además, los iones  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{Cu(II)}$  pudieron actuar sobre los canales mecanosensitivos o sobre alguna proteína que contenga SH y esté involucrada en la osmoprotección (Koo *et al.*, 1991).

### **3.2.5. Efecto osmoprotector de la crotonobetaina en el crecimiento de *E. coli***

#### **O44 K74 en presencia de NaCl.**

Con el fin de determinar el efecto de la osmoprotección de la crotonobetaina sobre el crecimiento de *E. coli* O44 K74 en presencia de estrés osmótico, las células se crecieron en medio complejo y mínimo, en presencia y ausencia de 0,5 M de NaCl, y en presencia y ausencia de crotonobetaina 35 mM, respectivamente. Los ensayos se realizaron a 37°C bajo condiciones anaerobias, y las muestras se tomaron a lo largo del tiempo, midiendo la absorbancia a 600 nm. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.5. Como se puede apreciar, el medio complejo favoreció el crecimiento, ya que es mucho más enriquecido en nitrógeno proteico que el medio mínimo. En ambos medios de crecimiento, la presencia de NaCl disminuyó la velocidad de crecimiento. Sin embargo, la presencia de crotonobetaina en los medios suplementados con NaCl, estimuló el crecimiento actuando como osmoprotector. Así, en el medio mínimo se obtuvo una velocidad de crecimiento en presencia de NaCl y sin crotonobetaina de  $3,9 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , mientras que al suministrar al medio crotonobetaina aumentó a  $7,4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Además, en ausencia de NaCl y sin crotonobetaina la velocidad específica fue de  $18,5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , mientras que al suministrar crotonobetaina al medio se elevó a  $30,8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . En cambio, el comportamiento de *E. coli* O44 K74 en el medio complejo fue distinto, ya que se obtuvieron mayores velocidades de crecimiento siempre en presencia de crotonobetaina con y sin NaCl, alcanzando unos valores de  $46,5 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  y  $72,4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, a pesar de que en el medio mínimo los mayores valores de crecimiento fueron en ausencia de NaCl (Figura 3.5). Como se puede apreciar, la presencia de NaCl en el medio complejo también disminuyó la velocidad de crecimiento desde  $41,1 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$  a  $32,3 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Así, el hecho de que se produjera un mayor crecimiento celular en presencia de NaCl y de crotonobetaina sobre el medio complejo respecto al medio mínimo, pudo ser debido a que el medio complejo aportó en su

composición algún otro factor osmoprotector, además de la crotonobetaina, que favoreció el crecimiento celular. Es de suponer, que la crotonobetaina aumentó el crecimiento en ausencia de NaCl en ambos medios, probablemente debido a que el crecimiento se produjo en condiciones anaerobias y pudo actuar como aceptor externo de electrones, favoreciendo así el crecimiento celular.

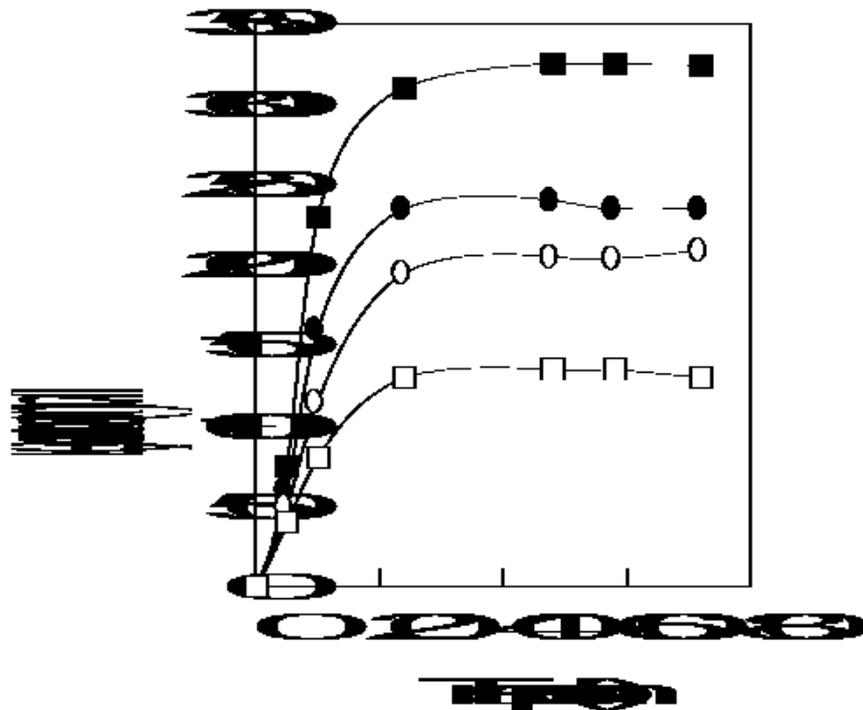


**Figura 3.5.** Crecimiento de *E. coli* O44 K74 en medio mínimo (A) y medio complejo (B) en ausencia ( $\lambda$ ,  $\mu$ ) y presencia ( $\nu$ ,  $\omicron$ ) de NaCl 0.5 M, respectivamente, y en ausencia ( $\lambda$ ,  $\nu$ ) y en presencia ( $\mu$ ,  $\omicron$ ) de crotonobetaina 35 mM, respectivamente. El crecimiento se realizó bajo condiciones anaerobias y 37°C.

Estos resultados ponen de manifiesto que la crotonobetaina es un osmoprotector en presencia de estrés osmótico y que además favorece el crecimiento celular en su ausencia.

### 3.2.6. Efecto del estrés osmótico sobre las células en estado durmiente crecidas previamente en presencia de NaCl.

La osmoadaptación podría influir sobre los niveles de transportadores por unidad de célula y por lo tanto sobre la biotransformación en *E. coli*. Para su estudio, las células se crecieron en medio complejo con y sin NaCl 0,5 M, bajo condiciones anaerobias y presencia de crotonobetaina 35 mM. Las células durmientes obtenidas, fueron sometidas a procesos de biotransformación con y sin NaCl 0,5 M. Los resultados se presentan en la Figura 3.6. Como se puede apreciar, la adición de NaCl al medio de cultivo causó un descenso en la biotransformación de *E. coli* O44 K74 con respecto a las células crecidas en su ausencia (Figura 3.6), lo que concuerda con los estudios de transporte realizados con anterioridad.



**Figura 3.6.** Efecto del estrés osmótico en la biotransformación de crotonobetaina 500 mM con células de *E. coli* O44 K74 crecidas con ( $\mu$ ,  $\circ$ ) y sin ( $\lambda$ ,  $\nu$ ) NaCl 0,5 M, respectivamente y biotransformación en presencia ( $\nu$ ,  $\circ$ ) y ausencia ( $\lambda$ ,  $\mu$ ) de NaCl 0,5 M, respectivamente.

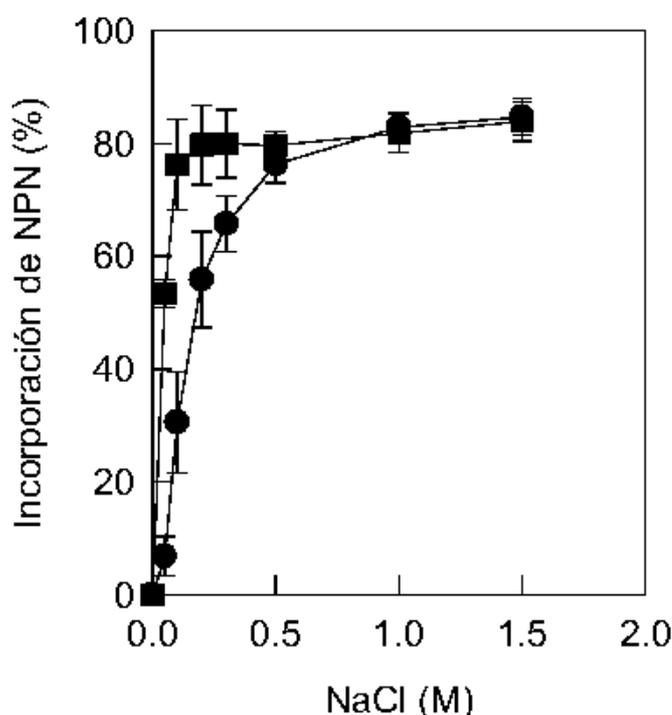
Por otro lado, el crecimiento de las células en presencia de estrés osmótico produjo un descenso en los procesos de biotransformación con células en estado durmiente con y sin adición de NaCl. Estos resultados revelan que el crecimiento de las células en presencia de NaCl pudo afectar al metabolismo de los compuestos trimetilamonio a nivel de expresión de las enzimas y su actividad.

Por el contrario, las células sometidas solamente a estrés osmótico durante la biotransformación incrementaron la producción de L(-)-carnitina con respecto a las sin NaCl, utilizando crotonobetaina como sustrato. Estos hechos podrían evidenciar la activación del transporte de los compuestos de trimetilamonio o bien algún efecto beneficioso en la transferencia de masa desde el medio, a través de la pared y la membrana celular, al compartimento citoplasmático. Además, en la bibliografía se ha evidenciado que las enzimas crotonobetaina reductasa y la carnitina deshidratasa reducen su actividad en extractos celulares de células crecidas bajo estrés osmótico (Jung *et al.*, 1990). Así, la osmoadaptación pudo afectar a la inducción y/o la actividad de las enzimas de la biotransformación,

### **3.2.7. Ensayos de incorporación de NPN.**

Dado que los tratamientos de permeabilización dañan normalmente la membrana externa (ME) de bacterias gram negativas, y siendo ésta capaz, en condiciones normales, de excluir sustancias hidrófobas, como es el caso del 1-N-fenilnaftilamino (NPN) (Helander *et al.*, 2000), se analizó la incorporación de este compuesto tras el tratamiento con diferentes concentraciones de NaCl, en ambas cepas de *E. coli*. En la Figura 3.8 se presentan los resultados obtenidos. Como se puede apreciar, los datos indican que se produjo un daño en la membrana externa como resultado de la exposición al estrés osmótico. Además, se observaron altos niveles de incorporación de NPN a partir de NaCl 0,25 M en ambas cepas de *E. coli*, apareciendo una saturación de la señal de fluorescencia a partir de una concentración de 0,5 M de NaCl. En la bibliografía se ha referenciado tanto con células procariotas como eucariotas, que los tratamientos de permeabilización provocan una salida de lipopolisacáridos (LPS) y otros componentes de la membrana externa (ME), e incluso, que el NPN se intercala en la ME, afectando su integridad (Vaara, 1992; Alakomi *et al.*, 2000; Helander *et al.*, 2000). De hecho, la ME está covalentemente unida a sáculos de

mureína por medio de lipoproteínas y algunas porinas que producen fuertes uniones de membrana y pared celular, sugiriendo que se pueden experimentar variaciones locales de estrés mecánico como respuesta al estrés osmótico (Wood, 1999).



**Figura 3.8.** Efecto del estrés osmótico en la incorporación de NPN en células de *E. coli* O44 K74 ( $\lambda$ ) y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 (v). La descripción del ensayo se encuentra en Materiales y Métodos.

Sin embargo, la limitación impuesta por la existencia de la ME y la pared celular, que genera una barrera de transferencia de masa en *E. coli*, se podría evitar o disminuir, mediante la permeabilización, con lo que podría mejorar la biotransformación con respecto a los ensayos control. De hecho, el estrés osmótico se ha descrito entre los distintos métodos usados para permeabilización celular (Felix, 1982). Como conclusión se puede establecer, que el efecto generado por el estrés osmótico sobre la biotransformación se relaciona más con un efecto permeabilizante que de estimulación de la síntesis de transportadores, sobre todo a los tiempos largos a los que se realiza la misma. En el Capítulo siguiente se aborda el efecto de la

permeabilización con diferentes agentes permeabilizantes sobre la biotransformación de los compuestos de trimetilamonio, crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina.

### 3.3. Conclusiones.

1. El estrés osmótico afectó a la biotransformación de crotonobetaina y D(+)-carnitina en L(-)-carnitina con células en estado durmiente de *E. coli* O44 K74 y la cepa transformada *E. coli* K38 pT7-5 KE32. Se obtuvieron unos rendimientos de L(-)-carnitina del 65 y 80% con la cepa silvestre y la transformada (control 40%), respectivamente, al elevar la osmolaridad del medio de biotransformación con NaCl 0,5 M.
2. El transportador CaiT en *E. coli* O44 K74 presentó una Km aparente de  $5,3 \pm 0,2$   $\mu$ M y una Vmax de  $116,0 \pm 2,5$  nmol/minxmg de proteína. En cambio, en *E. coli* K38 pT7-5 KE35 presentó una menor Km de  $2,8 \pm 0,4$   $\mu$ M y Vmax de  $57,0 \pm 3,9$  nmol/minxmg de proteína, demostrando una mayor afinidad por L(-)-carnitina.
3. Los inhibidores de la ATPasa, afectaron de diferente manera a la biotransformación al utilizar ambos sustratos y en diferente grado a ambas cepas de *E. coli*. Así, el arseniato redujo el transporte y la biotransformación de crotonobetaina en presencia y ausencia de NaCl 0,5 M, y sin embargo el vanadato afectó al transporte e inhibió la biotransformación solo bajo condiciones de estrés osmótico. Estos resultados sugieren que el arseniato y el vanadato afectaron a los transportadores ATP dependientes CaiT y proU.
4. Los agentes modificadores de grupos sulfidrilo también afectaron al transporte y a la biotransformación en ambas cepas. Así, el ion Hg (II) inhibió el transporte y la biotransformación, pero en cambio el ion Pb (II) solo redujo la biotransformación en presencia de NaCl; en su ausencia no se produjo dicha inhibición. En ausencia de estrés osmótico, el ion Cu (II) produjo una disminución en la biotransformación significativamente mayor que el ion Pb (II) con ambos sustratos, pero en su presencia solo afectó al transporte.
5. La presencia de crotonobetaina en el medio aumentó la velocidad de crecimiento, debido probablemente a que actuó como aceptor externo de electrones bajo

condiciones anaerobias. Por otro lado, en presencia de estrés osmótico, también favoreció el crecimiento actuando como osmoprotector.

6. El aumento de la producción de L(-)-carnitina puede ser debido no solo a un aumento del transporte por la inducción o activación de los transportadores (p. ej. ProP y ProU) en presencia de estrés osmótico, sino también por un efecto de permeabilización celular tal y como demuestran los ensayos de incorporación de NPN.

#### **4.1 Introducción.**

La integridad de la membrana externa de bacterias gram negativas como *E. coli* se puede distorsionar por ciertas sustancias capaces de intercalarse en ella provocando la salida de sus componentes (Vaara, 1992). Estas sustancias son denominadas permeabilizadores, y sin ser directamente tóxicas para las bacterias, las sensibiliza a otros agentes externos que son incapaces de penetrar por sí solos en el interior de las dianas bacterianas (Felix, 1982; Ayres *et al.*, 1999).

En general, se han descrito diferentes tipos de permeabilizadores para bacterias, entre los que destacan los detergentes como Triton X-100 (Galabova *et al.*, 1996; Michielsen *et al.*, 1998) y Tween (Galindo y Salcedo, 1996), agentes quelantes como el EDTA (Ryan y Parulekar, 1991; Vaara, 1992; Helander y Mattila-Sandholm, 2000) y solventes orgánicos como el tolueno (Park *et al.*, 1994), que incrementan la permeabilidad celular. Recientemente, se han descrito dos permeabilizadores muy efectivos en bacterias gram-negativas, polietilenimina (PEI) (Helander *et al.*, 1997, 1998) y ácido láctico (Alakomi *et al.*, 2000). También en levaduras se han descrito diferentes detergentes y solventes orgánicos que incrementan la permeabilidad de sus membranas (Vicenzi y Hansen, 1993; Lee *et al.*, 1994; Flores *et al.*, 1994 y Liu *et al.*, 1999). Los métodos eficientes de permeabilización en bacterias gram negativas que permitan aumentar el paso de sustratos y productos pueden ser adecuados para maximizar los rendimientos en los procesos de biotransformación.

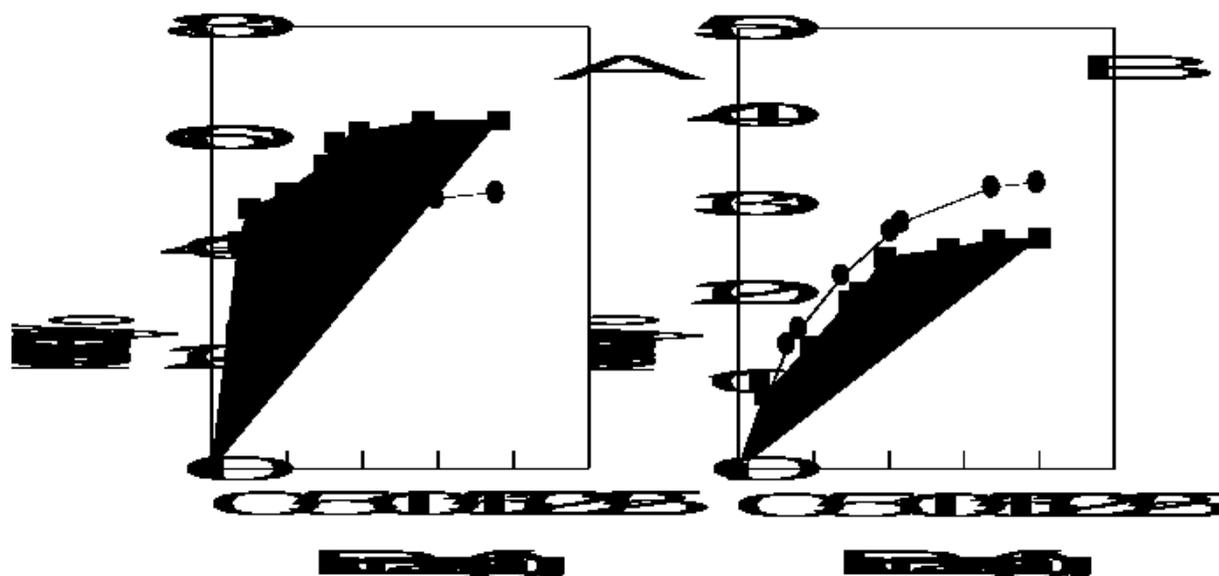
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una metodología de permeabilización que permitiera incrementar el rendimiento de la biotransformación de crotonobetaina y/o D(+)-carnitina en L(-)-carnitina, utilizando células de *E. coli* silvestre y transformada. Por medio de la permeabilización de las células, se podría aumentar la entrada de sustratos, la salida de productos, ambos controlados por difusión a través de la membrana externa y la pared celular, gracias a la modificación del control impuesto por el sistema de transporte para betainas. Para ello, se han utilizado algunos permeabilizadores que permitan obtener células activas en los procesos de biotransformación. El daño y la integridad celular durante el proceso de la permeabilización se evaluó mediante el ensayo de incorporación de 1-fenilnaptilamino (NPN) y la salida de proteína celular. Los efectos de la permeabilización sobre las células fueron determinados por medio de

la microscopía electrónica de transmisión y por el ensayo de transporte de L[N-metil<sup>14</sup>C]carnitina.

## 4.2. Resultados y discusión

### 4.2.1. Efecto de la biomasa sobre los procesos de biotransformación con células durmientes de *E. coli*.

Primeramente y antes del uso de agentes permeabilizadores celulares, se optimizó la concentración celular utilizando células durmientes de *E. coli* O44 K74 y *E. coli* K38 pT7-5 KE32, en los procesos de biotransformación de D(+)-carnitina y crotonobetaina en L(-)-carnitina. La concentración de biomasa ensayada estuvo comprendida entre 1,7 y 20,0 g/l de peso seco y la biotransformación fue realizada utilizando 500 mM de crotonobetaina o D(+)-carnitina como sustratos. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 4.1, donde se puede apreciar que paralelamente al aumento de la concentración celular, se produjo un aumento en el rendimiento de L(-)-carnitina con ambas cepas y sustratos.



**Figura 4.1.** Variación del rendimiento de L(-)-carnitina con diferentes concentraciones de biomasa. Los ensayos se realizaron bajo condiciones aerobias, crotonobetaina o D(+)-carnitina 500 mM en tampón fosfato pH 7,5 y 37 °C, utilizando *E. coli* O44 K74 (λ) y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 (v), crotonobetaina (A) y D(+)-carnitina (B).

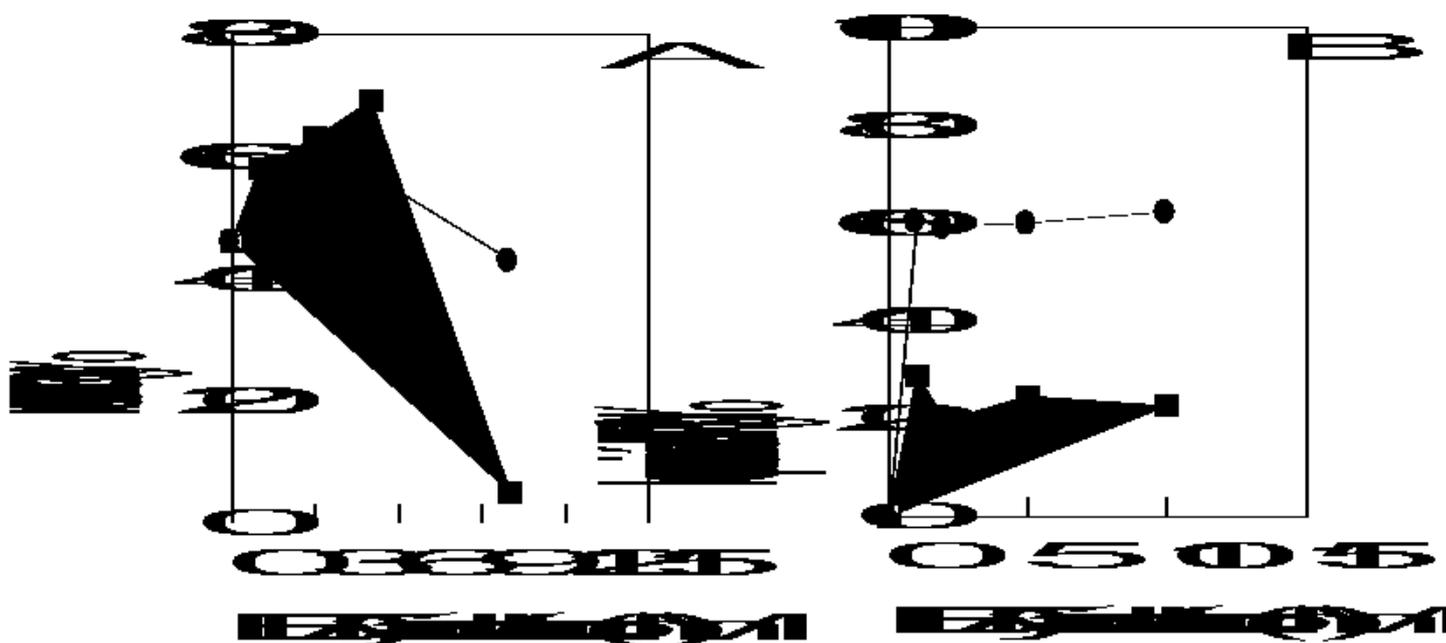
La biotransformación de crotonobetaina utilizando *E. coli* K38 pT7-5 KE32 fue mayor que con la cepa silvestre (Figura 4.1A), debido a la sobreexpresión de las enzimas carnitina deshidratasa y carnitina racemasa en la cepa transformada. Por el contrario, la biotransformación de D(+)-carnitina el L(-)-carnitina fue mayor con *E. coli* O44 K74 (Figura 4.1B).

La máxima conversión se alcanzó aproximadamente a una concentración de biomasa de 11,0 g/l de peso seco para ambas cepas, por lo que fue seleccionada para todos los ensayos de permeabilización celular que se realizaron en este capítulo.

#### **4.2.2. Biotransformación con células permeabilizadas con EDTA y ácido láctico.**

La permeabilización celular se realizó con diferentes concentraciones de EDTA y ácido láctico en el medio de biotransformación, las cuales fueron para ambos compuestos de, 1, 3, 5 y 10 mM, repectivamente. La biotransformación se llevó a cabo utilizando células en estado durmiente de *E. coli* O44 K74, con 11,0 g/l de biomasa y crotonobetaina 500 mM. En la Figura 4.2 A, se puede apreciar que al aumentar la concentración de EDTA o de ácido láctico se produjo un aumento del rendimiento con respecto al control (45%), hasta alcanzar una concentración de 5 mM para ambos permeabilizadores, con unos rendimientos del 60 y 65%, respectivamente en L(-)-carnitina. Sin embargo, a altas concentraciones de EDTA o ácido láctico (10 mM), se observó un efecto negativo sobre la biotransformación de crotonobetaina, probablemente producido por un lado, porque las concentraciones de EDTA afectaron a las enzimas que intervienen en el proceso de biotransformación y por otro, por la salida masiva de cationes divalentes de la ME durante la permeabilización celular (Felix, 1982 y Vaara, 1992). Además, los efectos negativos también pudieron ser debidos a una disminución del pH intracelular por las concentraciones tan elevadas de ácido láctico no disociado o a una salida del lipopolisacárido y otros componentes de la ME, o incluso a que se intercalara en la ME, lo que desestabiliza la integridad celular (Alakomi *et al.*, 2000).

Los ensayos de fluorescencia con NPN, tras el tratamiento con EDTA o ácido láctico de *E. coli* O44 K74, revelan que se produjo una saturación en la incorporación de NPN a partir de una concentración de 1 mM. Los mayores valores de fluorescencia se obtuvieron con EDTA. Por el contrario, el tratamiento con ácido láctico condujo a una menor alteración celular (Figura 4.2B).



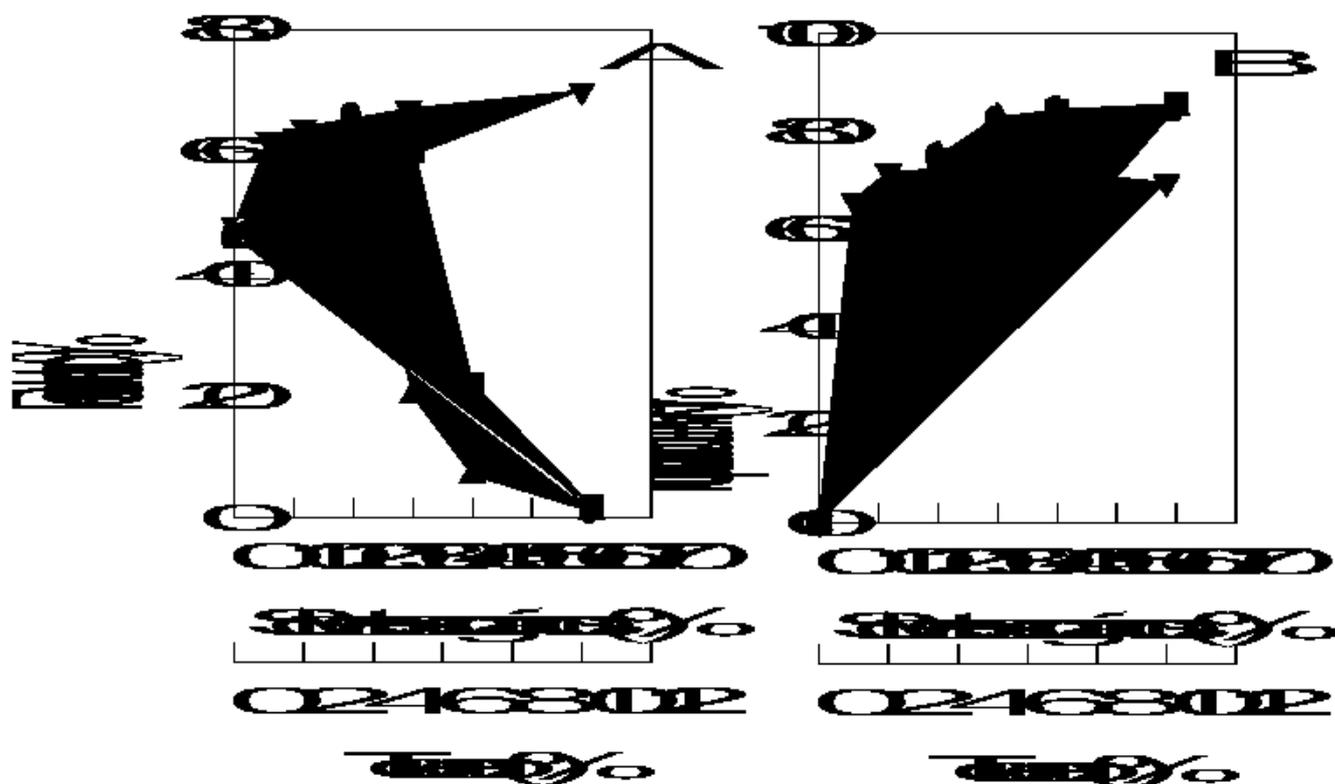
**Figura 4.2.** Efecto del EDTA y ácido láctico en: A) El rendimiento de L(-)-carnitina en la biotransformación de crotonobetaina 500 mM con *E. coli* O44 K74, utilizando EDTA (λ) y ácido láctico (v) a diferentes concentraciones. B) La incorporación de NPN en células permeabilizadas respecto a las células no tratadas.

Una vez seleccionadas la concentraciones idóneas de EDTA y ácido láctico (5 mM), se llevó a cabo la biotransformación de crotonobetaina 500 mM con *E. coli* K38 pT7-5 KE32. Se obtuvieron unos rendimientos en L(-)-carnitina de 68 y 70 %, para cada agente permeabilizante respectivamente (10-15% de incremento respecto del control). Por otro lado, no se observaron diferencias entre el control y las células permeabilizadas usando D(+)-carnitina como sustrato de biotransformación y ambas cepas de *E. coli*. Este hecho pudo ser debido probablemente a una limitación difusional de la D(+)-carnitina respecto a lacrotonobetaina al interior celular por parte de la membrana plasmática externa y la membrana celular. También, se pudo deber a que el paso de la D(+)-carnitina al interior celular estuviera limitado exclusivamente por la membrana plasmática y que la permeabilización celular no afecta a su entrada al interior

celular. En este caso, el ácido láctico fue más efectivo que el EDTA, lo que provocó una disminución de la limitación de la barrera difusional impuesta por la existencia de ME y la pared celular, y la biotransformación fue mejorada con respecto a los ensayos control en un 15 y 25 %, respectivamente, para ambas cepas.

#### 4.2.3. Biotransformación con células permeabilizadas por solventes orgánicos.

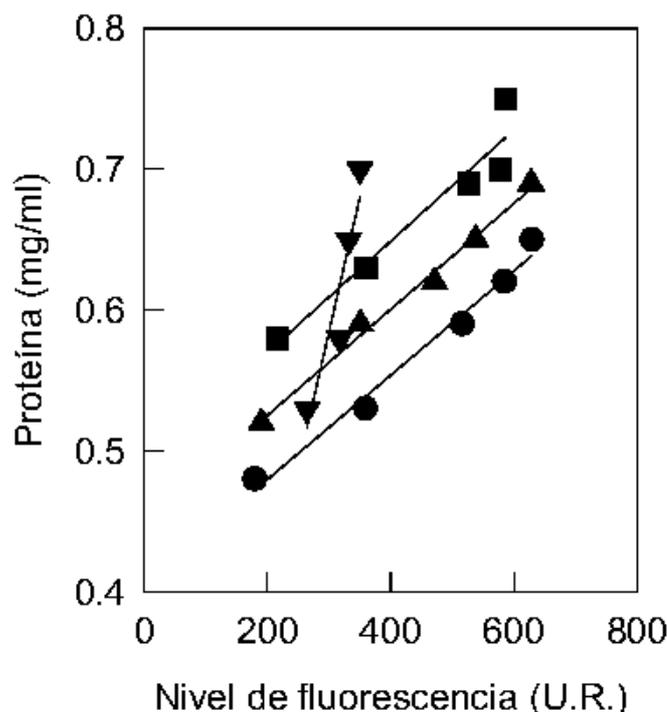
Los procesos de permeabilización con solventes orgánicos se llevaron a cabo usando diferentes porcentajes: 10, 20, 30, 40, y 60 % para el etanol, alcohol isopropílico y acetona, y 1, 2, 5 y 10% para el tolueno, respectivamente. Los resultados obtenidos con *E. coli* O44 K74 como biocatalizador y crotonobetaina 500 mM como sustrato se presentan en la Figura 4.3A. Como se puede observar, se produjo un incremento en el rendimiento en L(-)-carnitina con concentraciones superiores al 20% para el etanol, el alcohol isopropílico y la acetona y 2% para el tolueno, llegando a alcanzar para todos ellos un 62-66% en el rendimiento de la biotransformación. Sin embargo, a concentraciones superiores de solventes orgánicos, el rendimiento de la biotransformación disminuyó drásticamente. Estos resultados negativos a altas concentraciones de solventes orgánicos pudieron ser debidos probablemente a un daño celular y/o a la inactivación de las enzimas que intervienen en el proceso de biotransformación y/o incluso a un daño en el transportador dependiente de energía para crotonobetaina y otras betainas en las células de *E. coli* (Jung *et al.*, 1990). También, a altas concentraciones de solventes orgánicos se produjo una disminución importante en la viabilidad celular (80% UFC/ml). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos con células de levaduras de *Kluyveromyces lactis* permeabilizadas con diferentes solventes orgánicos (Flores *et al.*, 1994) y en células recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* permeabilizadas con alcoholes (metanol, etanol y alcohol isopropílico) (Liu *et al.*, 1999). Es de resaltar que el tratamiento con tolueno, permitió alcanzar una conversión del 62%, incluso a altas concentraciones del mismo (10%). Otros autores, obtuvieron con células de *Gluconobacter suboxydans* inmovilizadas y permeabilizadas con tolueno al 10% una alta eficiencia y conversión relativa en la oxidación de D-sorbitol a L-sorbosa (Park *et al.*, 1994).



**Figura 4.3.** Efecto de solventes orgánicos en: A) el rendimiento de L(-)-camitina con células permeabilizadas de *E. coli* O44 K7 a 4°C durante 10 min de tiempo de exposición. B) La incorporación de NPN en células permeabilizadas respecto a las células no tratadas (control). Etanol ( $\lambda$ ), alcohol isopropílico ( $\nu$ ), acetona ( $\sigma$ ) y tolueno ( $\tau$ ).

Por otro lado, la adición de NPN a las suspensiones celulares ocasionó un aumento en la fluorescencia al incrementar la concentración de solventes orgánicos (Figura 4.3B). La permeabilización con tolueno tuvo como resultado una saturación de captación de NPN a partir de una concentración del 2%. No obstante, al aumentar la concentración de solventes orgánicos, la captación de NPN fue paralela a la salida de proteína y a la disminución en el rendimiento de la biotransformación.

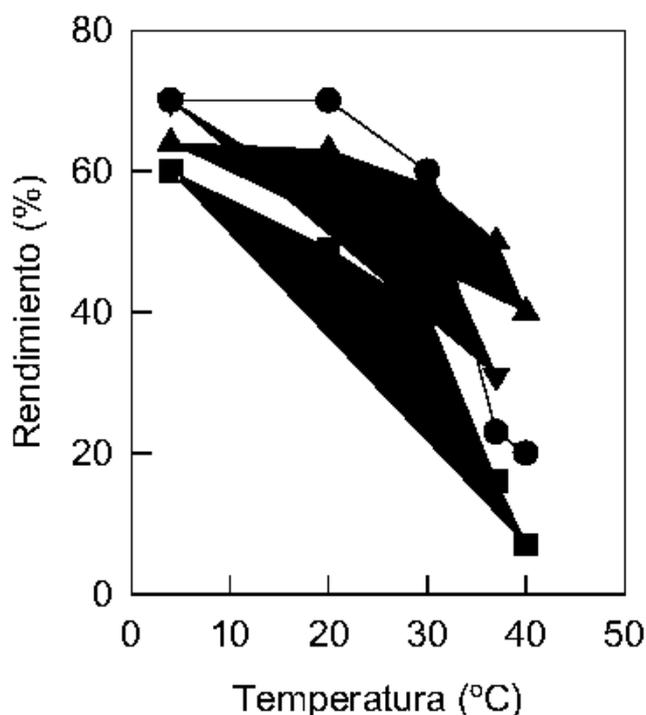
Así, en la Figura 4.4, se puede observar la relación lineal existente entre la salida de proteína del interior celular y la incorporación de NPN después del tratamiento de permeabilización con solventes orgánicos. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que se produjo un daño celular irreparable a altas concentraciones de solventes orgánicos, siendo probablemente la causa de la disminución del rendimiento de biotransformación.



**Figura 4.4.** Relación entre la salida de proteína después de la permeabilización y la incorporación de NPN en *E. coli* O44 K74, durante 10 min, a 4°C, al utilizar etanol ( $\lambda$ ), alcohol isopropílico ( $\nu$ ), acetona ( $\sigma$ ) al 10, 20, 30, 40, y 60 % y tolueno ( $\tau$ ) al 1, 2, 5 y 10%, como agentes permeabilizantes.

Por otro lado, se estudió el efecto de la temperatura sobre el proceso de permeabilización. La Figura 4.5, muestra el efecto de diferentes temperaturas sobre células de *E. coli* O44 K74, utilizando 20% de etanol, alcohol isopropílico y acetona y un 2% de tolueno como permeabilizadores (concentraciones seleccionadas anteriormente) y 10 min de incubación. Al aumentar la temperatura, se produjo una salida de proteína paralela a la captación de NPN, coincidiendo con una disminución del rendimiento de la biotransformación (Figura 4.5), probablemente debido a un daño en la integridad celular. Estos resultados coinciden con los obtenidos a partir de otras

bacterias gram negativas (Alakomi *et al.*, 2000) y con levaduras (Flores *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999).

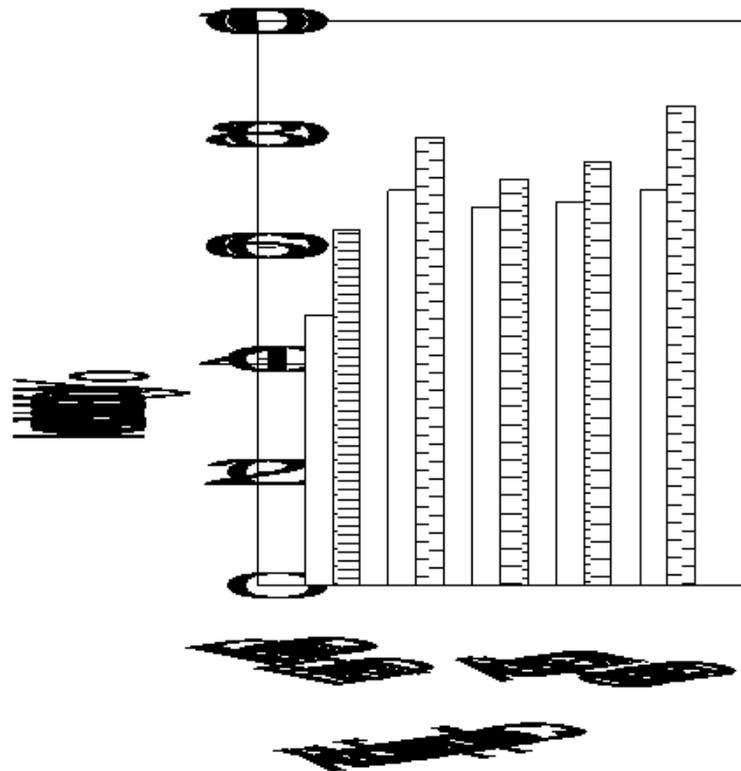


**Figura 4.5.** Efecto de la temperatura en la permeabilización de *E. coli* O44 K74 durante 10 min con etanol al 20% (λ), alcohol isopropílico al 20% (ν), acetona al 20% (σ) y tolueno al 2% (τ).

Por otro lado, se ensayó el efecto de los solventes orgánicos a tres tiempos diferentes de exposición 10, 20 y 30 min, respectivamente bajo las condiciones de concentración y temperatura anteriormente descritas como óptimas. Se observó un incremento en el rendimiento en L(-)-carnitina cuando el tiempo de tratamiento aumentó a 20 min para etanol, alcohol isopropílico y acetona y 10 min para tolueno, sin embargo, con tratamientos más largos se produjo un efecto negativo.

Las condiciones óptimas de permeabilización celular con solventes orgánicos se consiguieron tratando las células a una temperatura de 4°C con etanol, alcohol isopropílico y acetona al 20% durante 20 min y con tolueno al 2%, 10 min. Los valores obtenidos de biotransformación de crotonobetaina con *E. coli* O44 K74 fueron del 70, 65, 66 y 67%, respectivamente. Estos resultados suponen un aumento en la

biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina respecto del control (45%) (Figura 4.6). También se llevó a cabo la biotransformación de crotonobetaina con células transformadas de *E. coli* K38 pT7-5 KE32 bajo las condiciones óptimas de trabajo con *E. coli* O44 K74. Los resultados quedan reflejados en la misma Figura 4.6.

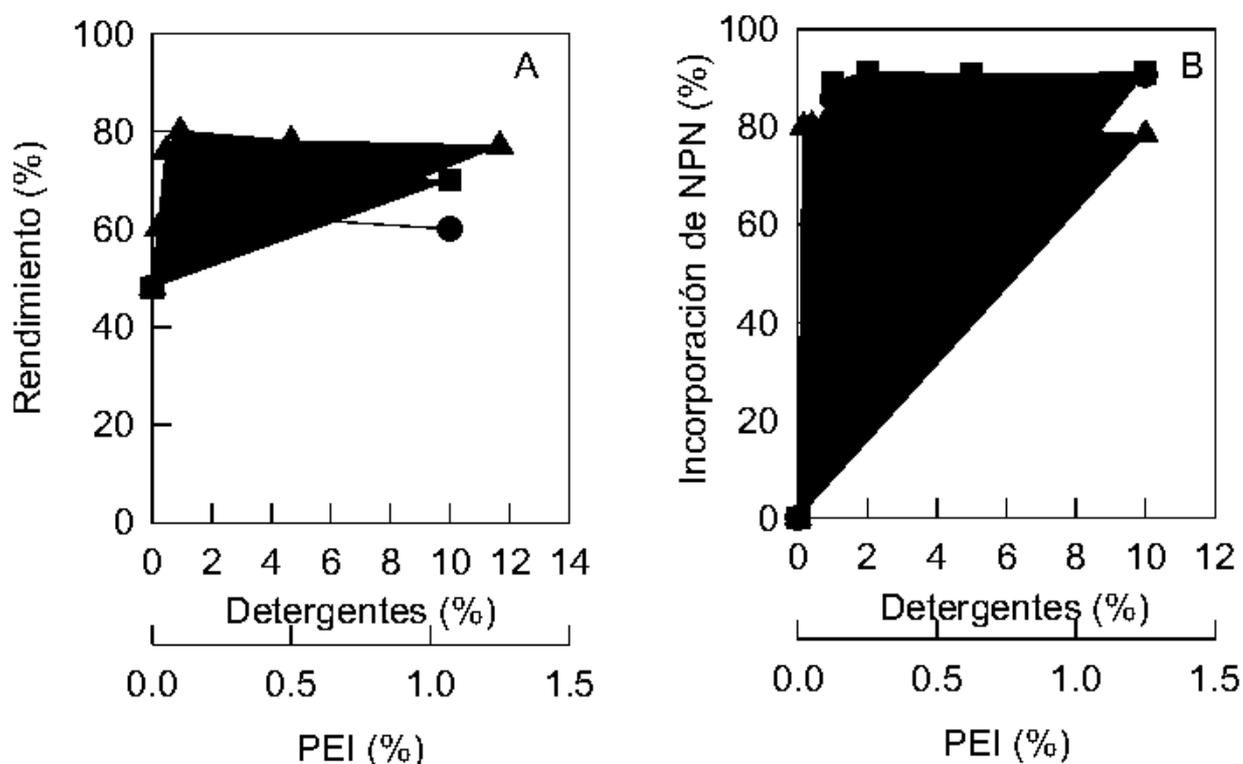


**Figura 4.6.** Comparación de los rendimientos en L(-)-carnitina con células durmientes de *E. coli* O44 K74 (barras blancas) y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 (barras rayadas). Las células fueron permeabilizadas con solventes orgánicos a 4°C, durante 20 min con etanol, alcohol isopropílico, acetona (20%) y 10 min con tolueno (2%).

Como se puede apreciar, se produjo un incremento en la producción de L(-)-carnitina con respecto a *E. coli* O44 K74, alcanzando unos rendimientos del 80, 75, 75 y 85% para etanol, alcohol isopropílico, acetona y tolueno, respectivamente. Sin embargo, usando D(+)-carnitina como sustrato no se observaron diferencias apreciables respecto al control de ambas cepas.

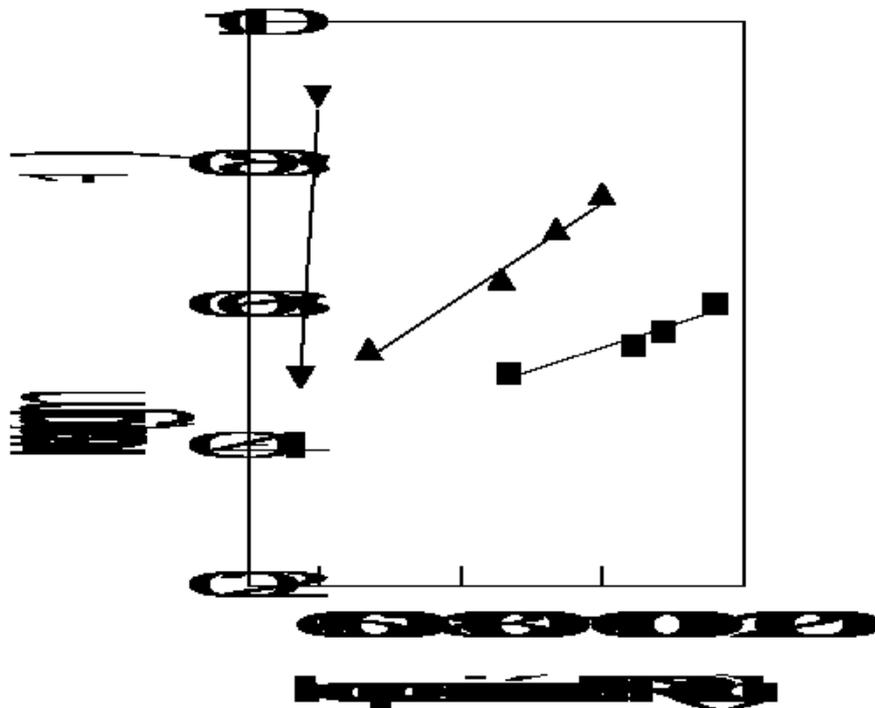
#### 4.2.4. Biotransformación con células permeabilizadas con polietilenimina y los detergentes Triton X-100 y Tween 20.

La permeabilización celular también se ensayó en presencia de diferentes concentraciones de Triton X-100 o Tween 20 al 1, 2, 5 y 10% y PEI al 0,02, 0,05, 0,02, 0,05 y 1,25%, respectivamente. Los ensayos de permeabilización se realizaron a 4°C, durante 10 min, según se describe en Materiales y métodos. Los rendimientos de la biotransformación de crotonobetaina 500 mM con células de *E. coli* O44 K74 se presentan en la Figura 4.7A.



**Figura 4.7.** Efecto de la PEI y los detergentes en : A) El rendimiento en L(-)-camitina con células permeabilizadas de *E. coli* O44 K74 tratadas durante 10 min a 4°C. B) La incorporación de NPN en células permeabilizadas respecto a las células no tratadas (control). Triton X-100 ( $\lambda$ ), Tween 20 ( $\nu$ ), PEI ( $\sigma$ )

Como se puede apreciar, se produjo un incremento en el rendimiento cuando las concentraciones de detergentes llegaron hasta 2% para Triton X-100 y Tween 20 y de un 0.1% para PEI, alcanzando unos valores entre el 75-80%. Este efecto beneficioso sobre la biotransformación coincide con los resultados de Galabova *et al.*, (1996), que mediante un incremento en la concentración de Triton X-100 lograron aumentar las actividades de las enzimas fosfatasa alcalina y ácida en levaduras, hasta llegar a una concentración del detergente de 0,1-0,2%. Al sobrepasar ésta concentración obtuvieron un descenso significativo en las actividades enzimáticas.



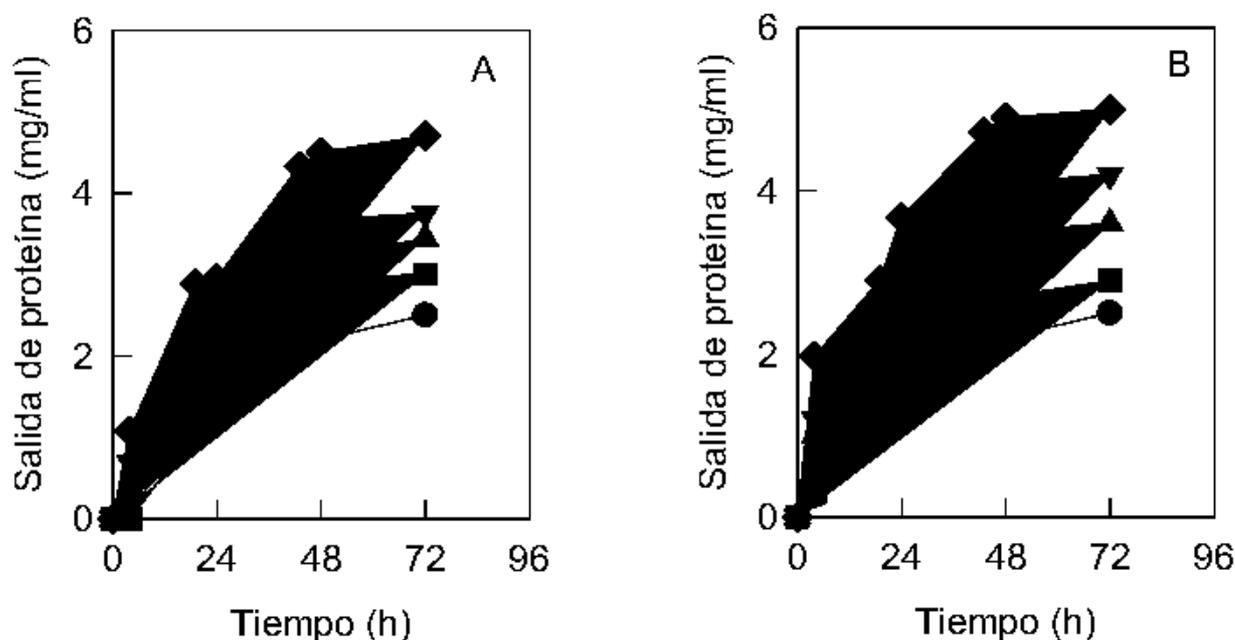
**Figura 4.8.** Relación entre la salida de proteína y la incorporación de NPN en *E. coli* O44 K74, al utilizar diferentes concentraciones de detergentes y PEI durante 10 min a 37°C. Triton X 100 (σ), Tween 20 (ν) y PEI (τ).

Por otro lado, al adicionar NPN a la suspensión celular siempre se observó un incremento de la fluorescencia, alcanzando una saturación en el óptimo de porcentaje del permeabilizante utilizado en el ensayo de permeabilización (Figura 4.7B). El uso de la PEI produjo una salida de proteína y una baja incorporación de NPN, mientras que el de Triton X-100 y Tween 20 presentaron grandes valores de fluorescencia y una menor

salida de proteína. No obstante, la entrada de NPN y los valores de biotransformación sugieren que la PEI causó un menor daño celular que los detergentes (Figura 4.8). También, como se puede apreciar en esta Figura, se obtuvo una relación lineal entre la salida de proteína del interior celular y la incorporación de NPN (fluorescencia) durante la permeabilización con los diferentes agentes permeabilizadores ensayados.

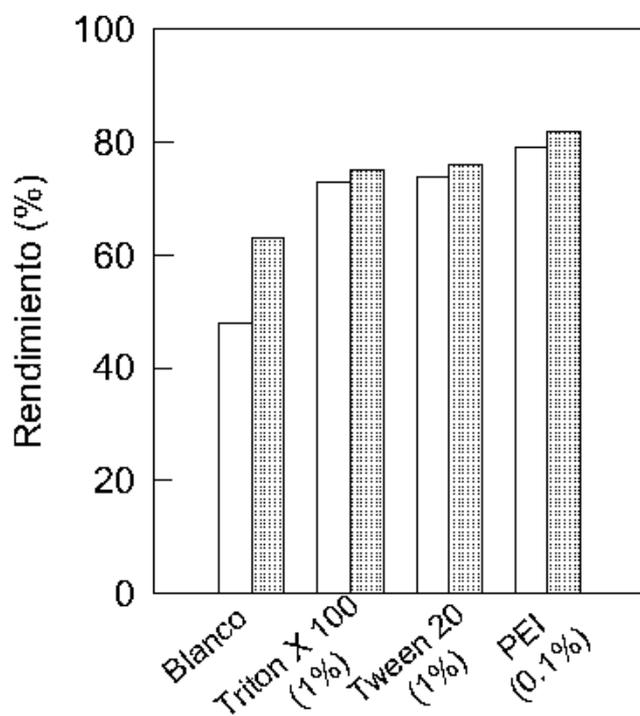
Por otro lado, también se estudió el efecto de la temperatura sobre la permeabilización de *E. coli* O44 K74 con los detergentes y la PEI, a las concentraciones óptimas y durante 10 min de tratamiento. Así, se observó un incremento significativo en el rendimiento de todos los sistemas ensayados con el aumento de la temperatura de incubación. Sin embargo, los niveles de biotransformación disminuyeron a 40°C, probablemente consecuencia de una desnaturalización parcial de las enzimas implicadas en el proceso ya que éstas actúan a 37°C (Jung *et al.*, 1989). Además, al aumentar la temperatura y el tiempo de exposición a estos agentes permeabilizantes, no se observaron cambios significativos ni en la biotransformación, ni en la incorporación de NPN. Los resultados obtenidos coincidieron con los referenciados en la bibliografía, en los que se muestra que la temperatura también afectó a la permeabilización (Lalitha *et al.*, 1991; Flores *et al.*, 1994; Upadhy *et al.*, 1999). Sin embargo, el tratamiento con los detergentes y la PEI condujo a un incremento de salida de proteína tras la exposición de los agentes permeabilizantes a concentraciones crecientes, con respecto a un aumento en los niveles de NPN. En todos los casos se produjo una relación lineal entre ambos parámetros, tal y como queda reflejada en la Figura 4.8. Este comportamiento lineal entre la salida de proteína y el aumento de fluorescencia es similar con el observado al utilizar solventes orgánicos.

El daño celular generado se determinó mediante la salida de proteína a lo largo de la biotransformación después de someter las células a diferentes concentraciones de detergentes y PEI, durante 10 min y a 37°C. Los resultados obtenidos al utilizar Tween 20 y PEI se presentan en la Figura 4.9. Los resultados con Triton X-100 no se presentan al ser muy análogos a los obtenidos con Tween 20. Como se puede apreciar, se produjo un incremento en la salida de proteína paralelo al aumento de la concentración de agente permeabilizador, siguiendo una cinética de saturación. El daño celular observado durante la biotransformación fue debido probablemente a que las células en estado durmiente estuvieron sometidas a un gran estrés celular lo que pudo producir su rotura y la salida de proteína al medio exterior.



**Figura 4.9.** Salida de la proteína celular de *E. coli* O44 K74 durante la biotransformación de crotonobetaina tras la permeabilización con distintas concentraciones de Tween (A), 0 ( $\lambda$ ), 1% ( $\nu$ ), 2% ( $\sigma$ ), 5% ( $\tau$ ) y 10% ( $\upsilon$ ) y de PEI (B), 0 ( $\lambda$ ), 0,02% ( $\nu$ ), 0,1% ( $\sigma$ ), 0,5% ( $\tau$ ) y 1,25% ( $\upsilon$ ) durante 10 min y 37°C.

Por otro lado, también se analizó el efecto de la permeabilización en la biotransformación de crotonobetaina con células transformadas de *E. coli* K38 pT7-5 KE32, bajo las mismas condiciones óptimas de experimentación realizadas con *E. coli* O44 K74. Los resultados quedan reflejados en la Figura 4.10. Como se puede apreciar, se observó un incremento significativo en el rendimiento de L(-)-carnitina con respecto a la cepa silvestre, llegando a alcanzar con Triton X-100, Tween 20 y PEI, el 78, 79, y 88%, respectivamente. Ello supuso un aumento de un 10% de rendimiento con respecto a la cepa silvestre. Estos resultados mejoraron los obtenidos con el uso de solventes orgánicos como permeabilizadores.

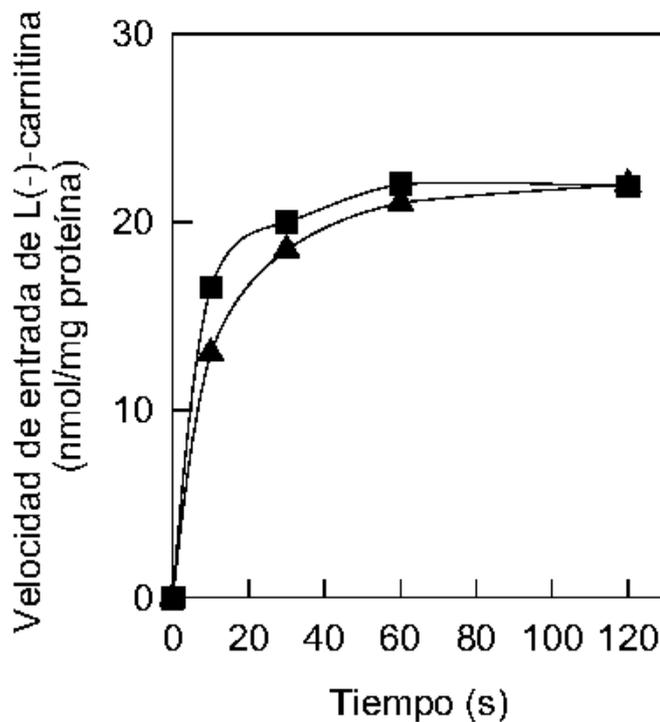


**Figura 4.10.** Comparación de los rendimientos en L(-)-carnitina con células permeabilizadas de *E. coli* O44 K74 (barras blancas) y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 (barras rayadas) con detergentes y PEI, durante 10 min, a 37°C.

#### 4.2.5. Efecto de los detergentes y la polietilenimina en el transporte de L[*N*-metil<sup>14</sup>C]carnitina y en la estructura bacteriana.

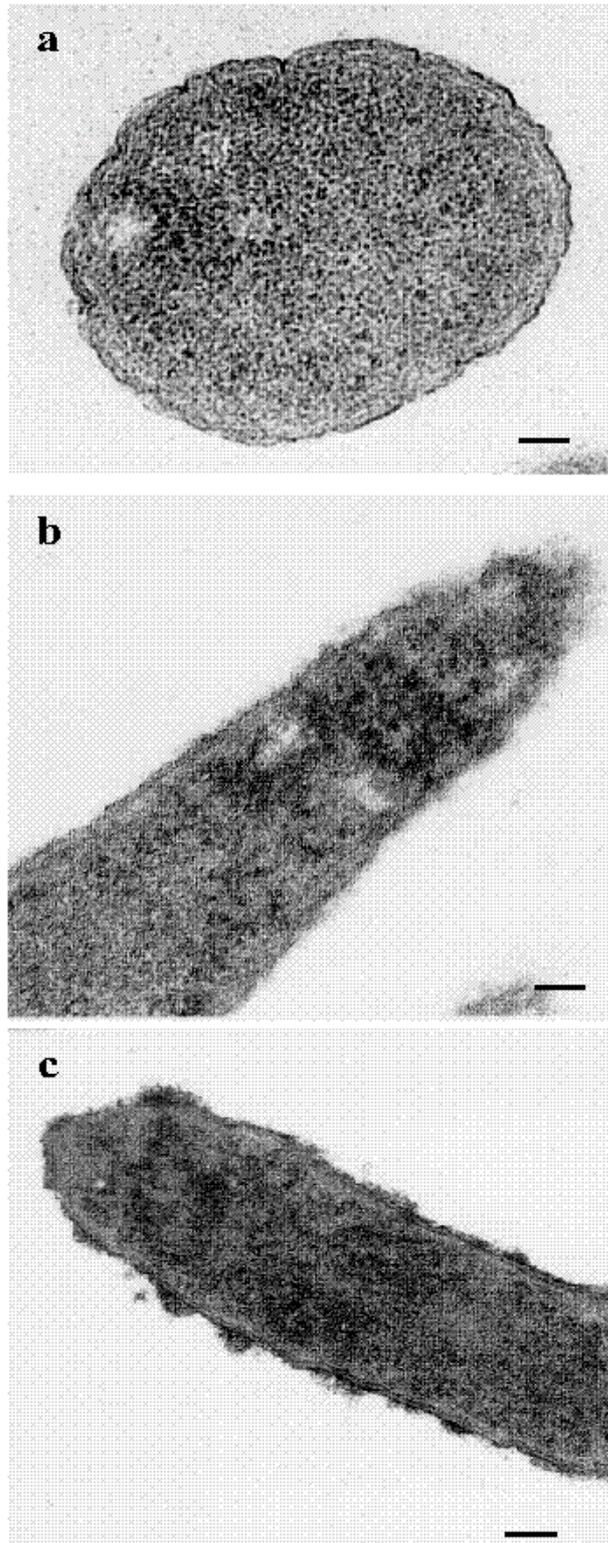
Con el fin de determinar el efecto de la permeabilización sobre los transportadores de compuestos de trimetilamonio, se realizaron ensayos de transporte con L[*N*-metil<sup>14</sup>C]carnitina. Los resultados demostraron que el transportador CaiT no se afectó por el tratamiento de permeabilización (Figura 4.12), debido a que los resultados obtenidos de las velocidades de transporte con las células permeabilizadas fueron muy parecidos a los de las células control.

Dado que en los procesos de permeabilización se produjo una liberación de proteínas, se decidió estudiar el efecto generado por los detergentes y la PEI sobre la estructura de *E. coli* O44 K74, mediante la microscopía electrónica de transmisión. Los resultados se representan en la Figura 4.13.



**Figura 4.12.** Ensayos de transporte de L[*N*-metil<sup>14</sup>C]carnitina con células de *E. coli* O44 K74 tratadas con PEI 0,1% (v) y sin tratar (σ). Los ensayos se realizaron con 20 μM de L[*N*-metil<sup>14</sup>C]carnitina (5,6 mCi/mmol).

Como se puede observar, las células control (no tratadas) presentaron una superficie celular íntegra, sin daño aparente en las membranas y la pared celular, su forma fue redondeada y la superficie celular lisa (Figura 4.11A). Por el contrario, las células tratadas con detergentes y PEI, presentaron alteraciones en la superficie celular, con una desintegración de la membrana externa y de la pared celular, lo que provocó un cambio a una forma más alargada de la bacteria, debido probablemente a una pérdida de la integridad celular (Figura 4.11 B y C). Además, al tratar las células con PEI se produjo una ondulación de la membrana (Figura 4.11 C). Sin embargo, la membrana citoplasmática no pareció verse afectada aparentemente por el tratamiento de los agentes permeabilizadores, al menos a la resolución de microscopio electrónico.



**Figura 4.13.** Envoltura celular de *E. coli* O44 K74 control (A), Tween 20 (B) (2%) y PEI (C) (0,12%) a 37°C durante 20 min. La longitud de las barras expresadas en el margen inferior derecha de cada fotografía corresponde de A-C a  $3 \times 10^{-2}$ ,  $7 \times 10^{-2}$  y  $3 \times 10^{-2} \mu\text{m}$ , respectivamente.

### 4.3. Conclusiones.

1. La permeabilización celular logró mejorar el rendimiento de la biotransformación usando crotonobetaina como sustrato, sin embargo no afectó a la de D(+)-carnitina. La permeabilización celular dependió de la concentración del permeabilizante, la temperatura y el tiempo del tratamiento.
2. Los mejores resultados de biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina se consiguieron mediante la permeabilización de células de *E. coli* O44 K74 con los detergentes Triton X-100 y Tween 20 a una concentración de 1% y con PEI a una concentración del 0,1%, durante 10 min a 37°C. Estos resultados se mejoraron con el uso de la cepa transformada *E. coli* K38 pT7-5 KE32.
3. Existe una relación lineal entre la salida de proteína de la célula y la incorporación de NPN (fluorescencia), durante la permeabilización con diferentes agentes permeabilizantes, indicando que el ensayo fue adecuado para medir la integridad celular.
4. El microscopio electrónico de transmisión reveló que las células tratadas con detergentes y PEI causaron alteraciones en la membrana y pared celular.
5. El ensayo de transporte con L[*N*-metil <sup>14</sup>C]carnitina sobre *E. coli* después de su exposición a PEI, indicó que los transportadores de los compuestos trimetilamonio no se vieron afectados por la acción del permeabilizante.

## 5.1. Introducción.

En el metabolismo de *E. coli*, al igual que ocurre en cualquier otro organismo, se puede diferenciar entre un metabolismo primario y un metabolismo secundario. Mediante el metabolismo primario o central se combinan rutas metabólicas complejas destinadas al crecimiento y la reproducción celular. Una de ellas es la glicólisis, a través de la cual la glucosa se transforma a piruvato y éste a su vez por medio del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) da lugar a acetil CoA durante el crecimiento aeróbico (Knappe y Sawers, 1990) (Figura 5.1). En cambio, bajo condiciones anaerobias la enzima piruvato formiato liasa cataliza el paso de piruvato a formiato (Quail *et al.*, 1994; Kaiser y Sawers, 1994). Además, el glicerol proveniente del metabolismo lipídico puede incorporarse también a la glicólisis en forma de gliceraldehído 3-fosfato. El complejo PDH está formado por tres subunidades: piruvato deshidrogenasa (E1p), dihidrolipoil acetiltransferasa (E2p) y dihidrolipoil deshidrogenasa (E3) y su síntesis está controlada a nivel transcripcional por un autorregulador llamado PdhR, que responde a las concentraciones de piruvato y se une inmediatamente detrás del promotor del operón *pdh*, que reprime su transcripción en ausencia de éste (Quail y Guest, 1995). Este complejo también está regulado a nivel enzimático entre otros factores por acetil-CoA (Schwartz y Reed, 1970), la subunidad E3 por NADH (Snoep *et al.*, 1993), pH y la relación NADH/NAD<sup>+</sup> (Cassey *et al.*, 1998).

Además, el acetil-CoA es sintetizado a partir de acetato por medio de las enzimas acetato quinasa (ACK) (EC 2.7.2.1) y fosfotransacetilasa (FTA) (EC 2.3.1.8), que actúan de manera reversible dando como intermedio acetil fosfato. Esta ruta, llamada ACK-FTA, se expresa de manera constitutiva en la célula y presenta baja afinidad por el sustrato (Kumari *et al.*, 1995). Por otro lado, el acetato excretado por la célula proveniente del metabolismo aerobio, es reutilizado en condiciones de agotamiento de otras fuentes carbonadas, para sintetizar acetil-CoA por medio de la enzima acetil CoA sintetasa (ACS) (EC 6.2.1.1) (Figura 5.1). Esta ruta de producción de acetil-CoA es irreversible, reprimible por catabolitos, inducible por acetato y presenta alta afinidad por el sustrato (Brown *et al.*, 1977). Además, la enzima ACS está codificada por un gen *acs* que ha sido clonado y caracterizado (Kumari *et al.*, 1995) y se induce con la subida de los niveles de AMPc, proteína receptora de AMPc, Factor regulador del operón *cai* bajo anaerobiosis (FNR), factor principal responsable de la transcripción de *acs* ( $p^{70}$ ) y la caída de la presión parcial de oxígeno (Wei *et al.*, 2000;

Kumari *et al.*, 2000a y 2000b), mientras que se reprime por los reguladores transcripcionales  $\sigma^S$  y RpoS (Shin, 1997).

El acetil-CoA es un importante intermedio metabólico capaz de almacenar energía de las rutas metabólicas y de servir de sustrato para la producción enzimática de compuestos útiles como ésteres y moléculas lipídicas. Es posible manipular las concentraciones intracelulares de CoA y acetil-CoA mediante el uso de diferentes fuentes carbonadas, con el aumento de la temperatura de crecimiento y mediante estrés osmótico (Chonan *et al.*, 1998). Además, recientemente se ha demostrado que es posible la manipulación de los niveles de CoA mediante la sobreexpresión de la enzima pantotenato quinasa (San *et al.*, 2002).

El acetil-CoA formado puede incorporarse al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs generando poder reductor, fundamentalmente en forma de NADH, que en condiciones aerobias es reoxidado a  $\text{NAD}^+$  por la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, obteniendo por un lado energía en forma de ATP y por otro el balance redox necesario para el correcto funcionamiento celular. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos está controlado por la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) que reduce el  $\text{NADP}^+$  a NADPH y transforma el isocitrato en  $\alpha$ -cetoglutarato (Figura 5.1). Por otro lado, la enzima está a su vez regulada por fosforilación reversible, catalizada por la enzima isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa (El-Mansi, 1998). Asociado a este ciclo, se encuentra el ciclo del glioxilato, que realiza una desviación del flujo metabólico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, con objeto de permitir la conversión de acetil-CoA en oxalacetato. Las enzimas del ciclo del glioxilato son la isocitrato liasa (ICL) (EC 4.1.3.1) y la malato sintetasa (MS) (EC 4.1.3.2), ambas son sintetizadas cuando *E. coli* crece en presencia de acetato. Estas dos proteínas son codificadas por *aceA* y *aceB*, respectivamente y sus genes, junto a *aceK*, que codifica para la enzima ICDH, están juntos en el operón *aceBAK* cuya expresión está afectada por factores reguladores como el represor de ICL y el activador de ACS (IclR) y el regulador del metabolismo anaerobio/aerobio (ArcAB) (Cronan *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando *E. coli* crece en condiciones anaerobias, el consumo del poder reductor no se lleva a cabo por la cadena de transporte de electrones, sino por la fermentación ácido-mixta que reduce el piruvato a metabolitos de carácter ácido como son el lactato, succinato y formiato, dando como productos  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ , mientras que el acetil-CoA será transformado a acetato y etanol.

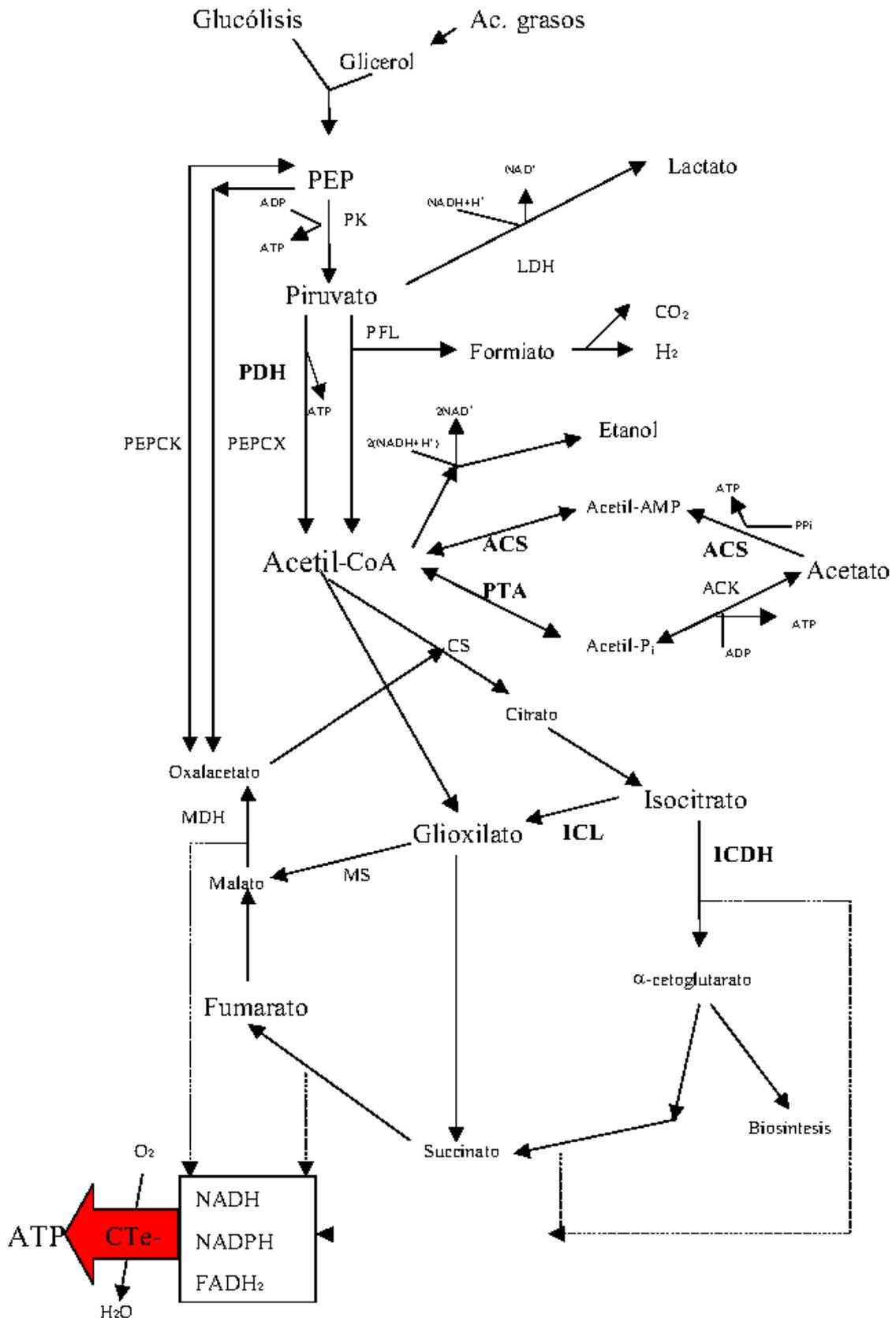


Figura 5.1. Metabolismo primario de *Escherichia coli*. (Base de datos de *E. coli*. ECOCYC-METACYC, EE.UU (Karp *et al.*, 2002)).

La Figura 5.1. representa el metabolismo primario de *E. coli* en el cual cada enzima o metabolito se corresponde con la siguiente abreviatura: **ACK**: acetato quinasa, **ACS**: acetyl-CoA sintetasa, **CS**: citrato sintetasa, **CTe<sup>-</sup>**: cadena de transporte de electrones, **ICDH**: isocitrato deshidrogenasa, **ICL**: isocitrato liasa, **LDH**: lactato deshidrogenasa, **MDH**: malato deshidrogenasa, **MS**: malato sintetasa, **PDH**: piruvato deshidrogenasa, **PEP**: fosfoenolpiruvato, **PEPCK**: PEP carboxiquinasa, **PEPCX**: PEP carboxilasa, **PFL**: piruvato formiato liasa, **PK**: piruvato quinasa, **FTA**: fosfotransacetilasa.

En este conjunto de reacciones, tanto en condiciones aerobias como en anaerobias, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> juega un papel importante en el catabolismo microbiano. Entre las funciones que tiene esta relación destacan la de regular las actividades enzimáticas (Garrigues *et al.*, 1997) y la expresión de genes (Leonardo *et al.*, 1996). Además, esta relación puede depender del nivel de oxidación de los sustratos disponibles (Vasconcelos *et al.*, 1994), o de la disponibilidad y naturaleza del aceptor de electrones (Czok y Lamprecht, 1974). También, la relación NADH/NAD<sup>+</sup> puede regularse mediante la sobreexpresión del sistema NADH oxidasa (Lopez de Felipe *et al.*, 1998), variando las condiciones de potencial de oxido-reducción (Riondet *et al.*, 2000), mediante el uso de diferentes fuentes de carbono (San *et al.*, 2002) o mediante la ingeniería genética, sobreexpresando el gen *pncB* que codifica la enzima nicotinamina fosforiltransferasa.

A través de todas estas rutas catabólicas del metabolismo primario de *E. coli*, se obtienen los componentes necesarios para la síntesis del material genético y estructural de la célula, proteínas, lípidos, etc, y la energía necesaria para llevar a cabo esta síntesis. Por otro lado, el metabolismo de camitina es un metabolismo secundario, dado que la célula no lo requiere para su proceso vital, a no ser que se someta a procesos de choques osmóticos (Kleber *et al.*, 1997). En el Capítulo 1, sección 1.1.2 de la presente Memoria, se presenta el metabolismo de camitina hasta donde se conoce (Figura 1.2). Además, el metabolismo primario también aporta los sustratos necesarios para el desarrollo del metabolismo secundario y la energía requerida en forma de ATP, que tal como se presenta en el Capítulo 3 es necesario para el transporte de crotonobetaina al interior celular a través del transportador (CaiT) y posiblemente necesario para la actividad del sistema crotonobetaina/ $\gamma$ -butirotobetaina-CoA ligasa (CaiC) (Figura 1.2), que sintetiza el cofactor necesario para que sea activo el metabolismo de los compuestos de trimetilamonio (Vessey y Kelley, 2001). También, la relación acetyl-CoA/CoA parece que sería necesaria para la activación de intermedios de la síntesis de L(-)-camitina en

*E. coli* por medio de la CoA transferasa (*caiB*), que en extractos celulares transfiere grupos CoA de manera reversible a crotonobetaina,  $\gamma$ -butirobetaina y L(-)-carnitina, activándolos para que sirvan de sustrato para las otras enzimas del metabolismo de carnitina (Elssner *et al.*, 2000; 2001) (Figura 1.2).

Con el fin de optimizar los bioprocesos llevados a cabo por células, es inevitablemente necesario descifrar y cuantificar los parámetros cinéticos y la estructura reguladora de las rutas metabólicas involucradas en ellos. Así, el estudio sobre el control y la regulación de las enzimas de vías metabólicas implicadas en la síntesis de metabolitos de interés farmacéutico, alimentario y otros ámbitos industriales, nos permite la redirección de estas rutas para la mayor productividad del proceso en estudio. Con la realización de estudios metabólicos, se identifican y seleccionan las dianas específicas para las actuaciones, a través de un campo emergente en la Bioquímica como es, la Ingeniería Metabólica, que modifican directamente las propiedades de las células, bien mediante la alteración de reacciones bioquímicas específicas o por introducción de nuevas reacciones usando la tecnología del ADN recombinante (Bailey, 1991). La combinación de los métodos analíticos, para la cuantificación de flujos y su control, con las técnicas de Biología Molecular para la modificación genética, son la esencia de la Ingeniería Metabólica (Stephanopoulos, 1998), para la optimización de bioprocesos.

Por todo lo anteriormente expuesto y con el fin de la optimización de la biotransformación, en este capítulo de la Memoria se presenta una primera aproximación al conocimiento de la unión entre el metabolismo central carbonado o metabolismo primario y el metabolismo secundario de los compuestos de trimetilamonio, que intervienen en la producción de L(-)-carnitina con células de *E. coli* tanto en crecimiento como en estado durmiente en reactores operados en discontinuo. Así, para conocer la cinética del bioproceso global y comprobar los puntos de unión de ambos metabolismos se midieron las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo central, concretamente del ciclo de Krebs (isocitrato deshidrogenasa), del ciclo del glioxilato (isocitrato liasa) y del metabolismo de la acetil-CoA (piruvato deshidrogenasa, acetil-CoA sintetasa, ATP: acetato fosfotransferasa y los niveles de acetil-CoA y HS-CoA). También, se analizó el estado energético celular durante la biotransformación, mediante la determinación de los niveles de ATP y el nivel del poder reductor en forma de NADH/NAD<sup>+</sup>. Además, se siguió la evolución del

metabolismo carbonado, midiendo los niveles de acetato, formiato, lactato, piruvato y fumarato. Respecto al metabolismo secundario, el estudio se completó con la caracterización del metabolismo de los compuestos de trimetilamonio, siguiendo las actividades de L(-)-carnitina deshidratasa y crotonobetaina reductasa durante la biotransformación de crotonobetaina en diferentes condiciones de crecimiento celular y en estado durmiente.

## 5.2. Resultados y discusión.

### 5.2.1. Metabolismo de *E. coli* O44K74 en cultivo en medio complejo anaerobio.

*E. coli* O44 K74 se cultivó en un reactor con el medio complejo descrito en el Capítulo de Materiales y métodos y en anaerobiosis a 37°C. La enzima ICL presentó una actividad alta, dando succinato y glioxilato, producto que es transformado por la enzima malato sintasa (MS) para producir malato en presencia de acetil-CoA. Así, la ICL duplicó su actividad específica en las primeras 15 horas de cultivo celular pasando de 15,8 a 28,9 mU·mg de prot.<sup>-1</sup>, para luego ir disminuyendo hasta niveles próximos a 9,0 mU·mg de prot.<sup>-1</sup> a las 72 horas (Figura 5.2A). Sin embargo, la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa (ICDH) no varió significativamente con el tiempo, manteniendo su actividad entre 43,9 y 53,2 mU·mg prot.<sup>-1</sup> (Figura 5.2A), actividad inferior a la observada en cultivos aerobios (84,1 mU·mg de prot.<sup>-1</sup>). Estos resultados, marcan la importancia del ciclo del glioxilato frente al ciclo de Krebs, pues estas dos enzimas, la ICL y ICDH, compiten por un mismo sustrato, existiendo un mayor flujo a través de la ICL. Los resultados están de acuerdo con Cronan y La Porte, 1996, que describen la existencia del operón *aceBAK*, que codifica para las enzimas del ciclo del glioxilato, (ICL: *aceA* y MS: *aceB*) y una tercera enzima ICDH-quinasa/fosfatasa (*aceK*) que realiza una modificación postranscripcional sobre ICDH, inactivándola y permitiendo una mejor competición de ICL frente a ICDH. Además, el ciclo del glioxilato se ha relacionado con el metabolismo del acetato, existiendo la proteína IcIR, que reprime la enzima ICL y otras como ACS (Shin *et al.*, 1997).

En cuanto al metabolismo relacionado con el acetil-CoA, la medida de actividad de las diferentes enzimas implicadas (PDH, ACS, FTA), indicó en primer lugar, que el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) no presentó prácticamente actividad (Figura 5.2B), pues es una enzima asociada al metabolismo aerobio (Knappe y Sawers, 1990).

De hecho, la producción de acetil-CoA puede provenir de la actividad de la enzima piruvato-formiato liasa (PFL), que produce en condiciones anaerobias acetil-CoA y formiato (Knappe y Sawers, 1990), del cual se observó una alta concentración ( $15 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en las primeras 5 horas de cultivo, que luego disminuyó hasta  $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a las 15 horas y a niveles de  $1,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a las 72 horas (Figura 5.2E). Este descenso puede ser debido a la metabolización del formiato a  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  por la enzima inducible formiato-hidrógeno liasa que se expresa en condiciones anaerobias y que es regulada por el sistema PhlA (Unden y Trageser, 1991).

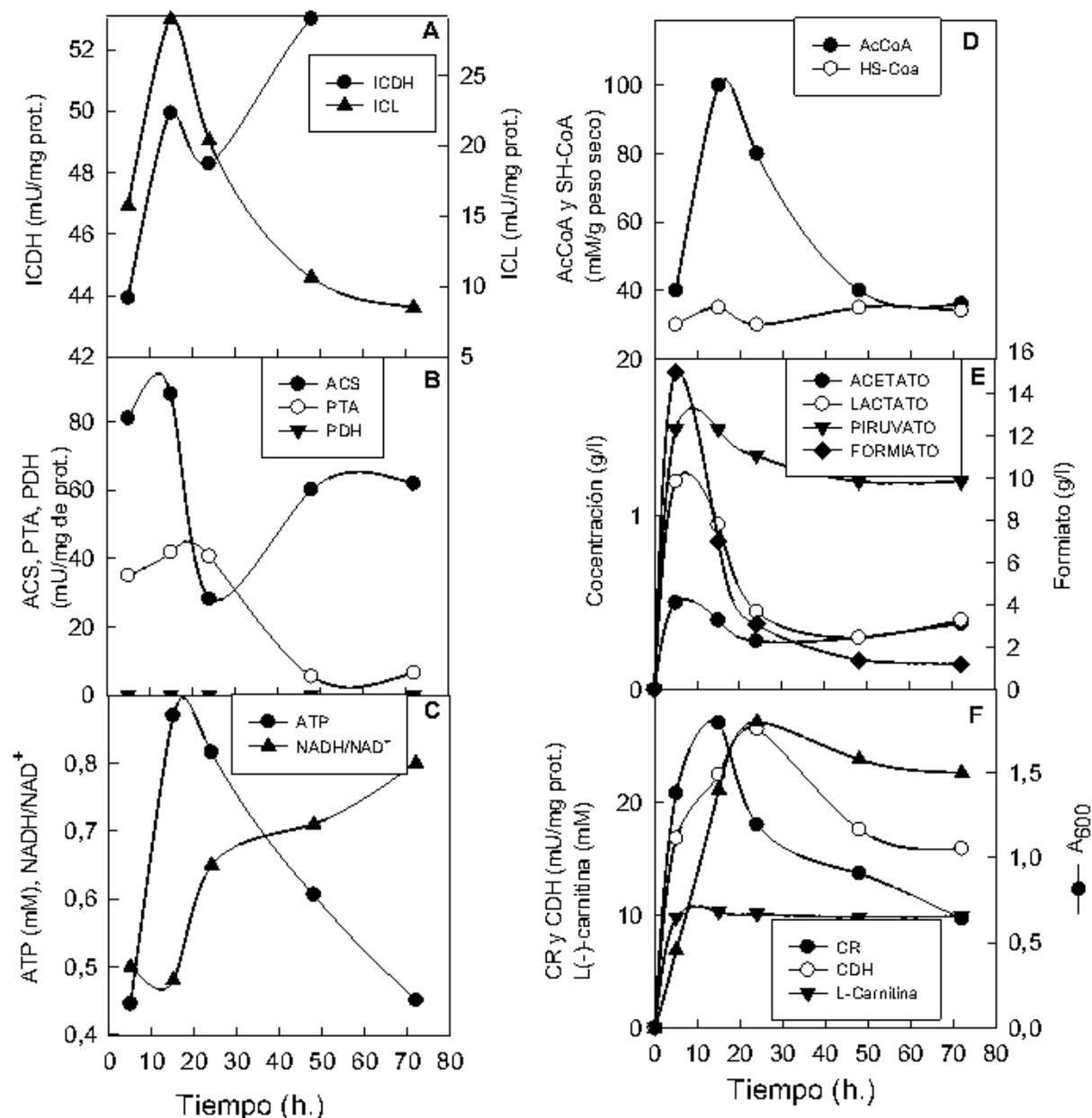
Las otras enzimas analizadas que están implicadas en el metabolismo del acetil-CoA fueron la fosfotransacetilasa (FTA) y la acetil CoA sintetasa (ACS). La primera tiene como sustrato el acetil-CoA y lo transforma en HS-CoA y acetil-fosfato, que a través de la actividad de la enzima acetato quinasa (ACK) se transforma en acetato y ATP (Kleman y Strohl, 1994). Los resultados obtenidos muestran que la FTA alcanzó la mayor actividad en las primeras 24 horas, con una actividad específica de  $41,7 \text{ mU}\cdot\text{mg}$  de  $\text{prot.}^{-1}$ , para disminuir hasta niveles de  $5,3 \text{ mU}\cdot\text{mg}$  de  $\text{prot.}^{-1}$  en las últimas 48 horas (Figura 5.2B). El ATP producido por la ACK alcanzó los mayores niveles de concentración ( $0,87 \text{ mM}$ ) en las primeras 15 horas a partir de las cuales disminuyeron progresivamente hasta la mitad a las 72 horas de crecimiento celular (Figura 5.2C). Por otro lado, el nivel de la ACS disminuyó 4 veces de las 15 a las 24 horas, para aumentar hasta  $60,1 \text{ mU}\cdot\text{mg}$  de  $\text{prot.}^{-1}$  en las últimas 48 horas. Este hecho, se vió acompañado por un aumento en los niveles de acetato en el medio de cultivo en las horas iniciales, sufriendo un pequeño descenso a partir de las 15 horas para mantenerse hasta las 72 horas. Este conjunto de resultados está de acuerdo con la bibliografía, que describe la producción de acetato asociado a la fase de crecimiento exponencial de *E. coli* por la ruta FTA-ACK, y un consumo del mismo al inicio de la transición hacia la fase estacionaria para ser activado a acetil-CoA por la enzima ACS (Kumari *et al.*, 2000a), y así obtener la energía y los compuestos biosintéticos necesarios durante las fases de crecimiento.

Las concentraciones de acetil-CoA y HS-CoA y su evolución también aportó información de la relación entre los metabolismos primario y de la L(-)-carnitina, pues el metabolismo de la L(-)-carnitina en *E. coli* depende de los niveles de estos dos metabolitos. Así, la evolución con el tiempo de cultivo del nivel de acetil-CoA es relacionable con las actividades enzimáticas de ACS, FTA y la posible actividad de PFL, mostrando un aumento de  $40 \text{ mM}$  hasta  $100 \text{ mM}$  en el periodo comprendido entre

las 5 y las 15 horas para descender hasta 40 mM a las 48 horas (Figura 5.2D). También se puede observar que el aumento de la concentración de acetil-CoA coincidió con una disminución de la actividad de ACS, que está sujeta a una regulación negativa por retroalimentación del acetil-CoA producto de la enzima (Kumari *et al.*, 2000a). Sin embargo, los niveles de HS-CoA se mantuvieron constantes en torno a 30 mM durante el ciclo de crecimiento de *E. coli*, lo cual indica que su consumo estuvo equilibrado con su producción y viceversa.

Respecto a los metabolitos relacionados con el poder reductor, en primer lugar, se analizó el lactato producido a partir de piruvato a través de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), que consume poder reductor en forma de NADH, regenerando NAD<sup>+</sup>. De los resultados obtenidos, se observó que en las primeras 15 horas, la concentración de lactato fue de 1,2 g·l<sup>-1</sup>, disminuyendo hasta 0,3 g·l<sup>-1</sup> hasta el final del cultivo (Figura 5.2E). Este hecho puede estar relacionado con los niveles de poder reductor, expresados por la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, que fue menor (0,48) en las primeras 15 horas y que aumentó progresivamente hasta alcanzar el mayor valor (0,8) a las 72 horas (Figura 5.2C). Es de destacar que el cociente NADH/NAD<sup>+</sup> también regula las enzimas PDH y PFL. Así un cociente bajo de NADH/NAD<sup>+</sup> indica menores niveles de poder reductor y una mayor actividad de la enzima PDH, mientras que un cociente elevado inactiva a la enzima PDH y activa a la enzima PFL (De Graef *et al.*, 1999). Este estudio confirma que en el metabolismo anaerobio el cociente NADH/NAD<sup>+</sup> fue mayor (0,48) que en condiciones aerobias (0,17) a las 15 horas de cultivo. Este hecho, justifica además el valor observado para la actividad media de PDH, que es una enzima relacionada con el metabolismo aerobio (Knappe y Sawers, 1990).

En cuanto al metabolismo secundario implicado en la biotransformación de crotonobetaina 50 mM en L(-)-camitina, se observó que la mayor producción de ésta se desarrolló en las primeras quince horas alcanzando una concentración de 10,3 mM. También fue en este periodo, cuando las enzimas implicadas en la biotransformación, con actividad camitina deshidratasa y crotonobetaina reductasa, alcanzaron su máximo nivel, llegando a valores de 26,5 y 27,0 mU·mg de prot.<sup>-1</sup> respectivamente, para disminuir progresivamente durante las últimas 48 horas (Figura 5.2F).



**Figura 5.2.** Evolución del metabolismo de *E. coli* O44 K74 en cultivo sobre un medio complejo anaerobio. Se muestran las actividades específicas de las enzimas: **A)** ICDH (isocitrato deshidrogenasa) e ICL (isocitrato liasa), **B)** ACS (acetil-CoA sintetasa), FTA (fosfotransacetilasa) y PDH (piruvato deshidrogenasa), **C):** concentración de ATP y cociente NADH/ NAD<sup>+</sup>, **D)** concentración de acetil-CoA y HS-CoA **E)** concentración de piruvato, lactato, acetato y formiato. y **F)** CR (crotonobetaina reductasa) y CDH (L(-)-carnitina deshidratasa).

Este análisis permite relacionar los dos metabolismos, e indica que las mejores condiciones para la biotransformación están asociadas a la fase de crecimiento exponencial, dentro de las primeras 24 horas donde existe una mayor producción de

energía, un poder reductor adecuado y mayores niveles de acetil-CoA. En el Capítulo 3 se demostró que el ATP es necesario para el transporte de crotonobetaina al interior celular a través del transportador (CaiT), además es posiblemente también necesario para la actividad de crotonobetaina/ $\gamma$ -butirobetaina-CoA ligasa (CaiC) (Vessey y Kelley, 2001), que sintetiza el cofactor requerido (Capítulo 1) para que sea activo el metabolismo de los compuestos de trimetilamonio.

Los resultados también indican la importancia del ciclo del glioxilato durante el crecimiento celular al expresarse la máxima actividad de la enzima ICL. Es a partir de las 24 horas cuando se entra en la fase estacionaria, manteniéndose la concentración de biomasa entorno a 1,8 unidades de  $A_{600}$  hasta las 72 horas (Figura 5.2F), lo cual confirma el final del crecimiento celular. Transcurridas las 24 horas el metabolismo celular sufre modificaciones y se adapta a unas condiciones en las que no existe un medio rico en nutrientes.

Así pues, se puede afirmar que la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina por *E. coli* O44 K74 en condiciones de crecimiento, está asociada a la fase de crecimiento exponencial y a unas condiciones favorables para la célula que le permite aportar energía y los metabolitos (acetil-CoA/HS-CoA) necesarios para la biotransformación. También se asocia a condiciones anaerobias donde la célula está sometida a una regulación positiva a nivel transcripcional.

### **5.2.2. Metabolismo de *E. coli* O44 K74 en la biotransformación de crotonobetaina y D(+)-carnitina con células en estado durmiente. Efecto del NaCl.**

En este apartado se analiza las biotransformaciones de crotonobetaina y D(+)-carnitina 500 mM en L(-)-carnitina, estudiadas en los Capítulos 2 y 3 de la presente Memoria, utilizando células crecidas en medio complejo anaerobio durante 15 horas e incubadas en tampón fosfato 67 mM y NaCl 0,5 M.

#### *5.2.2.1. Metabolismo de E. coli O44K74 en estado durmiente.*

En el medio de incubación control utilizado en este estudio, descrito en el apartado correspondiente del capítulo de Materiales y métodos, no existe ninguna fuente de carbono ni nitrógeno, es decir, los procesos metabólicos no se destinan a la

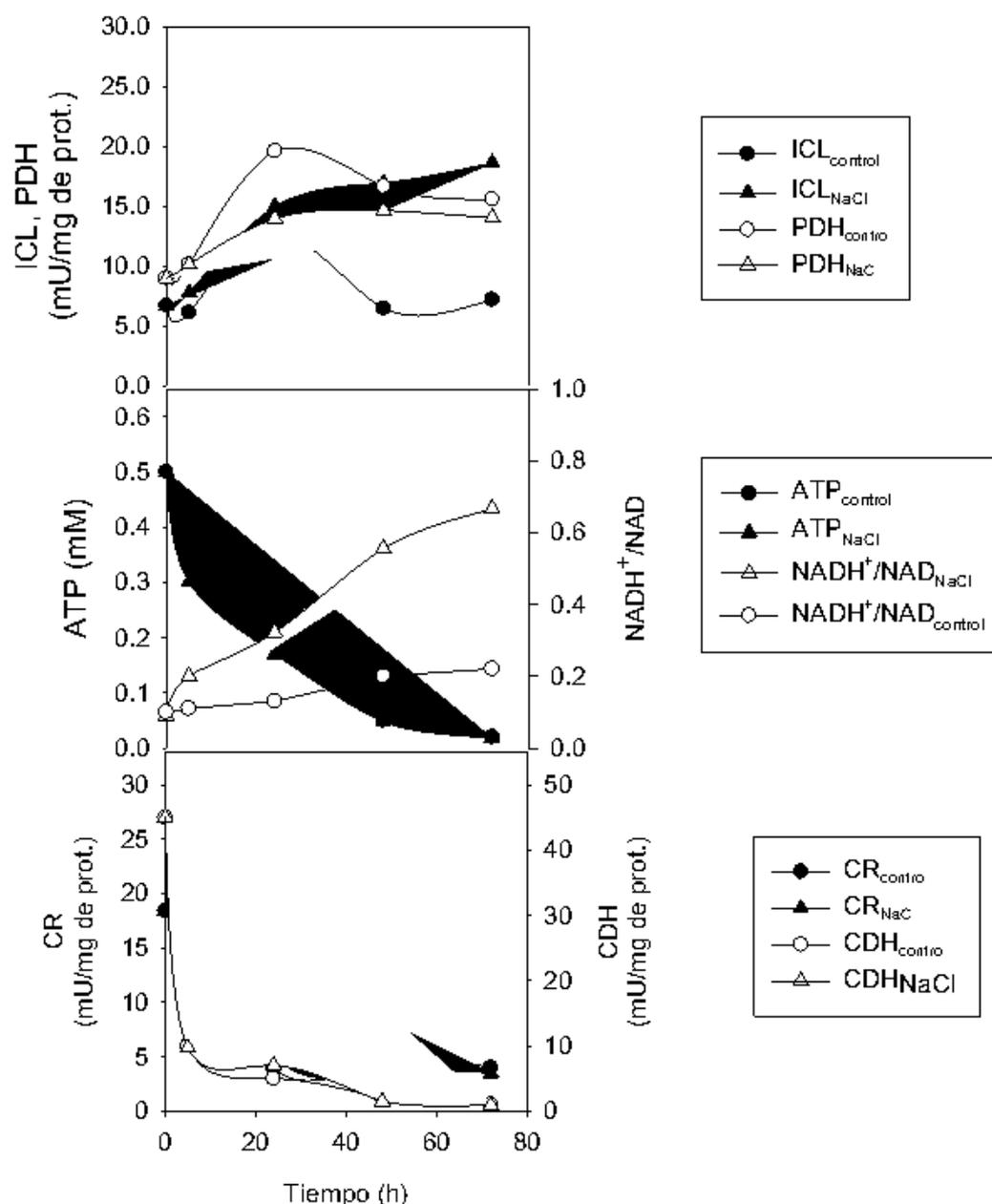
producción de energía ni de sustratos anabólicos, sino a mantener la viabilidad celular el máximo tiempo posible a través de las reservas almacenadas en la célula durante el periodo de crecimiento.

Los resultados obtenidos en este análisis mostraron la importancia del ciclo del glioxilato en estado durmiente, y en ellos se observó que de las 5 a las 24 horas la actividad de la enzima ICL se duplicó llegando a niveles de  $12,9 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$ . A partir de este momento, la actividad volvió a descender a los niveles iniciales (Figura 5.3A). Así, el flujo a través del ciclo de Krebs, tras un incremento de ICDH hasta  $90,3 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$  en las primeras cinco horas disminuyó a  $19,8 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$  a las 48 horas (Figura 5.4.C). Se produjo por tanto, un incremento del flujo a través de la enzima ICL que limitó la síntesis de poder reductor a través de la cadena de transporte de electrones. En el análisis del estado energético de la célula, se observó que la concentración de ATP disminuyó desde las primeras horas de incubación de  $0,4 \text{ mM}$  hasta niveles de  $0,11 \text{ mM}$  a las 24 horas para continuar con un descenso menos acusado hasta las 72 horas (Figura 5.3B).

Por otro lado, las actividades de las enzimas FTA y ACS disminuyeron desde el inicio de la incubación, siendo la actividad de la enzima FTA no detectable a las 5 horas y la actividad de la ACS cuatro veces menor a las 24 horas, para anularse totalmente en las horas siguientes de experimentación (Figura 5.4A y B). Este hecho fue debido a que estas enzimas pertenecen al metabolismo anaerobio del que proceden las células, que posteriormente han sido situadas en estado durmiente, donde se encuentran en condiciones aerobias. En cuanto al complejo PDH, duplicó sus niveles en las primeras 24 horas hasta  $19,6 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$ , para comenzar a disminuir hasta  $15,6 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$ , en las últimas 48 horas (Figura 5.3.A). Este hecho, se vio acompañado por unos niveles de acetil-CoA que se duplicaron hasta las 24 horas para disminuir posteriormente a los niveles iniciales. Además, la concentración de HS-CoA mantuvo una evolución similar a la de acetil-CoA (como se observó en estudios previos).

En el análisis de la biotransformación bajo estas condiciones, se observó que la actividad reductasa disminuyó a partir de las 5 horas hasta niveles de  $3 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$ , mientras que la actividad deshidratasa lo hizo bruscamente durante las primeras 5 horas desde  $45,4$  hasta  $9 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$ , y en el resto del tiempo de incubación se mantuvo en niveles próximos a  $4 \text{ mU}\cdot\text{mg de prot.}^{-1}$  (Figura 5.3C). Además, se pone de manifiesto la importancia para la biotransformación de los niveles de ATP y acetil-CoA,

ya que un descenso de éstos coincidió con una parada en la producción de L(-)-camitina a las 24 horas.



**Figura 5.3.** Evolución del metabolismo celular en estado durmiente: Control y en presencia de NaCl 0,5 M. **A)** Evolución de las actividades de las enzimas ICL y PDH, **B)** Evolución del contenido en ATP y del poder reductor celular, y **C)** Evolución de CDH.

También muestra la importancia de las rutas anapleróticas que mantuvieron los niveles de metabolitos como piruvato, PEP y acetil-CoA, con altas actividades de las

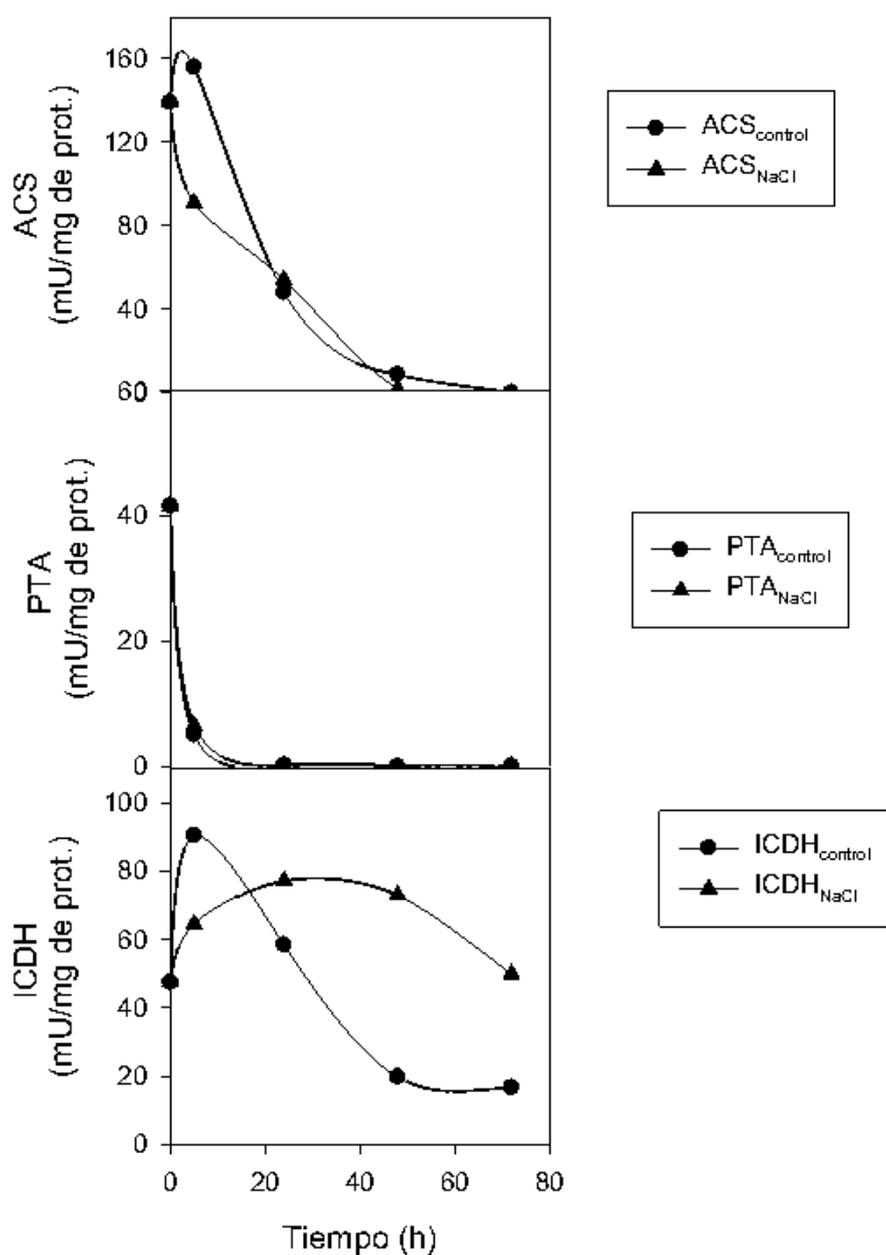
enzimas ICL y PDH. También, se observó que el metabolismo mantuvo los niveles de los metabolitos centrales, no destinándose a la división celular ni a energía, ya que la  $A_{600}$  disminuyó levemente durante las 72 horas de incubación y los niveles de ATP decrecieron rápidamente desde el inicio. Este hecho, aportó una posible explicación del alto rendimiento obtenido en la biotransformación, donde en las 24 primeras horas se movilizaron las reservas celulares para transformar la crotonobetaina, único compuesto asimilable por la célula del medio de incubación. Así, se produjo un descenso en el contenido en ATP, necesario para el transporte de crotonobetaina al interior celular, pudiendo ser éste uno de los posibles puntos limitantes de la biotransformación. También es posible que la enzima crotonobetaina/ $\gamma$ -butirobetaina-CoA ligasa necesite de ATP para formar crotonobetainil-CoA y  $\gamma$ -butirobetainil-CoA, que son los cofactores o cosustratos imprescindibles para la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de L(-)-carnitina (Capítulo 1). Esta necesidad de ATP para la CoA-ligasa se ha postulado por similitud con otras CoA-ligasas (Vessey y Kelley, 2001), estudios que en un futuro será conveniente realizar.

#### *5.2.2.2. Efecto del NaCl sobre el metabolismo de E. coli O44 K74 en estado durmiente.*

El NaCl provocó un aumento en el rendimiento de biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina, pero no de D(+)-carnitina (Capítulo 3 de la presente Memoria). Así, se decidió estudiar el metabolismo de *E. coli* O44 K74 en presencia de NaCl 0,5 M en el medio de biotransformación.

Los resultados obtenidos en presencia de NaCl, demuestran que la actividad de la enzima ICL aumentó con el tiempo resultando una mayor actividad que en el caso del control ( $25,6 \text{ mU} \cdot \text{mg de prot.}^{-1}$ ) y fue aumentando durante todo el tiempo de incubación (Figura 5.4A), pues en este caso se obtuvieron unos valores por debajo de los observados en el control. En cuanto a las actividades de las enzimas ACS y FTA, de forma similar a la incubación en el medio, disminuyeron en las primeras horas de incubación (Figura 5.4C), siendo el descenso más acusado de la enzima ACS en las primeras horas para, posteriormente descender progresivamente hasta el final del proceso con un comportamiento que indica que existió un mayor flujo de carbono a través del ciclo de Krebs que en el control. Además, la concentración de ATP también

disminuyó desde niveles similares a los obtenidos en el control, mientras que el cociente  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  fue más elevado que en el medio sin  $\text{NaCl}$ . Este resultado indica que en presencia de un choque osmótico la célula aumenta la producción de poder reductor, procedente del flujo a través del ciclo de Krebs tal y como indica la actividad ICDH, aun, cuando además favorezca un determinado flujo de carbono a través del ciclo del glioxilato.



**Figura 5.4.** Evolución durante la incubación en estado durmiente de las enzimas ACS, PTA e ICDH.

Estos resultados muestran por primera vez que, independientemente del medio de biotransformación, la unión entre ambos metabolismos está relacionada con los niveles energéticos celulares y permiten afrontar estudios de optimización celular mediante técnicas de Ingeniería Metabólica encaminados a la optimización de procesos de producción de L(-)-carnitina.

### **5.3. Conclusiones.**

1. El metabolismo de los compuestos de trimetilamonio de *E. coli* fue dependiente de los niveles de ATP y acetyl-CoA/HS-CoA, pues descensos en las concentraciones de estos metabolitos, coincidieron con la finalización en la producción de L(-)-carnitina, tanto con células en crecimiento como en estado durmiente.
2. El metabolismo primario con células en crecimiento en medio complejo anaerobio, estuvo marcado por el flujo a través del ciclo del glioxilato (enzima ICL), las actividades de las enzimas ACS y FTA, implicadas en el mantenimiento de los niveles de ATP y acetyl-CoA, y la formación de formiato, que está asociada a la síntesis de acetyl-CoA.
3. La producción de L(-)-carnitina en el medio complejo en anaerobiosis estuvo asociada a la fase de crecimiento, alcanzando concentraciones de L(-)-carnitina de 10,3 mM, debido fundamentalmente a la mayor actividad CDH, 26,8 mU·mg de prot.<sup>-1</sup>.
4. El metabolismo primario de las células incubadas en estado durmiente, se caracterizó por las altas actividades de ICL y PDH, enzimas relacionadas con el metabolismo del acetyl-CoA.
5. Los pasos limitantes en la biotransformación parecen situarse a nivel del transportador (CaiT) que ve limitada su actividad por los niveles de ATP y de la enzima crotonobetaina/ $\gamma$ -butirotobetaina-CoA ligasa que tiene como posibles sustratos el ATP y la relación de acetyl-CoA/ HS-CoA, pues descensos en las concentraciones de estos dos metabolitos coinciden con la disminución en el rendimiento de la biotransformación.
6. Así, la selección de cepas que almacenen gran cantidad de material de reserva y/o la modificación de las actuales y unas condiciones adecuadas encaminadas a conseguir células con mayores niveles energéticos y con mayores actividades en

las enzimas asociadas a la biotransformación (CDH, ICL, PDH, CoA-ligasa y proteína transportadora), podrán reducir los efectos limitantes de estos pasos y aumentar el rendimiento del bioproceso.

## 6.1. Introducción.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas por delante de un láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que son recogidas por distintos detectores (Davey y Kell, 1996). Entre las muchas posibilidades que ofrece el citómetro de flujo en Microbiología destacan: la discriminación de microorganismos utilizando la dispersión y mezclas de fluoróforos, o anticuerpos u oligonucleótidos marcados con fluorocromos (Tanke y Van der Keur, 1993; Davey y Kell, 1996; Robertson *et al.*, 1998) y la interacción de microorganismos con drogas, antibióticos u otras sustancias tóxicas para la célula (Mason *et al.*, 1994; Pore, 1994; Porter *et al.*, 1995; Lange *et al.*, 1997; Lisle *et al.*, 1999; Amanullah *et al.*, 2002 y 2003). También, se puede realizar un seguimiento del ciclo celular (Crissman *et al.*, 1985), determinar el número de cromosomas y de orígenes de replicación, la pérdida de plásmidos (Seo y Bailey, 1987; Boye y Løbner-Olesen, 1991), contabilizar células (Pinder *et al.*, 1990), determinar el ADN (Lebaron y Joux, 1994; Soriano *et al.*, 1999; Button y Robertson, 2001) y cuantificar componentes intracelulares tan importantes como el ADN, ARN y proteína (García-Ochoa *et al.*, 1998). Además, ésta técnica permite la separación y aislamiento de cepas de alto rendimiento para uso biotecnológico, ya que tiene la capacidad de separar poblaciones celulares seleccionadas como óptimas mediante el uso de placas deflectoras, lo que se denomina como clasificación o "sorting". Así, algunos autores han conseguido, utilizando esta técnica, seleccionar cepas de *Rhizopus arrhizus* altamente productoras de lipasa (Betz *et al.*, 1984) y han optimizado la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Soriano *et al.*, 2002).

También, mediante el uso de colorantes fluorescentes que son capaces de unirse a compuestos intracelulares específicos, se puede obtener información sobre la fisiología celular y su metabolismo, permitiendo la determinación de la viabilidad celular (Jepras *et al.*, 1995; López-Amorós *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1995; Nebe-Von Caron y Badley, 1995; Porter *et al.*, 1995; Nebe-Von Caron *et al.*, 1998) y el análisis del estado fisiológico de células individuales (Jepras *et al.*, 1995; Hewitt *et al.*, 1999a y 1999b; Tholozan *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Nebe-Von Caron *et al.*, 2000; Ritz *et al.*, 2001). Todas estas aplicaciones son de gran utilidad en Medicina, Microbiología y Biotecnología (Davey y Kell, 1996; Riesenber *et al.*, 2001).

En general, la integridad de la membrana plasmática (MP) bacteriana se puede detectar mediante su permeabilidad selectiva, ya que le permite excluir o retener colorantes como el yoduro de propidio (IP) o el bromuro de etidio (BE) (Shapiro, 1995; Davey y Kell, 1996). El IP es un colorante fluorescente vital capaz de unirse a ADN pero incapaz de atravesar la MP cuando permanece intacta (Nebe-Von Caron y Badley, 1995; Davey y Kell, 1996; Hewitt *et al.*, 1999a y 1999b). De esta manera, el que una población celular no se tiña con IP supone la existencia de células con una MP intacta, que generalmente se clasifican como células viables, mientras que las células teñidas con IP representan a células muertas debido a la pérdida de integridad de la MP, lo que indica también la pérdida de la actividad metabólica y de la capacidad de división celular. Por otro lado, el BE es capaz de unirse también al ADN y atravesar la MP celular intacta. No obstante mediante un sistema de transporte activo no específico es bombeado al exterior en células sanas (Hewitt *et al.*, 1999b). Así, el BE quedaría incluido en las células desenergizadas y en las despolarizadas (Midgley, 1987).

Por otro lado, la actividad metabólica en células bacterianas se puede medir por medio del gradiente electroquímico generado por células sanas al poseer transportadores pasivos y activos a través de la MP (Shapiro, 1995). La disipación del potencial de la MP conduce a una situación donde la célula pierde la capacidad de proteger su citoplasma del medio exterior y puede afectar severamente a las funciones normales de la célula. El compuesto bis-(ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) trimetin oxonol (BOX) es un colorante fluorescente lipofílico, aniónico y no tóxico, capaz de unirse a la MP cuando esta se encuentra despolarizada y se distribuye en función del gradiente de potencial de membrana (Davey y Kell, 1996; Nebe-Von Caron y Badley, 1995). Así, la tinción con BOX puede dar una medida del nivel de estrés metabólico a que está sujeta la célula. Así, el uso conjunto de los colorantes IP y BOX puede permitir medir de forma aproximada el estado fisiológico de la población celular. En la Tabla 6.1 se indica la clasificación de la viabilidad celular según la tinción con IP y BOX.

En bioreactores la población celular experimenta cambios fisiológicos y bioquímicos a lo largo del bioproceso, lo que implica la existencia de diferentes estadios celulares dentro de la misma población (Anderson *et al.*, 1996; Nebe-Von Caron y Badley, 1998; Kell *et al.*, 1998). De hecho, algunos autores (Poter *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1996) han clasificado las posibles poblaciones celulares dentro del reactor como: células viables, viables pero no cultivables (no forman colonias en placa) y células muertas. Sin embargo, las células pueden permanecer con la MP despolarizada

y/o con la MP y pared celular permeabilizada (Hewitt *et al.*, 1999a y 1999b). Así, mediante el uso específico de colorantes celulares y utilizando la citometría de flujo se ha postulado la siguiente clasificación: células viables reproductivas, células vitales, células intactas (depolarizadas) y células muertas (permeabilizadas) (Hewitt *et al.*, 1998; Nebe-von Caron *et al.*, 1998; Hewitt *et al.*, 2000)). Las características de los tipos celulares más aceptados se resumen en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Clasificación de los colorantes y viabilidad celular mediante la utilización de IP y BOX (Nebe-Von Caron y Badley, 1995).

---

*Células viables reproductivas o proliferativas:* Son las células que se encuentran en división y pueden crecer bajo las condiciones de laboratorio; su detección se puede realizar mediante crecimiento en placa (IP<sup>+</sup> y BOX<sup>-</sup>).

*Células vitales:* Son las células que poseen actividad metabólica medible mediante potencial de membrana, actividades enzimáticas, síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, etc, pero no es posible medir su crecimiento por recuento en placa (IP<sup>+</sup> y BOX<sup>-</sup>).

*Células intactas:* Son las células que presentan una permeabilidad selectiva y una integridad de membrana, pero prácticamente carecen de actividad metabólica o división celular. Su detección se puede realizar mediante la exclusión de colorantes de unión a ADN impermeables a membrana (IP<sup>+</sup> y BOX<sup>+</sup>).

*Células muertas:* Son estructuras celulares con información genética que carecen de integridad de membrana y que están expuestas a un ambiente en continua descomposición. Son permeables, carecen de actividad metabólica, no presentan división celular y su detección se puede realizar mediante entrada selectiva de colorantes de membrana (IP<sup>+</sup> y BOX<sup>+</sup>).

---

Se han realizado algunos estudios con *E. coli*, utilizando el citómetro de flujo y los colorantes anteriormente descritos, para detectar situaciones de estrés celular en un biorreactor durante el crecimiento celular (Hewitt *et al.*, 1998a, 1998b y 2000), caracterizar el estado fisiológico celular en cultivos semicontinuos de alta densidad celular (Hewitt *et al.*, 1999a) y con limitación de glucosa (Hewitt *et al.*, 1999b) y estudiar el escalado de cultivos de alta densidad en diferentes situaciones de crecimiento (Hewitt *et al.* 2000).

El trabajo que se presenta en este capítulo consistió en la optimización de técnicas de tinción y uso del citómetro de flujo para determinar la evolución del contenido en ADN, ARN y proteína por unidad de célula, o en toda la población celular, durante la biotransformación de crotonobetaina o D(+)-carnitina en L(-)-carnitina por

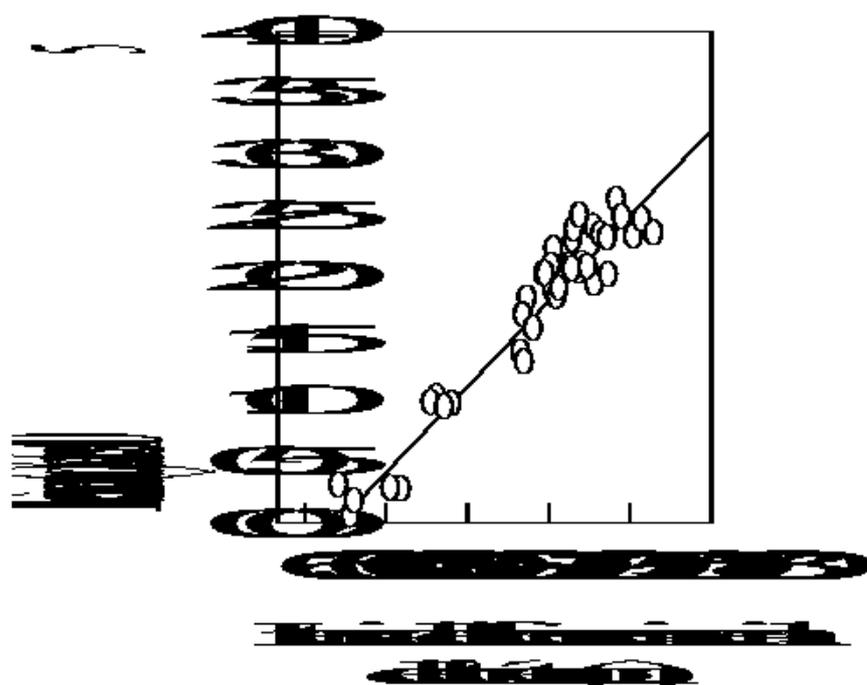
células de *E. coli* en crecimiento o en estado durmiente en reactores discontinuos bajo diferentes condiciones. Para ello, se utilizó BE para teñir ácidos nucleicos y FITC para determinar proteínas. Al mismo tiempo, se utilizó la técnica de multitinción mediante la utilización conjunta de IP y BOX para determinar la viabilidad celular de la población global en el reactor y la evolución de las diferentes poblaciones celulares durante dichas biotransformaciones, de forma que permitiera conocer cuales de ellas están implicadas. Los experimentos se realizaron con células que habían crecido en un reactor con medio complejo anaerobio, descrito en el capítulo de Materiales y métodos. Los resultados obtenidos bajo diferentes condiciones se compararon entre sí con tal de obtener información que permita optimizar el proceso de biotransformación.

## 6.2. Resultados y discusión.

### 6.2.1. Medida de los componentes celulares proteína, ARN y ADN mediante citometría.

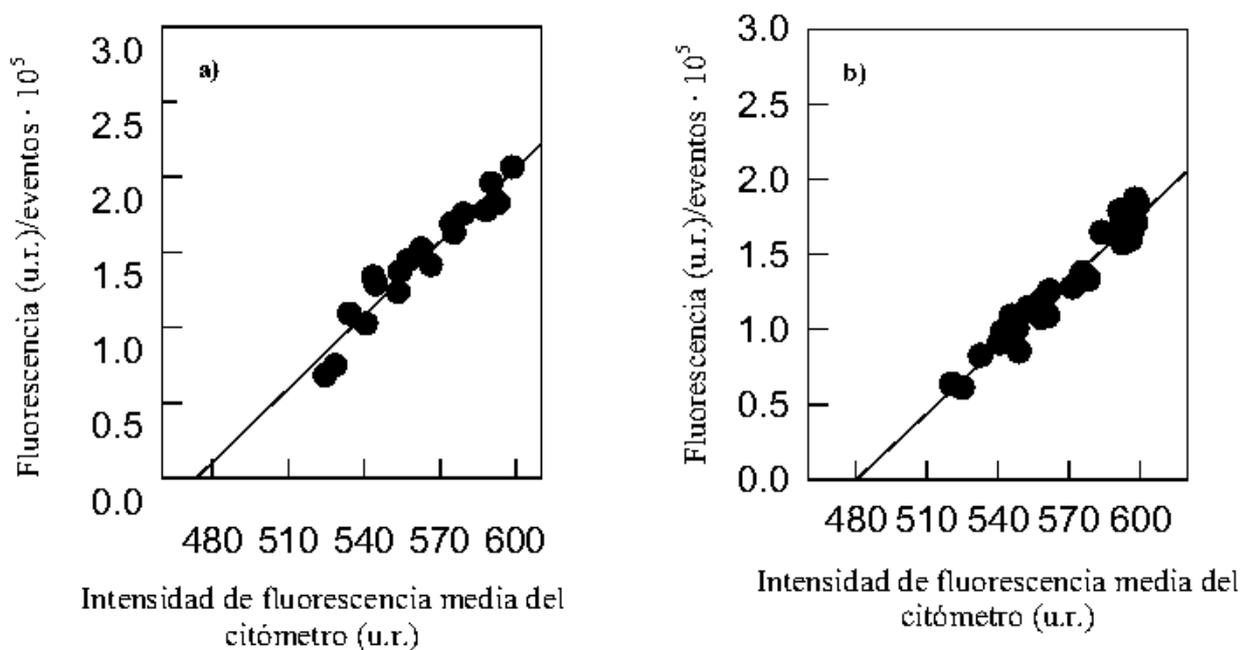
Para poder realizar medidas cuantitativas de proteína, ARN y ADN celular por citometría de flujo es necesario relacionar la señal por unidad de célula obtenida por citometría de flujo con la procedente de una técnica fluorimétrica, transformada en fluorescencia por unidad de célula. A su vez, la señal generada por el fluorímetro debe relacionarse con cantidades conocidas de proteína, ARN y ADN. Para establecer dicha relación, se prepararon soluciones de concentración conocida de estas sustancias teñidas con el colorante apropiado (FITC para proteína, y BE para ARN y ADN), y se midió la fluorescencia generada por medio de fluorimetría, tal y como se explica en el apartado de Materiales y métodos. De esta manera, las rectas de calibrado obtenidas permitieron conocer directamente la cantidad de proteína, ARN y ADN por unidad de célula, y por extensión su evolución en un cultivo celular o en un medio de biotransformación, usando únicamente la citometría de flujo. Las rectas de calibrado de relación lineal entre la señal producida por fluorimetría y las concentraciones de proteína, ARN y DNA, en mg/ml fueron las siguientes: Proteína,  $b=128755,87$ ;  $a=1237,29$ ;  $r^2=0,9416$ ; ARN,  $a=118973,94$ ;  $b=-2434,93$ ;  $r^2=0,9699$  y ADN,  $b=715,33$ ;  $a=228571,69$ ;  $r^2=0,9928$  para la ecuación de la recta  $y=ax+b$ . Los resultados obtenidos provienen tres experimentos de cultivos celulares de *E. coli* O44 K74.

Una vez conocida la relación existente entre la concentración de proteína, ARN o ADN y la intensidad de fluorescencia generada tras su análisis fluorimétrico, se procedió a realizar el correspondiente calibrado del citómetro de flujo respecto a dichos componentes celulares. Para ello, se emplearon células de un medio de cultivo complejo anaerobio, a distintos tiempos de cultivo. La detección de la proteína celular se realizó por tinción con FITC, y la del ARN y el ADN intracelulares con BE, y posteriormente se trata las células con DNasa y RNasa, respectivamente. La fluorescencia de las células teñidas se analizó por citometría de flujo y por fluorimetría, en las condiciones que se expresan en Materiales y métodos. La intensidad de fluorescencia del fluorímetro se refirió por unidad de célula, y se representó frente a la generada por unidad de célula del citómetro. La recta de calibración de proteína se recoge en la Figura 6.1.



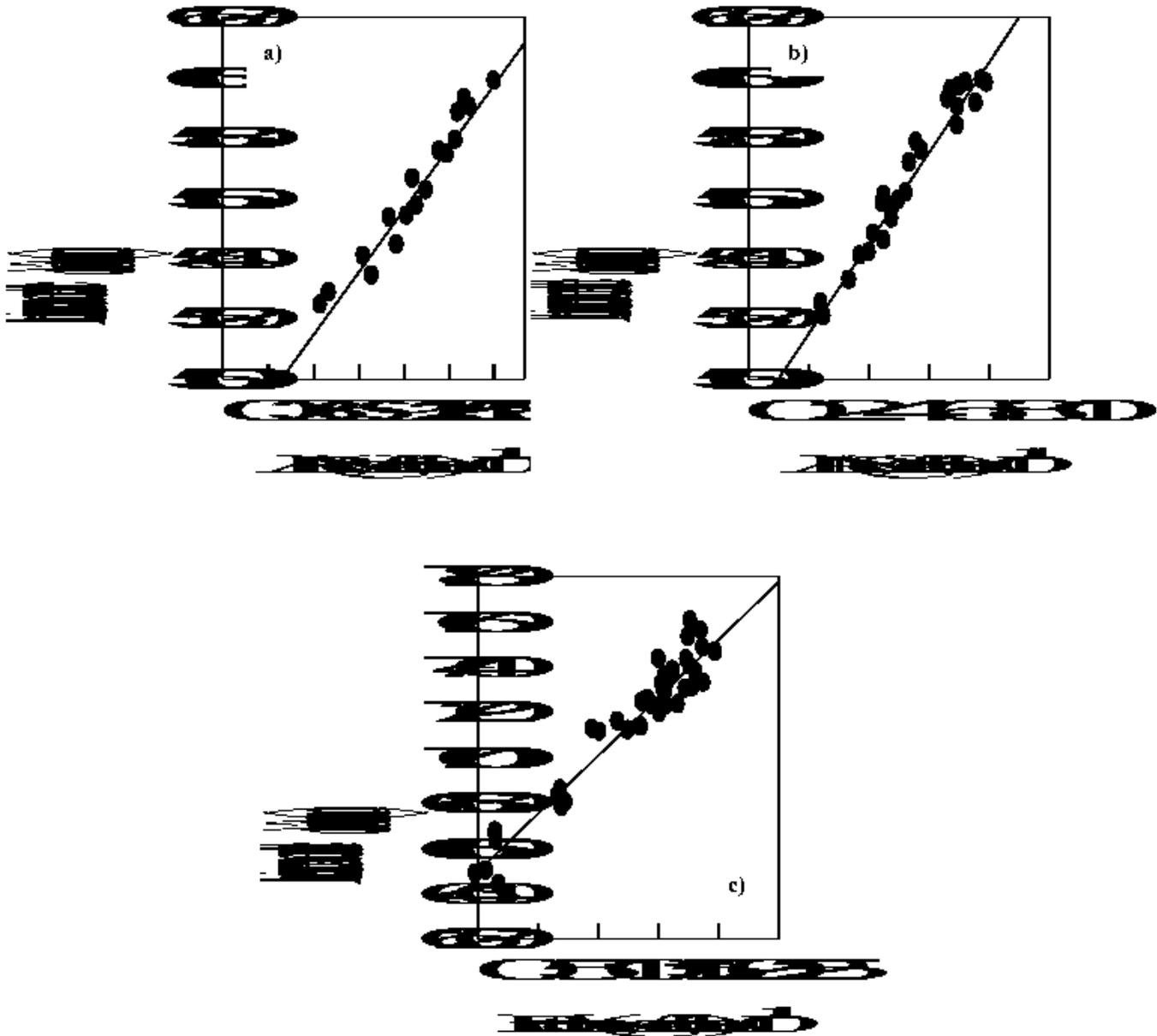
**Figura 6.1.** Correlación entre la intensidad de fluorescencia medida espectrofluorimétricamente que generan células de *E. coli* O44 K74 teñidas con FITC, y la intensidad de fluorescencia media que producen en su estudio por citometría de flujo. Ecuación de la recta  $y=ax+b$ :  $b=-14,88$ ;  $a=0,023$ ;  $r^2=0,9268$ . Los análisis fluorimétrico y citométrico se realizaron tal y como se presenta en Materiales y métodos.

En la Figura 6.2, se representan las rectas de calibrado del citómetro para el ARN y el ADN, en unidades arbitrarias de fluorescencia, tras el tratamiento celular con DNasa y con RNasa, respectivamente. Al representar los valores obtenidos frente a la intensidad de fluorescencia media procedente de los análisis por citometría de flujo correspondientes, se obtuvo una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia media y los miligramos de proteína, ARN o ADN por unidad de célula. Estas rectas se representan en la Figura 6.3.



**Figura 6.2.** Correlación entre las intensidades de fluorescencia media determinada espectrofluorimétricamente y por citometría de flujo, que generan células de *E. coli* O44 K74 teñidas con BE y tratadas con **a)** DNasa, ecuación de la recta  $y=ax+b$ :  $b=-7,71$ ;  $a=0,016$ ;  $r^2=0,9307$ ; y con **b)** RNasa, ecuación de la recta  $y=ax+b$ :  $b=-7,06$ ;  $a=0,015$ ;  $r^2=0,9470$ . Los análisis fluorimétrico y citométrico se realizaron tal y como se expresan en Materiales y métodos.

Los valores obtenidos de los coeficientes de correlación son indicadores de la adecuación de estas medidas. Además, estas relaciones permiten cuantificar la evolución de estas variables, tanto en diferentes estados fisiológicos como a lo largo de un cultivo celular en continuo, semicontinuo o discontinuo.



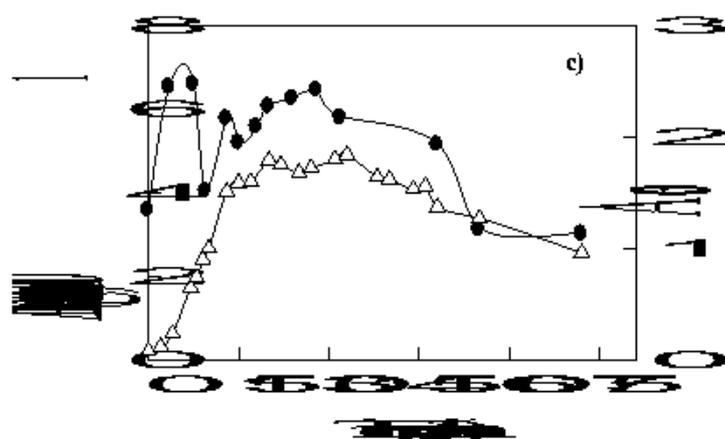
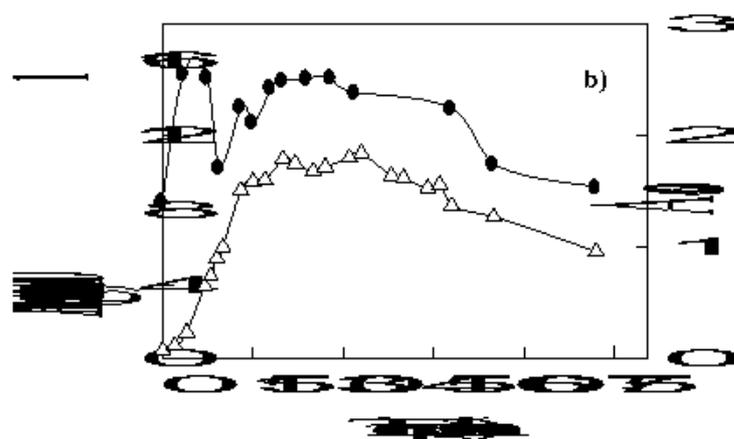
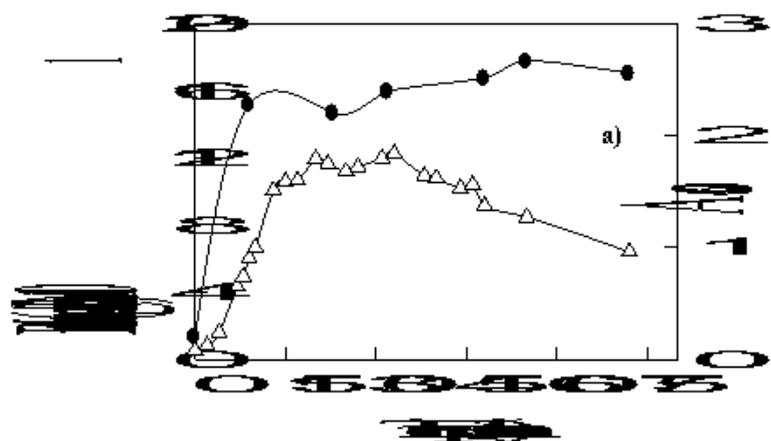
**Figura 6.3.** Relación lineal ( $y=ax+b$ ) entre la intensidad media de fluorescencia del citómetro y la concentración de **a)** ARN; donde  $b=423,262$ ;  $a=6,900$ ; y  $r^2=0,9473$ ; **b)** ADN; donde  $b=484,967$ ;  $a=14,989$ ; y  $r^2=0,9526$ ; y **c)** proteína; donde  $b=649,775$ ;  $a=5,127$ ; y  $r^2=0,9310$ ; por unidad de célula para *E. coli* O44 K74.

### 6.2.2. Estudio del estado fisiológico de *E. coli* O44 K74 en crecimiento anaerobio.

Una vez establecidas las relaciones lineales entre los niveles de los componentes intracelulares y la señal obtenida por citometría de flujo, se procedió a estudiar su evolución en *E. coli* en medio complejo bajo condiciones anaerobias. Para ello, se realizó un seguimiento del contenido en proteína, ARN y ADN por unidad de célula a lo largo del tiempo.

Así, la cantidad de proteína por unidad de célula aumentó hasta alcanzar valores de  $15,0 \times 10^{-11}$  mg/célula alrededor de las 9 horas de experimentación, durante el crecimiento celular en el medio complejo en condiciones anaerobias (Figura 6.4a). A las 72 horas de cultivo, lejos de disminuir aumentó ligeramente hasta alcanzar  $17,8 \times 10^{-11}$  mg/célula. La curva de proteína por unidad de célula se asemeja a la curva de crecimiento obtenida por medio del seguimiento de la absorbancia a 600 nm. Tras la etapa estacionaria el nivel de la proteína aumentó ligeramente. Este aumento se produjo ya en la fase de muerte celular, y pudo deberse a la producción de proteínas de estrés celular, aunque no se vió acompañado por un aumento paralelo de la cantidad de ARN (Figura 6.4b), sino por una disminución, ya que se estuvo produciendo la muerte celular.

En cambio, la evolución de los contenidos en ácidos nucleicos no fue similar al de proteína, pues tras la etapa estacionaria tanto la cantidad de ADN como de ARN por unidad de célula disminuyeron paralelamente a la absorbancia (Figura 6.4b y c). Sin embargo, al comienzo de la fase exponencial las variaciones presentaron un máximo entre las 3 y 8 horas de cultivo, restableciéndose de nuevo los niveles de ARN y ADN por unidad de célula alrededor de las 13 horas de cultivo, para a continuación descender, paralelamente a la absorbancia después de las 48 horas. El nivel de ADN pasa a ser el doble en el primer máximo, debido probablemente a la existencia de una gran actividad de duplicación del ADN y crecimiento, que rápidamente disminuyó debido a la división celular. Posteriormente, el ADN volvió a aumentar al doble entre las 13 y 48 horas, la replicación del ADN continuó, pero tanto ésta como la división celular fueron más lentas por encontrarse las células en la fase estacionaria. El ARN describe una curva similar a la del ADN y presentó el mismo comportamiento a largo del tiempo de cultivo.



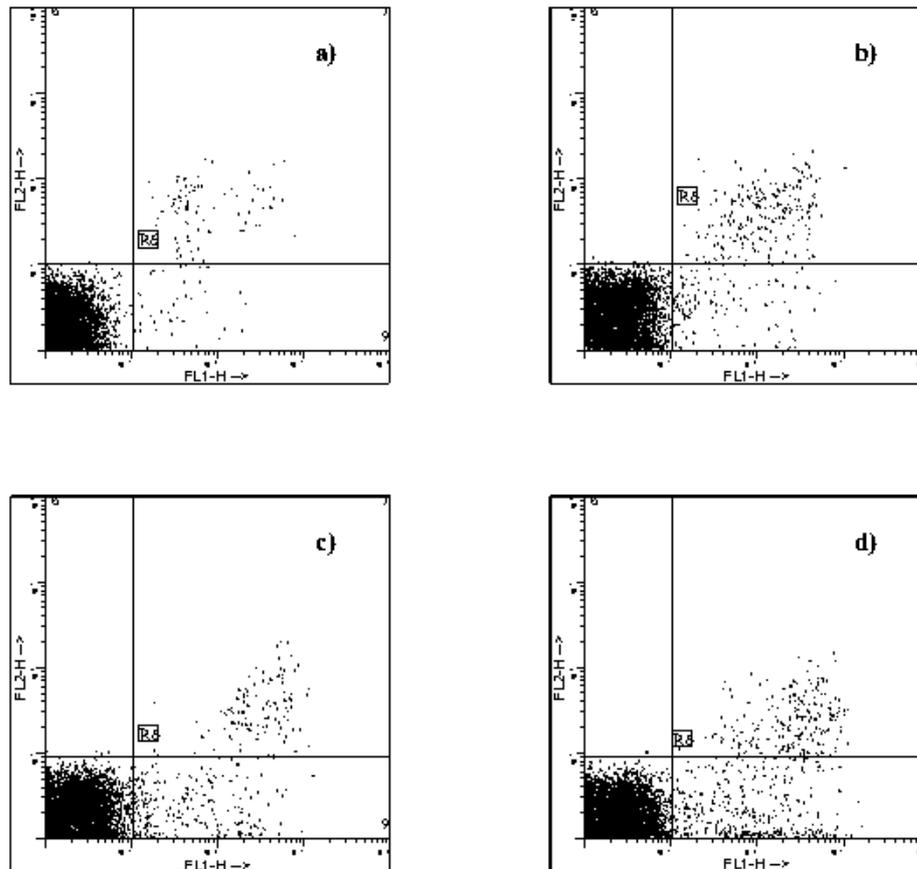
**Figura 6.4.** Variación de las concentraciones de proteína, ARN y ADN, durante un cultivo de *E. coli* O44 K74 en el medio complejo bajo condiciones anaerobias. a) ( $\lambda$ ) Proteína. b) ( $\lambda$ ) ARN. c) ( $\lambda$ ) ADN. ( $\Delta$ ) Absorbancia a 600 nm.

Este aumento inicial de ácidos nucleicos durante la fase exponencial y la posterior disminución al final de esta fase, se han observado en otras cepas de *E. coli* por Boye y Løbner-Olesen (1991) y Akerlund *et al.*, (1995). Estos autores mediante citometría de flujo y utilizando cepas patrón (cantidad de ADN conocida), describen que en el estado estacionario las células llegan a contener dos e incluso más cromosomas durante días, pero no cuantifican el contenido de ADN. En este estudio se han detectado dos cromosomas en el estado estacionario, y se cuantifica mediante la oportuna calibración con ADN patrón.

### 6.2.3. Análisis de la viabilidad de un cultivo de *E. coli* O44 K74 por citometría de flujo bajo condiciones anaerobias.

Se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo con los colorantes IP y BOX, de células de *E. coli* O44 K74 creciendo en un medio complejo bajo condiciones anaerobias en reactor discontinuo. Así, se observó que a las 15 horas del inicio del cultivo bajo condiciones anaerobias existió un pequeño porcentaje de tinción con BOX, sólo el 0,66%, lo que indicó que muy pocas células se encontraban en el estado de células intactas. Por otro lado, las células teñidas con IP y BOX fueron únicamente el 1,8%. Así, más del 95% del cultivo celular se encontraba en estado de células viables reproductivas o de células vitales (Nebe-Von Caron y Badley, 1995), predominando seguramente el primer estado por tener el cultivo tan sólo 15 horas (Figura 6.6a).

Cuando el cultivo llegó a 30 horas, el porcentaje de células intactas aumentó al 2,5%. Las células muertas representaron el 4,2% del cultivo (Figura 6.5b). A las 48 horas de cultivo las células teñidas con BOX fueron un 4,7% del total. En este tramo del cultivo se observó una disminución de la población teñida con IP y BOX a un valor del 2,1% (Figura 6.5c). Esta disminución se correspondió con la disminución de la absorbancia medida a 600 nm, y con la disminución de la concentración de ácidos nucleicos detectada por citometría de flujo debidos a una degradación celular (Figura 6.4b y c). De hecho, a las 72 horas volvió a aumentar el porcentaje de células teñidas con IP y BOX al 3,6%, y de las células teñidas con BOX al 7,6% (Figura 6.5d).



**Figura 6.5.** Viabilidad de un cultivo de *E. coli* O44 K74 en un medio complejo bajo condiciones anaerobias a un tiempo de incubación de: a) 15 horas, b) 30 horas, c) 48 horas, y d) 72 horas.

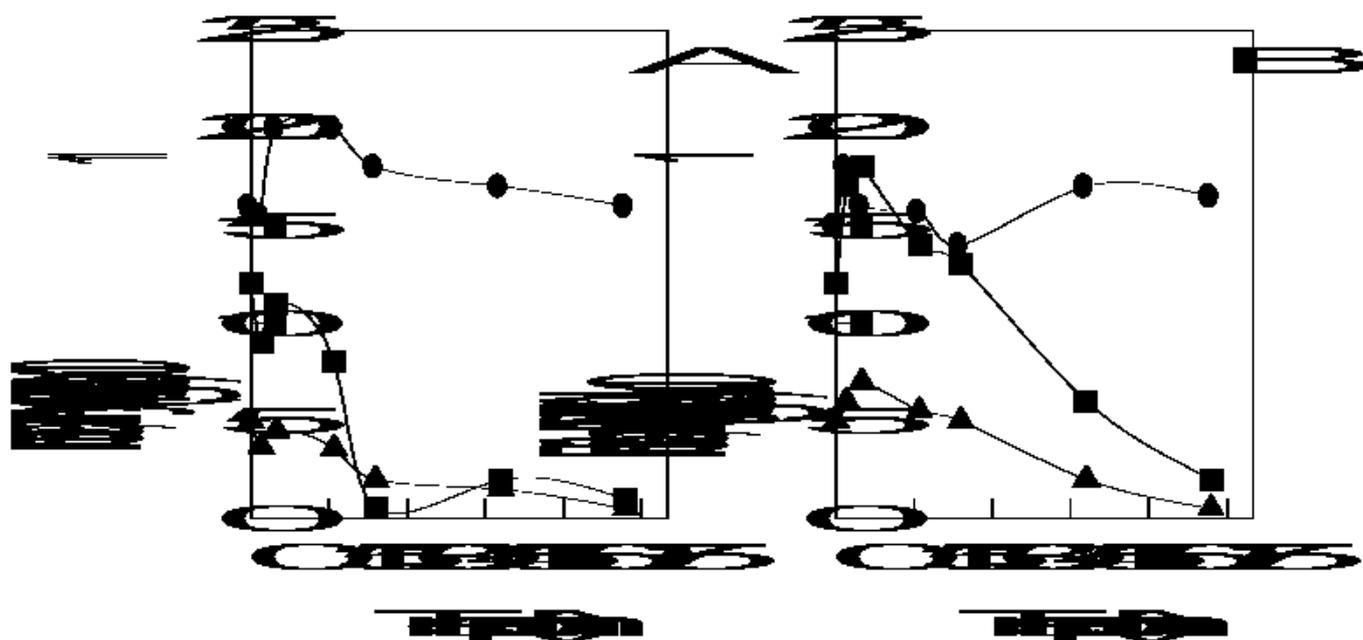
Se puede concluir que el canal medio de fluorescencia para células teñidas únicamente con BOX fue aumentando conforme se desarrolló el cultivo, al igual que el porcentaje de despolarización celular. Aun así, no se alcanzaron porcentajes de tinción elevados. La mayor parte de la población permaneció en estado viable reproductivo o en estado de célula vital, por lo que no existió un elevado estrés celular como consecuencia de limitación de fuente carbonada, o por acumulación de niveles tóxicos de bio-productos, que son las principales causas que llevan a la despolarización de la membrana celular, y con el tiempo a la permeabilización y consecuente muerte celular (Hewitt *et al.*, 1999a).

#### **6.2.4. Evolución de los componentes celulares en células durmientes de *E. coli* O44 K74 bajo diferentes condiciones en la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina.**

Se analizó mediante citometría de flujo la evolución de la cantidad de proteína, ARN y ADN de células de *E. coli* O44 K74 durante la biotransformación en estado durmiente de crotonobetaina en L(-)-carnitina (Materiales y métodos), en presencia y ausencia de NaCl, ya que la presencia de NaCl en el medio de biotransformación mejoró su producción, tal y como se presenta en el Capítulo 3 de esta Memoria.

Las células que realizaron la biotransformación procedían de un medio complejo anaerobio a las 15 horas de cultivo y se colocaron en el medio de biotransformación descrito en Materiales y métodos. Como se ha expresado en el apartado 6.2.3, a las 15 horas de un cultivo complejo anaerobio las células se encontraron en un estado de replicación del material genético, ya que están al final de la fase exponencial de crecimiento, cerca de ser diploides, de ahí que posean casi el doble de ácidos nucleicos (Figura 6.5). Por otro lado, los niveles de proteína se encontraban casi al máximo de producción.

En ausencia de NaCl, la concentración de proteína inicial fue de  $16,4 \times 10^{-11}$  mg/célula a las cero horas, y alcanzó valores de  $20,5 \times 10^{-11}$  mg/célula a las 22 horas de cultivo (Figura 6.7a). Posteriormente, disminuyó a valores de  $17-18 \times 10^{-11}$  mg/célula a las 29 horas, manteniéndose constante hasta las 72 horas de experimentación. El máximo de proteína coincidió con niveles estables de ARN y de ADN (Figura 6.7a), entre  $8-12 \times 10^{-11}$  mg/célula entre las cero y las 25 horas, y  $3-5 \times 10^{-11}$  mg/célula entre las cero y 30 horas, respectivamente. A partir de las 22 horas, el ARN disminuyó para oscilar entre  $0,5-2,5 \times 10^{-11}$  mg/célula, lo que indicó una degradación de ARN y el DNA tuvo desde el inicio del proceso una tendencia a degradarse.



**Figura 6.7.** Análisis por citometría de flujo de la evolución de proteína ( $\lambda$ ), ARN ( $\nu$ ) y ADN ( $\sigma$ ) durante la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina a partir células de *E. coli* O44 K74 obtenidas de un medio complejo anaerobio. A) Control. B) En presencia de NaCl 0,5 M.

El que se mantuviera la proteína casi constante a partir de las 29 horas pudo deberse a la expresión de proteínas relacionadas con el estrés celular, por encontrarse las células en un medio que contiene únicamente tampón fosfato y el sustrato a biotransformar. Por otro lado, el mantenimiento de la proteína también pudo deberse al inicio de apoptosis a partir de las 30 horas, ya que comienza a descender el nivel de ADN por debajo de  $3 \times 10^{-11}$  mg/célula.

En los experimentos llevados a cabo en presencia de NaCl se produjo sólo un ligero aumento de  $14,3 \times 10^{-11}$  mg/célula a tiempo cero a  $17,3 \times 10^{-11}$  mg/célula a las 2 horas, manteniéndose durante el tiempo de experimentación (Figura 6.7b). El contenido de ARN (Figura 6.7b) no disminuyó tan bruscamente como en el medio sin NaCl, por lo que se demuestra una mayor actividad de síntesis de proteínas, seguramente debida al estrés osmótico que supone la presencia del NaCl, con las consecuencias que anteriormente se expusieron. De hecho este fue el medio en el que mayores cantidades se han detectado tanto para el ADN (Figura 6.7b) como para el ARN, con un máximo

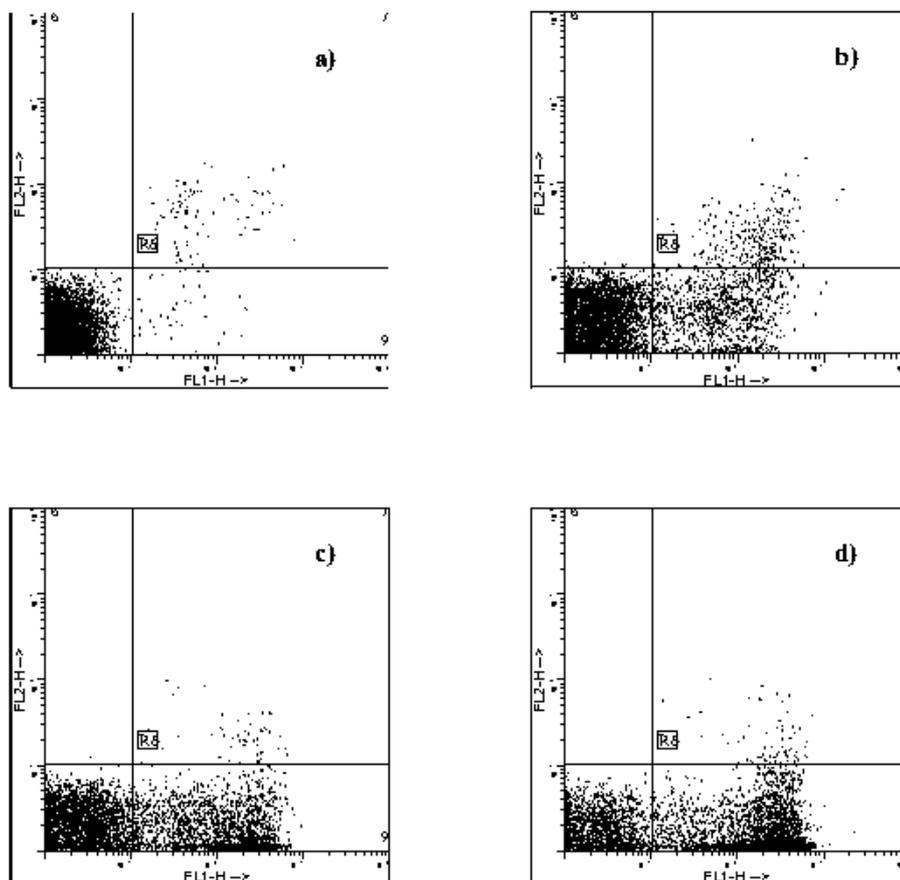
de  $6,97 \times 10^{-11}$  y  $18,51 \times 10^{-11}$  mg/célula a las 7 horas, respectivamente. A partir de las 30 horas comenzó la degradación de ácidos nucleicos, probablemente por inicio de la apoptosis.

#### **6.2.5. Análisis de la viabilidad de *E. coli* O44 K74 durante la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina bajo diferentes condiciones.**

Se analizó la viabilidad celular mediante citometría de flujo con los colorantes IP y BOX, de células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente incubadas bajo condiciones aerobias procedentes de un medio complejo incubado bajo condiciones anaerobias, durante la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina, en presencia y ausencia de NaCl 0,5 M.

A tiempo cero, existió prácticamente el 100% de viabilidad celular. A las 24 horas (Figura 6.8b) el 19,94% de la población celular se tiñó con BOX y el 5,86% del cultivo son células muertas, que se tiñeron con IP y BOX. Como se aprecia en la Figura 6.8 c y 6.9, a las 48 horas, las células teñidas con BOX eran ya el 40,7% de la población, mientras que las células muertas el 0,88% del cultivo. Esta disminución de las células muertas pudo deberse a su desaparición por degradación, así como a la disminución de los ácidos nucleicos, a cantidades comprendidas entre  $0,5-2,5 \times 10^{-11}$  mg/célula para el ARN, y de alrededor de  $1 \times 10^{-11}$  mg/célula para el ADN (Figura 6.8a), por lo que la tinción con IP era menor, y en caso de no contener las células ácidos nucleicos éstas se teñirían únicamente con BOX (fantasmas celulares, Nebe-Von Caron *et al.*, 1998).

Al término del experimento a las 72 horas, el 68,4% de la población celular se tiñó con BOX y el 1,3% de la población eran células muertas con material genético (Figura 6.8d). En este punto ya no se detectó el ADN, y el ARN se encontró en cantidades ínfimas (Figura 6.7a), por lo que gran parte de la población de células teñidas con BOX correspondieron a fantasmas celulares. Además, el canal medio de fluorescencia roja para células muertas disminuyó, lo que también indicó una degradación del material genético en las células muertas.



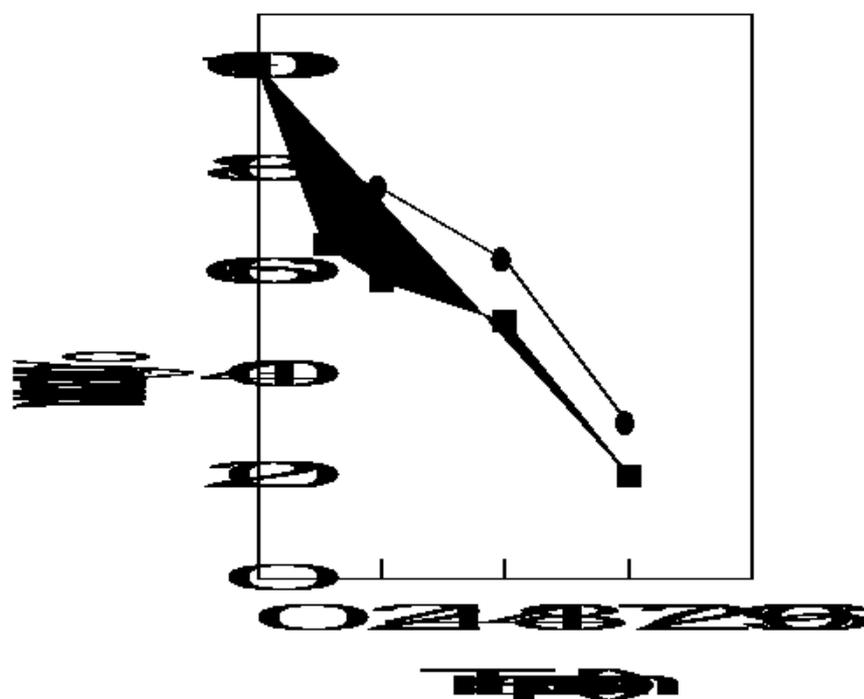
**Figura 6.8.** Análisis de la viabilidad durante la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina a partir de células de *E. coli* O44 K74 de un medio complejo anaerobio. Tiempo a) 15 horas de un medio complejo anaerobio, los datos corresponden con el tiempo cero de biotransformación, b) 24 horas, c) 48 horas, y d) 72 horas. Los ensayos de viabilidad se realizaron con IP y BOX, tal y como se explica en correspondiente apartado de Materiales y métodos.

El canal medio de fluorescencia para células teñidas con BOX aumentó a lo largo del tiempo, de 451,2 a las 24 horas a 578,6 a las 72 horas, reflejando una mayor despolarización de las membranas celulares.

En la Figura 6.10, se presentan los experimentos llevados a cabo en presencia de NaCl. Como se puede observar, a las 24 horas de experimentación el 26,6% de las células se encontraban teñidas con BOX y el 32,0% de la población eran muertas, pero continuaron realizando la biotransformación. Al mismo tiempo de experimentación, el medio sin NaCl generó menos daño celular, ya que presentó un 5,9% de células

mueratas, y un 19,9% de células teñidas con BOX. Estos resultados son consecuencia de la presencia de NaCl, ya que se ha observado que se produce permeabilización celular debido al estrés osmótico (Nebe-Von Caron *et al.*, 1998 y Capítulo 3 de la presente Memoria).

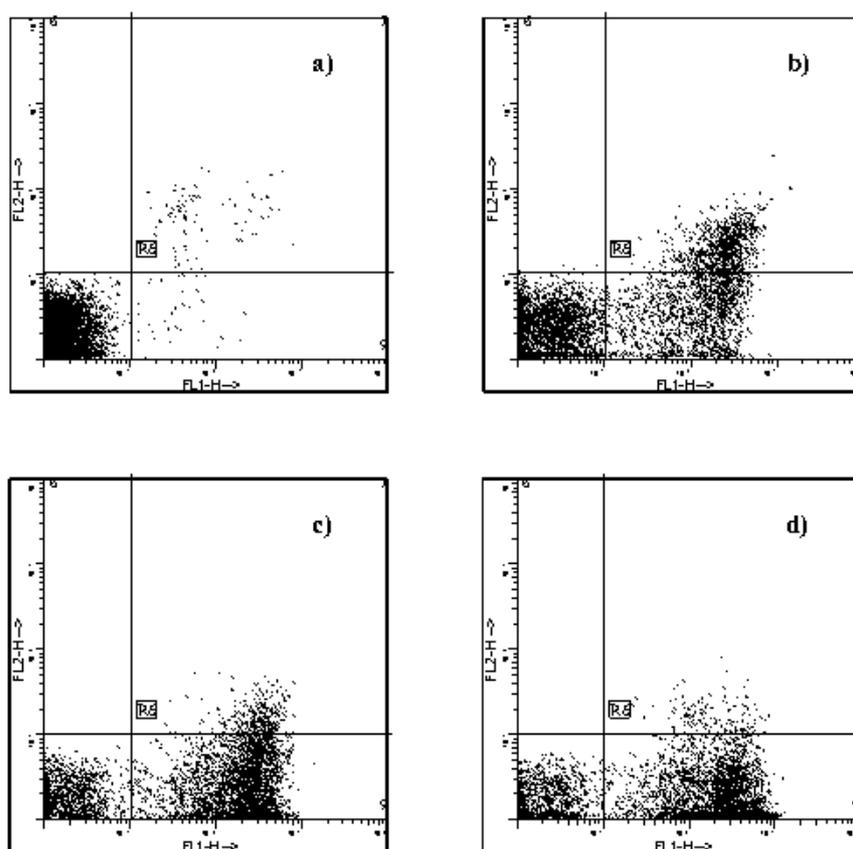
Además a las 48 horas, el 47,3% de población se teñía con BOX y las células muertas representaban el 2,3% de la población celular, con un gran descenso del canal medio de fluorescencia roja (de 366,7 a las 24 horas a 300,2 a las 48 horas). Este hecho se debió a los escasos ácidos nucleicos que permanecen en la célula, de forma que la mayoría de la población celular estaría constituida por fantasmas celulares, y se teñirían únicamente con BOX (Nebe-Von Caron *et al.*, 1998).



**Figura 6.9.** Análisis de la viabilidad durante la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina en presencia de NaCl, a partir de células de *E. coli* O44 K74 de un medio complejo anaerobio. Los resultados de viabilidad fueron calculados sumando los porcentajes de células teñidas con BOX y IP y restando el valor al 100%. Control (Δ) y NaCl (◻).

Al final del proceso el 80,4% del cultivo se teñía con BOX y el 1,5% de la población eran células muertas con material genético (Figura 6.10). Pero por la misma razón que a las 48 horas, la mayoría de las células serían fantasmas celulares, y se teñirían únicamente con BOX. Este medio siempre presentó un porcentaje de tinción con BOX mayor que el medio sin NaCl, probablemente debido al estrés osmótico que implica su presencia.

El canal medio de fluorescencia para células teñidas con BOX aumentó a lo largo del tiempo, de 487,8 a las 24 horas a 563,2 a las 72 horas.

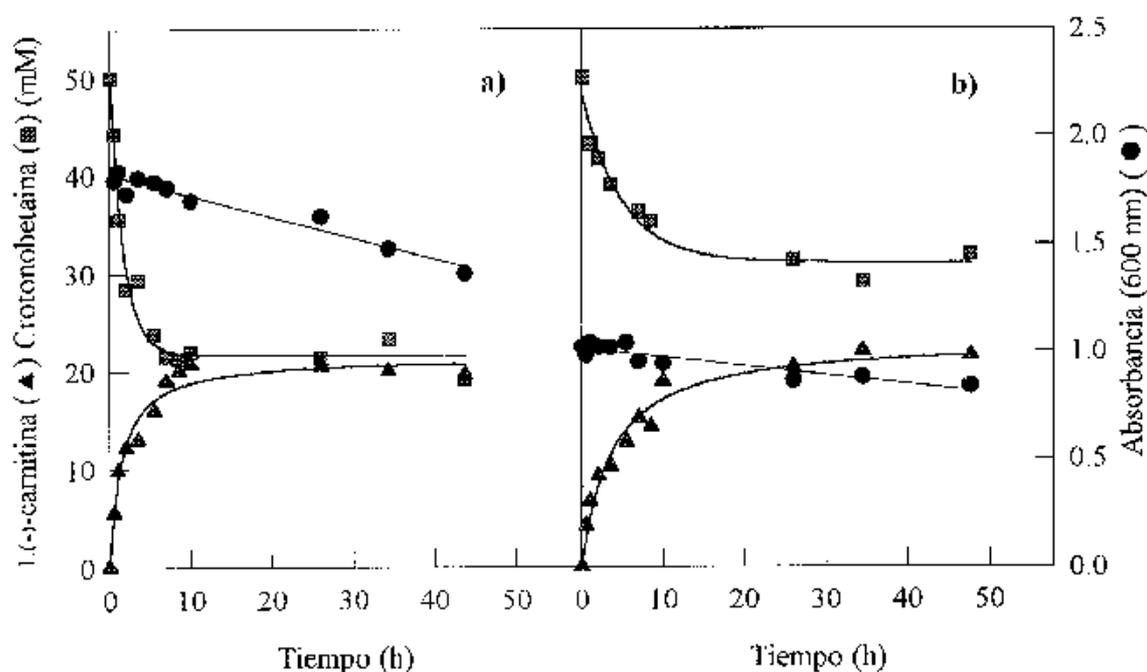


**Figura 6.10.** Análisis de la viabilidad durante la biotransformación de crotonobetaina en L(-)-carnitina en presencia de NaCl 0.5 M, a partir de células de *E. coli* O44 K74 de un medio complejo anaerobio. Tiempo a) 15 horas de un medio complejo anaerobio, los datos corresponden con el tiempo cero de biotransformación, b) 24 horas, c) 48

horas, y d). 72 horas. Los ensayos de viabilidad se realizaron con IP y BOX, tal y como se explica en correspondiente apartado de Materiales y métodos.

### 6.2.6. Evolución de la producción de L(-)-carnitina y de la biomasa, durante una biotransformación de crotonobetaina con células durmientes de *E. coli* O44 K74.

En la Figura 6.11, se representan las evoluciones del sustrato y del producto de la biotransformación con células durmientes de *E. coli* O44 K74, correspondientes al ensayo control que se presentan en las Figuras 6.7 a y 6.8. Como se puede observar a lo largo del proceso, se produjo una muy ligera disminución de la biomasa, mientras que siguió existiendo producción de L(-)-carnitina, alcanzando un equilibrio a tiempos diferentes.



**Figura 6.11.** Evolución de la biotransformación de crotonobetaina 50 mM con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente, crecidas en un medio complejo con fumarato. **a)** Biomasa 1,82 U de  $A_{600}$ , **b)** Biomasa utilizada 1,02 U de  $A_{600}$ . Crotonobetaina (■), L(-)-carnitina (▲), Biomasa ( $\lambda$ ).

Las células que se utilizaron en la biotransformación de crotonobetaina son células durmientes de *E. coli* O44 K74 procedentes de un medio complejo anaerobio que como ya se indicó dejaron de tener ácidos nucleicos detectables a las 72 horas (Figura 6.7 a). De hecho, a las 48 horas, existió un 40% de células teñidas con BOX

(Figura 6.8), de las cuales gran parte eran fantasmas celulares, así como a las 24 horas, cerca del 20% de las células estaban despolarizadas, representando células intactas que pueden ser viables pero no cultivables.

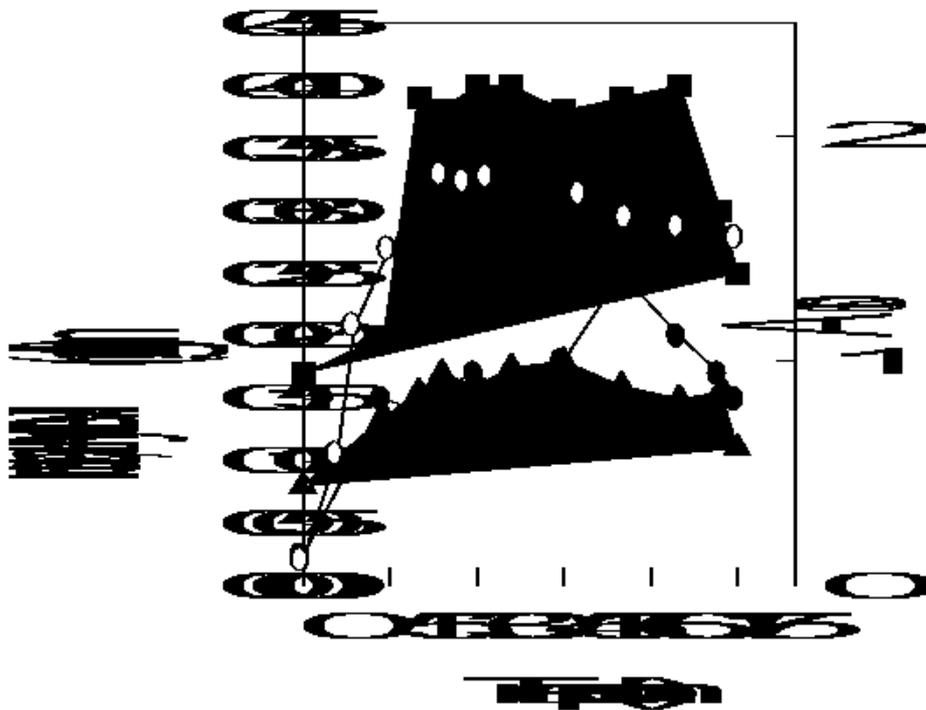
Todo ello lleva a la conclusión de que la biotransformación puede ser llevada a cabo por células muy dañadas e incluso muertas. Estos resultados demuestran que, en primer lugar, las medidas de absorbancia no generan una información adecuada sobre el estado fisiológico celular. En segundo lugar, se confirma que las células dañadas pueden realizar biotransformaciones, y que por lo tanto los estudios de viabilidad por citometría de flujo pueden ayudar a encontrar medios que permitan alargar la vida media biotransformante de las células bacterianas, mediante el uso de agentes que incrementen la estabilidad celular (polietilenglicol, glicerol, etc.).

#### **6.2.7. Evolución de la concentración de proteína, ARN y ADN de *E. coli* O44 K74 en medio complejo bajo condiciones anaerobias.**

Con objeto de determinar si la técnica de citometría de flujo podría seguir la evolución de la población total de células existentes en el medio del reactor, mediante medida de la concentración total de proteína, ADN o ARN, las células fueron sometidas a los protocolos de tinción y analizadas por citometría de flujo.

Como se puede observar en la Figura 6.12, las evoluciones de las concentraciones de proteína, de ARN y de ADN en mg/ml de medio de cultivo siguieron una curva de crecimiento, por lo que se podrían utilizar para describir la evolución de un cultivo bacteriano. La concentración de ADN y de ARN alcanzaron valores iguales al doble del valor inicial (de 0,08 a 0,16 mg/ml el ADN, y de 0,2 a 0,4 mg/ml el ARN), a un tiempo de 24 horas de crecimiento. En cambio, la concentración de proteína alcanzada desde el inicio fue el triple (de 0.05 a 0.5 mg/ml) al mismo tiempo (Figura 6.12).

Los valores de las concentraciones de proteína, ARN y ADN fueron obtenidos a partir de los datos de citometría de flujo por unidad de célula, y multiplicando por el número de células que corresponde a la absorbancia de la muestra, dato suministrado por el citómetro de flujo. García-Ochoa *et al.*, (1998) determinaron la concentración de proteína, ARN y ADN en *Xanthomonas Campestris*, por métodos bioquímicos, mediante fluorimetría y citometría de flujo, y en todos los casos se reprodujo una curva de crecimiento, lo que permitió utilizar la información obtenida para establecer modelos de crecimiento celular.



**Figura 6.12.** Evolución de un cultivo de *E. coli* O44 K74 bajo condiciones aerobias, en un medio complejo anaerobio. (v) Proteína, (v) ARN, (σ) ADN en mg/ml de medio de cultivo, y (μ) absorbancia medida a 600 nm.

Este trabajo demuestra la eficacia de la técnica de citometría de flujo para que, una vez calibrada oportunamente, puedan deducirse conclusiones no sólo sobre el estado fisiológico celular sino también cuantificar los componentes intracelulares que podrían representar la evolución de las distintas poblaciones celulares existentes en un reactor para su inclusión en modelos matemáticos.

### 6.3. Conclusiones.

1. Se observó una buena correlación entre la técnica de citometría de flujo y una técnica fluorimétrica, con un límite de detección de 0,02 fg/célula para la proteína, 0,01 fg/célula para el ARN y 0,005 fg/célula para el ADN, respectivamente.

2. La técnica de citometría de flujo permitió conocer los niveles de proteína, ARN y ADN durante las biotransformaciones realizadas bajo distintas condiciones, así como determinar de manera rápida y precisa los cambios fisiológicos en la población celular durante las diferentes fases de crecimiento y el propio estado durmiente celular.
3. La tinción simultánea de IP y BOX, permitió establecer que las poblaciones celulares existentes en el reactor discontinuo durante la biotransformación con *E. coli* O44 K74 en medio anaerobio de crecimiento se correspondieron con células viables y cultivables o células vitales.
4. Parte del proceso de biotransformación de crotonobetaina con células de *E. coli* O44 K74 en estado durmiente fue realizado por células muy dañadas o muertas, no obstante el rendimiento en L(-)-carnitina fue mayor en estas condiciones.

### 7.1. Reactivos utilizados.

L(-)-carnitina, D(+)-carnitina, y *trans*-crotonobetaina fueron suministrados por la empresa Biosint S.A. (Roma, Italia). El hidrolizado de caseína, la albúmina de suero bovino (ABS), el ácido desoxirribonucleico (ADN) tipo I de levadura, el ácido ribonucleico (ARN) tipo II de Calf Tymus, la lisozima de huevo, la ribonucleasa tipo I-A de páncreas bovino, la desoxirribonucleasa I de páncreas bovino, el yoduro de propidio (IP), el bromuro de etidio (BE), el isotiocianato de fluoresceína (FITC), acetilCoA, carnitina-acetiltransferasa (CAT), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), dimetil sulfóxido (DMSO), etilendiaminatetraacético tetrasódico hidratado (EDTA), 1-N-fenilnaftilamino (NPN), Tween 20, polietilenimina (PEI), acetil-fosfato, adenosina trifosfato (ATP), alcohol deshidrogenasa (ADH), bromuro de 3-[4',5'-dimetil-tiazol-2-il]-2,4-difeniltetrazolio (MTT), D,L-carnitina, citrato sintasa (CS), coenzima A (CoA), fenilhidrazina, D,L-isocitrato, malato deshidrogenasa (MDH), metasulfato de fenacina (PMS), nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( $\text{NADP}^+$ ), pirofosfato de tiamina (TPP), hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfonato potásico (HEPES), tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS) y piruvato fueron suministrados por Sigma Chem. Co. (St. Louis, EE.UU).

La peptona bacteriológica procedió de la firma Oxoid (Basingstoke, Inglaterra), y los casaminoácidos de los laboratorios Difco (Detroit, Michigan, E.E.U.U.). El ácido láctico y el Tritón X-100 fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Fumarato disódico anhidro y L(-)-malato sódico fueron suministrados por Fluka Chemie AG (Buchs, Switzeland). El ferricianuro sódico fue de Probus. La L[*N*-metil  $^{14}\text{C}$ ]carnitina fue de Amersham Pharmacia Biotech (Sverige, Suecia). El bis-(ácido 1,3-dibutilbarbiturico) trimetin oxonol (BOX) fue un producto de Molecular Probes (Eugene, Oregon, E.E.U.U.). El resto de sales y reactivos empleados fueron de grado analítico. El agua utilizada fue bidestilada y filtrada a través de un equipo Milli Q de Millipore. Todas las soluciones fueron previamente esterilizadas a su uso, por medio de una filtración a través de un filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 7.2. Microorganismos empleados.

Se han utilizado dos cepas de *Escherichia coli* amablemente cedidas por el profesor Kleber de la Universidad de Leipzig, Alemania, la *E. coli* O44 K74 y la *E. coli* K38 pT7-5 KE32, que fue construida por la profesora M.A. Mandrand-Berthelot (INSA, Lyon, Francia).

La cepa *E. coli* K38 pT7-5KE32 contiene el operón completo *cai* y el plásmido pGP1-2, Kanr que lleva el gen que codifica la enzima T7 ARN polimerasa bajo el control de un promotor inducible por calor  $\lambda$ pl. Este promotor es inhibido por un represor sensible a la temperatura (*cI857*) (Chang y Cohen, 1978). La cepa también contiene el plásmido pT7-5KE32, un derivado de pBR322, AMP<sup>r</sup>, que contiene inserto los genes *caiD*, *caiE* y *caiF*, del operón *cai* de *E. coli* clonados aguas abajo del promotor de la ARN polimerasa T7. Los genes *cai D* y *cai E* incluidos en pT7-5 KE32 están bajo el control del promotor del bacteriofago T7, mientras que el gen *cai F* se encuentra bajo el control de su propia región promotora (Eichler *et al.*, 1996). Así, la cepa transformada contiene un promotor de la enzima ARN polimerasa T7, termoinducible y con resistencia a ampicilina y kanamicina.

Las cepas se almacenaron como cultivos líquidos en fase exponencial en glicerol al 20 % (v/v) y a -20 °C.

## 7.3. Cultivo de los microorganismos.

El preinóculo de *E. coli* O44 K74 se creció en el medio mínimo descrito por Spencer y Guest (1973), cuya composición fue la siguiente en g l<sup>-1</sup>: glicerol, 12,60; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,44; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10,49; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,0; casaminoácidos, 0,50; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,05; Mn SO<sub>4</sub>. 4H<sub>2</sub>O, 0,05; Fe SO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,00013. El pH del medio se ajustó a 7,5 con KOH 0,1 M antes de su esterilización en autoclave. El cultivo se realizó en matraz erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio, bajo condiciones aeróbicas, en agitador orbital a 150 rpm, a 30 °C. El cultivo se inoculó con una concentración del 5 % (v/v) del cultivo líquido almacenado y se mantuvo en agitación durante 6 a 8 horas.

El crecimiento de las células y la inducción de las enzimas implicadas en el metabolismo de la carnitina se realizaron en un medio complejo compuesto en g/l por: peptona pancreática, 20,0; NaCl, 5,0; fumarato, 2,0; glicerol, 12,6 y crotonobetaina, 5,0 ó L(-)-carnitina, 3,0. La crotonobetaina y la L(-)-carnitina se utilizaron como inductores.

El pH del medio se ajustó a 7,5 con KOH 0,1 M, antes de su esterilización en autoclave. El cultivo se inoculó con un 5 % (v/v) del preinóculo en fase exponencial de crecimiento obtenido en las condiciones anteriormente descritas, y se incubó bajo condiciones anaerobias (en botella de 1.000 ml con mismo volumen de medio de cultivo sin agitación), o en condiciones aerobias (en matraz erlenmeyer de 1.000 ml con 250 ml de medio, a 150 rpm) a 37 °C, durante 8-24 horas.

El inóculo de *E. coli* K38 pT7-5 KE32 se cultivó bajo las mismas condiciones que en el caso de la cepa silvestre, con la excepción de que los medios estaban siempre suplementados con los antibióticos kanamicina (25 µg/ml) y ampicilina (50 µg/ml), añadidos justo antes de la inoculación del medio, previamente esterilizados por filtración a través de un filtro Millipore estéril de 0,22 µm.

#### **7.4. Obtención y biotransformación con células en estado durmiente.**

La obtención de células en estado durmiente se realizó por cultivo de las células en un medio complejo, bajo distintas condiciones de crecimiento e inducción enzimática, según el ensayo. Al final de la fase exponencial de crecimiento, las células se recogieron por centrifugación a 16.000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato 30 mM, de pH 7,5, y se resuspendieron en tampón fosfato potásico 67 mM, de pH 7,5. La concentración de biomasa se ajustó con el medio de biotransformación según ensayo.

Los experimentos de biotransformación se realizaron en matraces erlenmeyer de 50 ml con un volumen de reacción de 20 ml. Se realizaron ensayos bajo condiciones aerobias y anaerobias. La ausencia de oxígeno en los matraces se consiguió por un burbujeo continuo de nitrógeno, a la vez que se mantenía el sistema en agitación a 150 rpm. Las condiciones aerobias se alcanzaron exclusivamente con la agitación orbital a 150 rpm. Todos los ensayos se llevaron a cabo en condiciones estériles y se realizaron al menos por duplicado y los resultados obtenidos corresponden al valor medio de los ensayos realizados.

#### **7.5. Ensayos de transporte con L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina .**

El transporte de carnitina en *E. coli* O44 K74 y *E. coli* K38 pT7-5 KE32 se estudió mediante el uso de L[N-metil <sup>14</sup>C]carnitina (56 mCi/mmol) como sustrato. Las

células se crecieron hasta mitad de la fase exponencial en los medios complejo y mínimo descritos anteriormente, en presencia y ausencia de crotonobetaina como inductora del metabolismo de los compuestos de trimetilamonio y en presencia o ausencia de NaCl 0,5 M, dependiendo del experimento.

Posteriormente, las células se recogieron mediante centrifugación a 10.000 x g, 10 min y 4°C, se lavaron dos veces con tampón fosfato 67 mM, pH 7,5. A continuación, las células se resuspendieron en el mismo tampón hasta conseguir una  $A_{600nm}$  de aproximadamente 0,5, y conteniendo 10-20  $\mu$ M de L-[N-metil  $^{14}$ C]carnitina (5,6 mCi/mmol) en un volumen de reacción de 3 ml. Las muestras de 0,3 ml se extrajeron cada 30 s y se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m y 25 mm de diámetro. Posteriormente, los filtros se lavaron con 20 ml de medio isotónico, y la radiactividad retenida en los filtros se determinó en 2,5 ml de líquido de centelleo con un contador de líquido de centelleo Wallak 1409 (USA). Puesto que, las incubaciones de células con (energizadas) y sin (no energizadas) glicerol 0,1 M y fumarato 16 mM no causaron diferencias significativas en la medida del transporte de L(-)-carnitina, se utilizaron las células no energizadas en todos los ensayos de transporte. Además, la concentración de L-[N-metil  $^{14}$ C]carnitina adherida a la bacteria o al filtro o a ambos, se corrigió usando células inactivadas por calor.

Los ensayos cinéticos se realizaron a una concentración de L(-)-carnitina comprendida entre 1 y 40  $\mu$ M (5,6 mCi/mmol). Los citados ensayos, ya sean con células estresadas osmóticamente, o bien tratadas con reactivos modificadores de grupos sulfidrilo (Cu (II), Pb (II) y Hg (II)) o análogos del anión fosfato (arsenato y vanadato) o permeabilizadas con PEI, se realizaron con L-[N-metil  $^{14}$ C]-carnitina a una concentración final de 10-20  $\mu$ mol/l (5,6 mCi/mmol), por incubación durante 15-20 min, a 37 °C y agitación (150 rpm) en un agitador orbital. En los experimentos con vanadato y arseniato, el tampón fosfato fue reemplazado por tampón HEPES 50 mM a pH 7,5. En los ensayos de transporte con células permeabilizadas, éstas fueron centrifugadas a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C y lavadas dos veces con tampón fosfato 67 mM, pH 7,5, posteriormente al tratamiento con el agente permeabilizante. La velocidad de incorporación de L(-)-carnitina marcada se cuantificó en la unidades de nanomoles de carnitina incorporada por minuto y por miligramo de proteína celular.

## 7.6. Ensayos de permeabilización.

Las células recogidas mediante centrifugación, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, se permeabilizaron por resuspensión de las mismas en EDTA o ácido láctico, a distintas concentraciones, en tampón fosfato 67 mM de pH 7,5. Las células se utilizaron directamente en el proceso de biotransformación. Las células también se permeabilizaron mediante tratamientos con diferentes disolventes orgánicos (etanol, acetona, alcohol isopropílico y tolueno), detergentes (Tween 20 y Triton X-100) y PEI a diferentes concentraciones en tampón fosfato 67 mM, pH 7,5, y se incubaron a diferentes temperaturas y tiempos, mediante agitación y parada de 30 s y 1 min, respectivamente. Las células se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 min, se lavaron dos veces en el tampón anterior y se utilizaron inmediatamente en la biotransformación. Al medio extracelular se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry modificado por Hartree (1972), usando albúmina de suero bovino como estándar.

## 7.7. Medida de los cambios en la permeabilidad de la membrana y pared celular basados en la incorporación de 1-N-fenilnaptilamino (NPN).

Las células procedentes de la mitad de la fase exponencial de crecimiento celular se resuspendieron en tampón fosfato 67 mM de pH 7,5 con una densidad celular correspondiente a una  $A_{600}$  de  $2,00 \pm 0,01$ . La suspensión celular se permeabilizó según el caso (Apartado 7.6) y se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron en el mismo tampón para el ensayo de la incorporación de NPN según Helander y Matila-Sandholm, (2000). A 1 ml de la suspensión celular se le añadió NPN (1 mM en acetona) a una concentración final de 10  $\mu$ M. La fluorescencia generada por la incorporación de NPN se midió después de 30 s en un espectrofluorímetro Hitachi F-45000 (Kyoto, Japón), a una longitud de onda de excitación de 315 nm y de emisión de 420 nm respectivamente, y con una rendija de 5 nm. Los resultados se representaron como porcentaje de la fluorescencia obtenida respecto al control consistente en células intactas tratadas con NPN.

### **7.8. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).**

Las células de *E. coli* O44 K74 se fijaron con glutaraldehído al 3%, durante dos h a temperatura ambiente. Una vez fijadas se lavaron varias veces con tampón fosfato y se deshidrataron progresivamente por inmersión en una serie de mezclas etanol-agua de concentraciones crecientes de alcohol (10-90% a 90-10%). La tinción se realizó con acetato de uranilo seguida de una tinción con citrato. Las preparaciones se realizaron en un microtomo Reichert-Young y se examinaron en un microscopio electrónico Carl Zeiss EM 10 C.

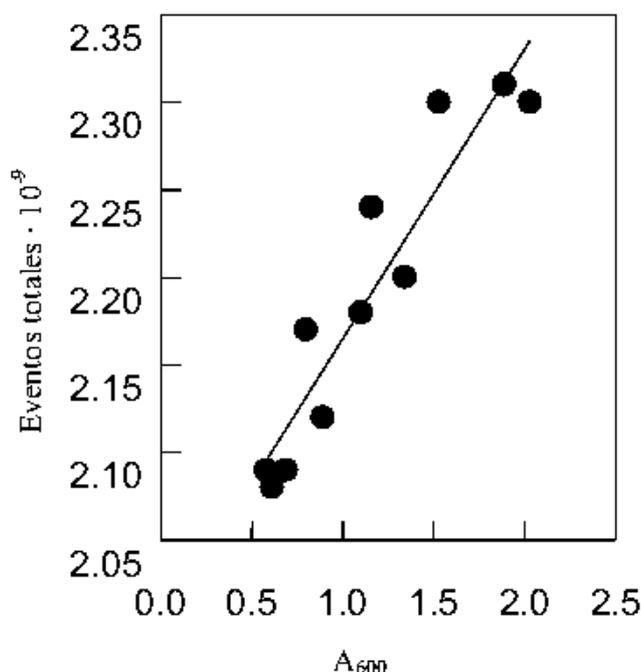
### **7.9. Determinación citométrica de la viabilidad celular.**

Para la determinación citométrica de la viabilidad celular se utilizó un citómetro Beckton Dickinson, modelo FASort (San José, California, E.E.U.U.), equipado con un rayo láser de argón, de una longitud de onda de excitación de 488 nm, y con tres filtros de fluorescencia: FL1, FL2 y FL3. El filtro FL1 es de 530 nm, adecuado para la detección del FITC y del BOX, mientras que el FL2 detectaba a 585 nm el IP y el BE, y el FL3 es de 650 nm. El sistema poseía tres velocidades de toma de muestra, una velocidad baja de 12  $\mu\text{l}/\text{min}$ , otra velocidad media de 35  $\mu\text{l}/\text{min}$ , y una velocidad alta de 60  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Las muestras teñidas, a una concentración celular de  $10^9$  células/ml, se diluyeron diez veces en tampón PBS de pH 7,2, una composición en  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de: NaCl, 8,00; KCl, 0,20;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,91;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,12. Las muestras así diluidas se introdujeron en el citómetro a velocidad baja, hasta la adquisición de un número fijo de células o eventos de 10.000.

Para el recuento celular se utilizó el método descrito por Nebe-Von Caron y Badley (1995), y se emplearon muestras celulares de absorbancia conocida ( $A_{600}$ ), previamente lavadas dos veces en tampón Tris/HCl de pH 7,4, en NaCl 0,1 M. Estas muestras se diluyeron 100 veces con tampón PBS y se midió la absorbancia a 600 nm en el citómetro a un tiempo de adquisición de 1 min. Se obtuvo una relación lineal entre la absorbancia y el número de partículas contadas por el citómetro (Figura 7.1).

La discriminación de detritos celulares se realizó con la dispersión FSC, ya que dieron resultados muy similares a los obtenidos mediante la fluorescencia de BE.



**Figura 7.1.** Relación lineal entre la absorbancia medida a 600 nm y el número de células o eventos que registró el citómetro, en las condiciones expuestas en el apartado 7.9. La ecuación de la recta ajustada por mínimos cuadrados fue de  $y=0,166x+1,999$ , con un coeficiente de correlación de  $r^2=0,8794$ .

Para la tinción con BE y FITC se emplearon células fijadas con glutaraldehído. La fijación se realizó durante 30 min, a 4°C. El volumen de muestra fue de 1 ml para las muestras procedentes de un medio con células en crecimiento y de 100 µl para las de un medio con células durmientes. Las muestras se centrifugaron en una centrifuga Mikro 22 (Hettich, Alemania) a  $10.800 \times g$  durante 2 min, y el precipitado obtenido se resuspendió en 200 µl de glutaraldehído al 3%. Una vez finalizada la fijación, las células se lavaron tres veces con 1 ml de tampón Tris/HCl 0,1M de pH 7,4, en NaCl 0,1 M y finalmente se resuspendieron en este mismo tampón.

La tinción con FITC se realizó a una concentración de 30 µg/ml en tampón Tris/HCl 0,1 M de pH 7,4, en NaCl 0,1 M con EDTA 1 mM, en un volumen de reacción de 1 ml a temperatura ambiente y con una concentración celular de  $10^9$  células/ml. Al cabo de 6 h las células se centrifugaron a  $10.800 \times g$  y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, el precipitado se resuspendió dos veces durante 15 min en tampón

Tris/HCl 0,1 M de pH 7,4, en NaCl 0,1 M, con el fin de eliminar el colorante no fijado. Finalmente, la muestra se volvió a resuspender en el tampón Tris/HCl citado. Las muestras conservaron prácticamente la misma lectura de fluorescencia almacenadas durante 1 mes, a 4°C y en oscuridad.

La tinción con BE se realizó a una concentración de colorante de 100 µg/ml, preparado a partir de BE de 1 mg/ml en agua. El tampón utilizado para la tinción fue el mismo que para la tinción con FITC, pero sin EDTA. La tinción se llevó a cabo en un volumen de reacción de 1 ml a temperatura ambiente, con una concentración celular de 10<sup>9</sup> células/ml. Al cabo de 15 min se retiró el colorante por centrifugación de la muestra a 10.800 × g y se desechó el sobrenadante. Luego se realizó un lavado de 15 min en el mismo tampón empleado para la tinción, con el fin de eliminar el colorante sobrante. Finalmente, las células se resuspendieron en el tampón de tinción. Las muestras conservaron prácticamente la misma lectura de fluorescencia almacenadas durante 1 mes, a 4°C y en oscuridad.

Para determinar la viabilidad, las células se tiñeron conjuntamente con los colorantes IP y BOX. El IP se empleó a una concentración de 5 µg/ml (preparada a partir de una solución de IP de 1 mg/ml en agua) y el BOX a una concentración de 10 µg/ml (preparada a partir de una solución de BOX de 2 mg/ml en DMSO) (Hewitt *et al.*, 1998, 1999 a y b, 2000). El tampón utilizado fue Tris/HCl 0,1 M de pH 7,4, en NaCl 0,1M con EDTA 4 mM. El volumen de reacción fue de 0,5 ml. La tinción se realizó a temperatura ambiente durante 10 min. Las células empleadas no se lavaron ni se fijaron, y se tiñeron prácticamente en el momento de su recolección.

Para compensar la fluorescencia de los colorantes BOX y IP se realizaron los correspondientes blancos con células de *E. coli* 044 K74 tratadas previamente a 60°C durante 5 min y teñidas con BOX y IP, respectivamente (Hewitt *et al.*, 1998, 1999 a y b, 2000).

#### **7.10. Determinaciones fluorimétricas de proteína, ARN y ADN.**

Para la determinación de los contenidos de proteína, ARN y ADN de las células, se empleó un fluorímetro modelo FLUOSTAR de la firma BGM (Offenburg, Alemania), y se realizaron en una placa costar de 96 pocillos (Costar, New York, E.E.U.U.). En cada pocillo se depositó un volumen de muestra de 100 µl con agitación

orbital de 3 mm antes de cada medida, con una duración de 3 s, y se recogieron datos en tres ciclos de 20 s cada uno. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente. De las tres medidas realizadas en cada ciclo se calculó la media aritmética.

Para detectar la fluorescencia del BE se excitó con una luz de 485 nm, y se registró la intensidad de fluorescencia a 590 nm, mientras que para detectar la fluorescencia del FITC se excitó a 485 nm, y se registró la intensidad de luz emitida a 520-35 nm.

Para realizar el calibrado del fluorímetro se midió la fluorescencia de muestras patrón de proteína, ARN y ADN, respectivamente. En el caso de la medida de proteína, se preparó una solución patrón de 2 ml de BSA, a la concentración de 1 g/l, y se incubó con FITC, a una concentración de 0,1 g/l, durante 20 min. La solución de BSA con FITC se preparó en tampón Tris/HCl 0,1 M, de pH 7,4, en NaCl 0,1 M. Tras la incubación, el colorante en exceso se eliminó mediante la elución de la solución a través de una columna de 8 × 1 cm, con una fase estacionaria de Sephadex G50, y una fase móvil de Tris/HCl 0,1 M, de pH 7,4, en NaCl 0,1 M. El FITC no unido a la proteína utilizada se retuvo en la columna, y el volumen eluido en el volumen muerto de la columna correspondió a la proteína unida al FITC. En base a que el eluido de la columna, de un volumen de 2 ml, tenía una concentración de proteína teñida con FITC de 1 g/l, se realizaron diluciones en el mismo tampón Tris/HCl, para tener unas concentraciones de proteína teñida con FITC en un rango desde 0,02 a 0,2 mg/ml. Estas diluciones se analizaron por fluorimetría en las condiciones ya descritas. Posteriormente, la solución de BSA teñida con FITC procedente de la columna se realizó por el método de Lowry modificado por Hartree (1972), usando BSA como estándar.

Para realizar la recta de calibrado que relaciona la señal producida por el fluorímetro con la concentración de ARN, se prepararon diluciones de concentración conocida de ARN en un rango desde 0,02 a 0,2 mg/ml, a partir de una solución de 2 mg/ml, en tampón Tris/HCl 0,1 M, de pH 7,4, en NaCl 0,1 M. Estas soluciones se incubaron con BE 20 µg/ml durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se midió la fluorescencia generada en las condiciones ya descritas. En este caso, el BE que no se une al ARN no es eliminado, por lo que fue necesario usar un blanco para medir en el fluorímetro. Este blanco consistió en una disolución de BE 20 µg/ml en tampón Tris/HCl 0,1 M, de pH 7,4, en NaCl 0,1 M. Se utilizó BE 20 µg/ml en lugar de 100

µg/ml (tal y como se emplea para teñir ácidos nucleicos en células enteras) ya que se obtiene la misma fluorescencia al existir saturación.

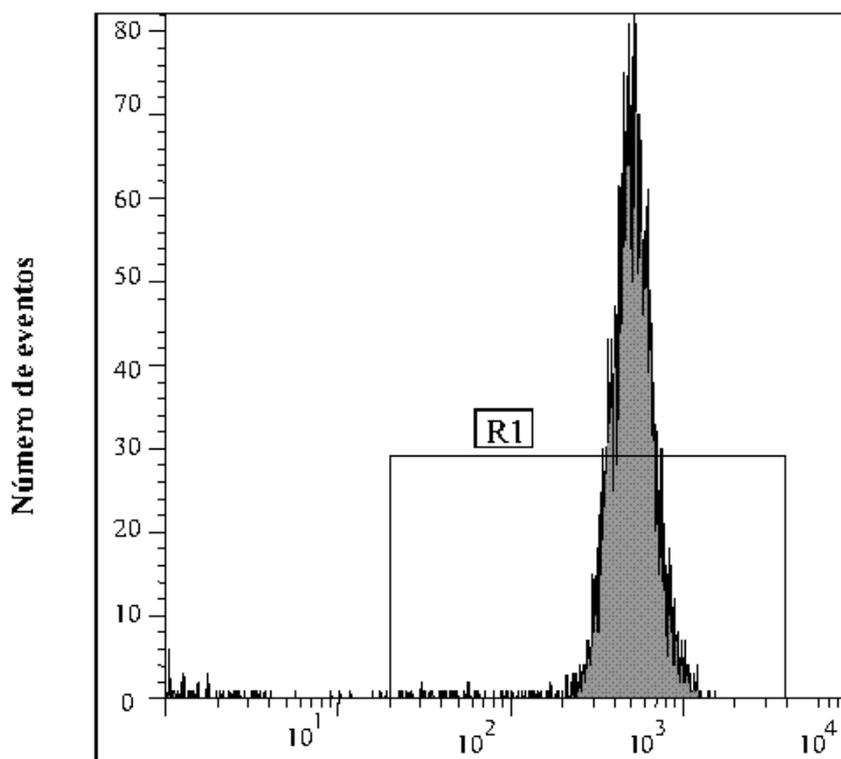
Finalmente, para realizar la recta de calibrado para el ADN, se prepararon diluciones de concentración conocida, en el mismo rango de concentraciones que para el ARN, a partir de una solución de concentración de 1 mg/ml en ADN, en tampón Tris/HCl 0,1 M, de pH 7,4, en NaCl 0,1 M. Estas soluciones se tiñeron y se analizaron de la misma forma que las muestras de ARN.

### **7.11. Tratamiento de las células con RNasa o DNasa.**

Para los ensayos se emplearon 250 µl de células previamente teñidas con BE. Este volumen se centrifugó a  $10.800 \times g$  durante 2 min. Se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron las células en 45 µl del tampón correspondiente para el tratamiento enzimático. En el caso de la RNasa el tampón consistió en Tris/HCl 50 mM, de pH 7,4, con  $MgCl_2$  5 mM, previamente filtrado por 0,22 µm, mientras que para el tratamiento con DNasa el tampón fue Tris/HCl 0,1 M, de pH 7,4, en NaCl 0,1 M, con  $MgCl_2$  10 mM, también filtrado por 0,22 µm. A la suspensión celular se le añadieron 5 µl de la solución enzimática de RNasa o DNasa de 10 mg/ml, por lo que la concentración de enzima en el medio de reacción fue de 1 mg/ml. Cada solución enzimática se preparó en el tampón de reacción correspondiente. Una vez añadida la enzima, se dejó transcurrir la reacción en un baño termostatzado a 37°C durante una hora.

### **7.12. Histogramas y gráficas de puntos.**

Los resultados que se obtuvieron en un citómetro de flujo se representaron en forma de histogramas o gráficas de puntos. En un histograma se representa la distribución de células respecto a un parámetro, como puede ser el tamaño de la partícula (FSC), la fluorescencia (FL1, FL2 o FL3), etc.



### FL1

**Figura 7.2. Representación del nº de eventos frente a la fluorescencia verde.** Tinción con FITC de una muestra de células de *E. coli* 044 K74, procedente de un medio complejo anaerobio de 25 h.

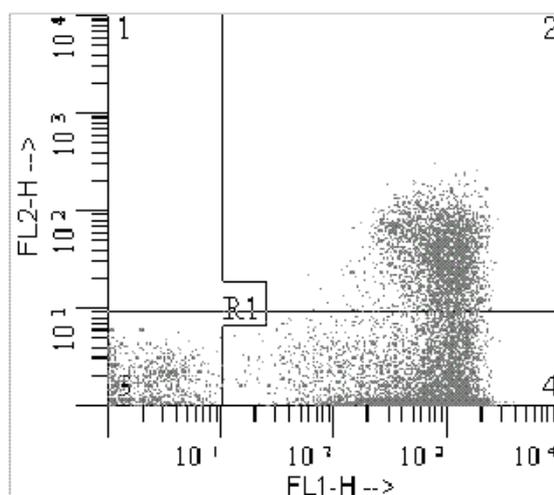
A partir del histograma se puede obtener:

- El coeficiente de variación de la muestra para el parámetro representado.
- La fluorescencia media de la muestra (como canal medio de fluorescencia, media lineal o media geométrica).
- El porcentaje de la población de células de una región concreta que tiene un valor determinado de uno de los parámetros representados.

En la Figura 7.2 se representa un histograma del número de células (eventos) frente a la fluorescencia verde (FL1) para células teñidas con FITC. Este tipo de representación se empleó tanto para las células teñidas con FICT como para las teñidas con BE, por lo que se representó el número de células frente a la fluorescencia verde (FL1) y frente a la roja (FL2), respectivamente. De estas representaciones se obtuvo el canal medio de fluorescencia de la muestra, con una resolución de 1024 canales.

En cambio, en una gráfica de puntos se representa la distribución de células respecto a dos parámetros medibles. Estas gráficas se usan para:

- Ver subpoblaciones de eventos.
- Crear regiones de células.



**Figura 7.3. Representación de la fluorescencia roja frente a la fluorescencia verde.** Células de *E. coli* 044 K74 tratadas con calor a 60°C durante 5 min, y teñidas con BOX y IP.

No obstante, también se pueden obtener los valores del coeficiente de variación de la muestra para cada uno de los parámetros representados, así como el valor medio de estos parámetros, y el porcentaje de una población que posee un parámetro determinado.

En la Figura 7.3 se representa la fluorescencia roja (FL2) frente a la verde (FL1), de células de *E. coli* 044 K74 que se tiñeron con IP y BOX. El FL1 corresponde a fluorescencia de células que se tiñeron con BOX, y el FL2 la de células que fijaron IP. Así, en el cuadrante inferior izquierdo se muestran las células no teñidas, en el inferior derecho las células teñidas con BOX, y en el superior derecho las células teñidas con IP y BOX. Las gráficas de puntos se han representando en escala logarítmica, sin embargo los datos se recogen como canal medio de fluorescencia, con una resolución de 1024 canales.

### 7.13. Determinación de biomasa.

La determinación de biomasa se realizó espectrofotométricamente a 600 nm en un espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). Las muestras se lavaron dos veces con tampón fosfato potásico 30 mM de pH 7,5 y se diluyeron en el

mismo tampón hasta que las absorbancias medidas fueron menores de 0,4. Los valores de absorbancia a 600 nm se relacionaron con los correspondientes de biomasa expresada en peso seco. El peso seco se determinó mediante calentamiento en estufa a 105 °C hasta peso constante de las distintas diluciones de la suspensión celular en tampón fosfato potásico 3 mM de pH 7,5. La ecuación de la recta obtenida que relaciona la absorbancia a 600 nm y el peso seco en g/l fue la siguiente:

$$Y(A_{600})=2,89 \times (g \text{ l}^{-1}) + 0,0065, r^2=0,9991.$$

#### **7.14. Determinación de las actividades enzimáticas.**

La optimización de las condiciones de ensayo de los métodos utilizados para determinar las actividades de las enzimas ensayadas en el presente trabajo, excepto los de carnitina deshidratasa y crotonobetaina reductasa, se realizó por variación de las concentraciones de cada uno de los reactivos implicados en los ensayos de actividad, el pH y la temperatura. Las citadas optimizaciones dieron como resultado la utilización de menores concentraciones en algunos reactivos, sin que disminuyera la sensibilidad de los protocolos propuestos en la bibliografía.

Para la preparación de los extractos enzimáticos se tomaron muestras de los reactores y se centrifugaron durante 8 min a 16,000 x g y 4 °C. Una vez retirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en el correspondiente tampón de extracción, según la enzima a ensayar. Posteriormente, se rompieron las células por sonicación con 6 ciclos de 10 s cada uno a una amplitud de 10 µm, y con una sonda de 1 cm de diámetro, controlando que la temperatura de la suspensión no superara los 20 °C. El extracto fue centrifugado durante 15 min a 16.000 x g y 4 °C, para retirar los restos celulares. El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático para el ensayo de actividad.

La determinación de la cantidad de proteína en cada extracto, se realizó por el método de Lowry modificado por Hartree (1972), usando BSA como estándar. La actividad específica se definió como las unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína.

#### 7.14.1. Isocitrato deshidrogenasa.

El método que se utilizó para la medida de la actividad de isocitrato deshidrogenasa fue el descrito por Bennett y Holms (1975). Para la extracción de la enzima, se utilizó un tampón fosfato potásico 64,5 mM de pH 7,5, con MgCl<sub>2</sub> 6,45 mM. La actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa fue medida siguiendo el incremento de absorbancia del NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro con célula termostaticada a 37 °C (GBC 918 U/V, Australia). La mezcla de reacción contenía D,L-isocitrato 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y NADP<sup>+</sup> 0,2 mM, en tampón fosfato potásico 64,5 mM de pH 7,5. La reacción se inició con 50 µl de extracto enzimático.

La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 µmol de NADPH por minuto bajo las condiciones de ensayo.

#### 7.14.2. Isocitrato liasa.

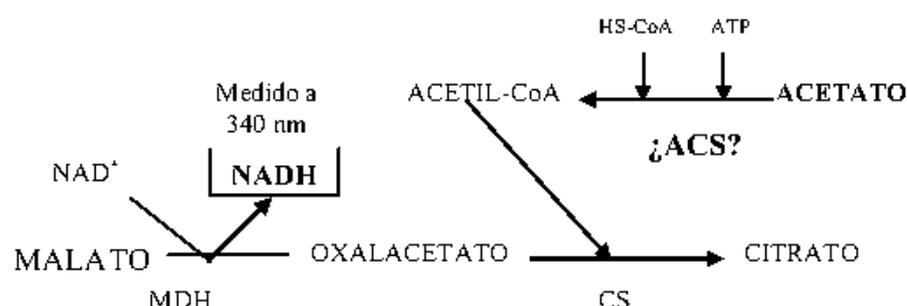
El ensayo enzimático utilizado fue desarrollado por Dixon y Konberg (1959). La extracción de la enzima se realizó utilizando tampón fosfato potásico 64,5 mM de pH 7,5, con MgCl<sub>2</sub> 6,45 mM. La actividad de la enzima isocitrato liasa fue medida siguiendo el incremento de absorbancia del complejo originado por el glioxilato formado y la fenilhidrazina adicionada a 324 nm ( $\epsilon_{\text{complejo}} = 17.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro con célula termostaticada a 37 °C (GBC 918 U/V, Australia). La mezcla de reacción contenía D,L-isocitrato 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y fenilhidracina 20 mM, en tampón fosfato potásico 64,5 mM de pH 7,5. La reacción se inició añadiendo 50 µl de extracto enzimático.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 µmol del complejo glioxilato-fenilhidrazina por minuto en las condiciones de ensayo.

#### 7.14.3. Acetil-CoA sintetasa.

El método utilizado fue el establecido por Brown *et al.*, (1977). Para la extracción de la enzima se utilizó tampón fosfato potásico 64,5 mM, de pH 7,5, con  $\beta$ -

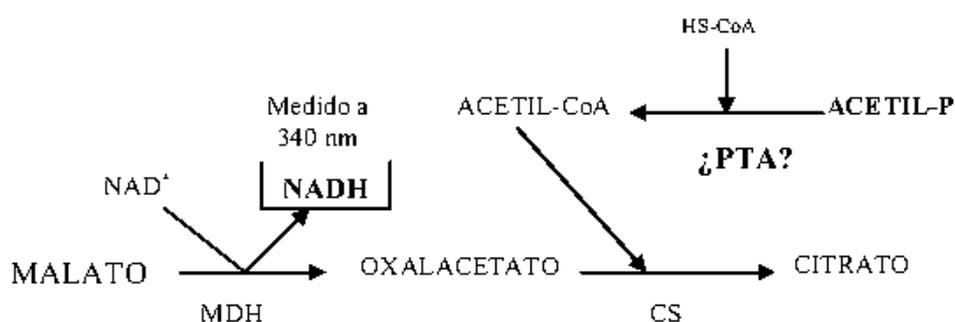
mercaptoetanol 1 mM. La actividad de la enzima acetil-CoA sintetasa fue ensayada siguiendo el incremento de absorbancia de NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro con célula termostatzada a 45 °C (GBC 918 U/V, Australia). La mezcla de reacción contenía D,L-malato 5 mM, ATP 4 mM, HS-CoA 0,1 mM,  $\text{NAD}^+$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, malato deshidrogenasa (MDH) 2,5 U, citrato sintetasa (CS) 0,4 U y 50  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático, en tampón Tris-HCl 100 mM de pH 7,8. La reacción se inició con acetato sódico 100 mM como sustrato de la reacción tal como se presenta en el siguiente esquema:



La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto en las condiciones de ensayo.

#### 7.14.4. Fosfoacetilasa.

El ensayo enzimático utilizado fue el descrito por Lundie y Ferry (1989). Para la extracción de la enzima se utilizó tampón HEPES 50 mM de pH 7,2 con  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM. La actividad de la fosfoacetilasa fue medida siguiendo el incremento de absorbancia de NADH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro con célula termostatzada a 37 °C (GBC 918 U/V, Australia). La mezcla de reacción contenía D,L-malato 10 mM, HS-CoA 0,1 mM,  $\text{NAD}^+$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, malato deshidrogenasa (MDH) 2,5 U, citrato sintetasa (CS) 0,4 U y 100  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático, en tampón Tris-HCl 250 mM pH 7,8. La reacción se inició con acetil fosfato 5 mM como sustrato de la reacción catalizada por la enzima, tal y como se presenta en el siguiente esquema:



La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto en las condiciones de ensayo.

#### 7.14.5. Complejo piruvato deshidrogenasa.

El método de medida utilizado fue el de De Graef *et al.*, (1999). Para la extracción de la enzima se utilizó tampón fosfato potásico 50 mM de pH 7,0, con EDTA 0,1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y  $\text{MgCl}_2$  3 mM. La actividad del complejo piruvato deshidrogenasa fue ensayada midiendo la disminución de la absorbancia del ferricianuro potásico a 430 nm ( $\epsilon_{\text{ferricianuro}} = 1.030 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por su reducción a ferrocianuro, en un espectrofotómetro con célula termostaticada a 37 °C (GBC 918 U/V, Australia). La mezcla de reacción contenía HS-CoA 0,1 mM,  $\text{NAD}^+$  1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pirofosfato de tiamina (TPP) 0,045 mM, ferricianuro potásico 10 mM y 100  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático, en el mismo tampón que para la extracción. La reacción se inició con la adición de piruvato 5 mM como sustrato del complejo.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu\text{moles}$  de ferrocianuro por minuto en las condiciones de ensayo.



mismo protocolo, pero con tampón en vez de muestra. Previamente se realizó una recta de calibrado con soluciones de L(-)-carnitina de concentración conocida.

La unidad de actividad enzimática para carnitina deshidratasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar 1  $\mu\text{mol}$  de carnitina por minuto en las condiciones de ensayo.

#### 7.14.7. Crotonobetaina reductasa.

El método de medida utilizado fue el de Preusser *et al.*, (1999). Para la extracción de la enzima se utilizó tampón fosfato potásico 50 mM de pH 7,5. La actividad crotonobetaina reductasa se determinó mediante la disminución de absorbancia al oxidarse el bencilviológeno a 600 nm ( $\epsilon_{\text{bencilviológeno}} = 7.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro (GBC 918 U/V, Australia). La reacción se realizó en condiciones anaerobias, en una cubeta cerrada de 1,5 ml. La mezcla de reacción contenía bencilviológeno 0,75 mM, ditionito sódico 2 mM, enzima en un volumen adecuado de ensayo (50-100  $\mu\text{l}$ ) y tampón fosfato potásico 67 mM de pH 7,5, burbujeado previamente con  $\text{N}_2$  para desplazar el oxígeno del tampón. La reacción se inició con crotonobetaina 30 mM como sustrato de la reacción.

La unidad de actividad enzimática crotonobetaina reductasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de bencilviológeno por minuto en las condiciones de ensayo.

#### 7.15. Determinación de la concentración de metabolitos relacionados con el metabolismo de *E. coli*.

Con objeto de observar la evolución del metabolismo de *E. coli* durante el crecimiento y la biotransformación se determinaron las concentraciones de ATP, la relación de  $\text{NADH/NAD}^+$ , Acetil-CoA, Coenzima A, acetato, fumarato, lactato, formiato, piruvato, carnitina y crotonobetaina a diferentes tiempos.

### 7.15.1. ATP.

Para la medida de la concentración celular de ATP se utilizó un ensayo de bioluminiscencia, basado en la emisión de luz dependiente de ATP producida por la enzima luciferasa, en la oxidación del sustrato luciferina. La intensidad de luz emitida se midió a 562 nm en un fluorímetro FluoStar (BGP, Alemania).

El kit utilizado fue el Bioluminescence Assay Kit HS II, de Boehringer Mannheim, Alemania, compuesto por la enzima luciferasa, ATP estándar para el calibrado, un tampón de dilución y un tampón de lisis. Los dos tampones fueron sustituidos por tampón Tris-HCl 100 mM de pH 7,75 y por un método de lisis consistente en utilizar primeramente el dimetilsulfóxido (DMSO) para la rotura celular y seguido de la adición de tampón Tris-HCl 100 mM de pH 7,75.

Las muestras de cultivo a analizar se centrifugaron previamente a 16.000 x g durante 8 min a 4 °C. El precipitado, se resuspendió en tampón Tris-HCl hasta obtener una  $A_{600}$  comprendida entre 4 y 6 unidades. Se tomaron 100  $\mu$ l de la suspensión celular y se le adicionaron 100  $\mu$ l de tampón de lisis celular, A continuación se incubó la disolución resultante durante 5 min a temperatura ambiente, y al término del cual se determinó el contenido en ATP midiendo a la fluorescencia 562nm..

La concentración de ATP se expresó en  $\mu$ mol/g de peso seco. El peso seco de células se determinó de acuerdo con lo expresado en el apartado 7.13. La concentración intracelular se calculó asumiendo un volumen intracelular de  $1,63 \mu\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Emmerling *et al.*, 2000).

### 7.15.2. NADH/NAD<sup>+</sup>.

El método enzimático y de extracción de metabolitos fue descrito por Snoep *et al.*, (1990). La determinación del poder reductor celular se realizó mediante la determinación de las concentraciones celulares de NADH y NAD<sup>+</sup>, respectivamente, y su expresión como el cociente NADH/NAD<sup>+</sup>. El método consistió en la reducción de NAD<sup>+</sup> llevada a cabo por la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la reducción de MTT, utilizando como transportador de electrones el PMS. La reacción catalizada por la enzima se midió a 570 nm en un espectrofotómetro con célula termostatizada a 35 °C (GBC 918 U/V, Australia).

Las extracciones del NADH y del NAD<sup>+</sup> se realizaron utilizando dos métodos diferentes, dependiendo si se quería medir la forma reducida (NADH) o la oxidada (NAD<sup>+</sup>). Para el NADH, se realizó una extracción básica con KOH y una incubación durante 10 min a 100 °C, mientras que para el NAD<sup>+</sup> se utilizó una extracción ácida con HCl incubando 10 min a 25 °C. Así para 1 ml de muestra se añadió 1ml de KOH (0,3N) o HCl (0,3N). Tras la incubación de las muestras, éstas se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 min y se neutralizaron con HCl (0,3 N) para NADH y con KOH (0,3 N) para NAD<sup>+</sup>, hasta obtener un pH de 7,5 para las muestras de NADH y de 6,5 para las de NAD<sup>+</sup>.

La mezcla de reacción para la determinación de NADH y NAD<sup>+</sup> contenía tampón fosfato 67 mM de pH 7,5, 50 µl de MTT 8,4 mM, 50 µl de PMS 33,2 mM, 10 µl de etanol (96%) y el extracto a ensayar 500 µl. La mezcla de reacción se incubó durante 3 min a 35 °C, y se inició la reacción con 10 µl de alcohol deshidrogenasa (ADH) (900 U·ml<sup>-1</sup>). Previamente se realizó una recta de calibrado de la actividad enzimática respecto a la concentración de NADH o NAD<sup>+</sup>.

### 7.15.3. Acetil-CoA y coenzima A.

Las medidas de las concentraciones de acetil-coenzima A (acetil-CoA) y coenzima A (HS-CoA) se realizaron por HPLC mediante una modificación del método de De Buysere y Olson (1983). El equipo utilizado fue un cromatografo Shimadzu SCL-10 A (Shimadzu Co., Kyoto, Japón) equipado con una columna µ-Bondapak<sup>TM</sup> C18 Millipore (4,5 mm x 25 cm) protegida con una precolumna (4,5 mm x 4 cm), empaquetada con una fase C<sub>18</sub>. El efluente de la columna fue monitorizado a 254 nm por un detector Lambda-Max, mod. 481, (Millipore<sup>®</sup>, Waters, EE.UU.) y registrado por un integrador Hewlett-Packard 3392 A (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, California, EE.UU.). La fase móvil estaba compuesta por una fase A (85%), consistente en tampón fosfato potásico 120 mM de pH 4,0 con β-mercaptoetanol al 0,05% y una fase B (15%), constituida de metanol/cloroformo 98/2 (v:v). La velocidad de elución fue de 0,8 ml·min<sup>-1</sup>. Los tiempos de retención fueron 8,8 min para el acetil-CoA y 13,9 min para el Coenzima A. El volumen de inyección fue de 20 µl.

Para la extracción del acetil-CoA y el Coenzima A, se tomó 1 ml de medio de cultivo y se separaron las células por centrifugación a 11.800 x g durante 10 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 100 µl de ácido fórmico 1N y se agitó durante 15 s,

cada 5 min durante 30 min. Durante la extracción las muestras se mantuvieron en hielo. Para el análisis, las muestras se neutralizaron con 100 µl de fosfato potásico dibásico 1M. Finalmente se centrifugaron a 11.800 x g durante 5 min y los sobrenadantes se utilizaron para analizar los contenidos en acetil-CoA y CoenzimaA.

#### **7.16. Determinación de los metabolitos procedentes del metabolismo anaerobio de *E. coli*.**

Los metabolitos medidos fueron productos del metabolismo anaerobio de *E.coli*, a saber: acetato, fumarato, lactato, formiato y piruvato. La determinación de las concentraciones se realizó mediante HPLC, con el mismo equipo descrito en el apartado anterior. La columna utilizada fue una Spherisorb-amino. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo/fosfórico 65/35 (v:v) de pH 4,7. La velocidad de elución fue de 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. El efluente se monitorizó a 207 nm. Se prepararon patrones de cada uno de los compuestos de una concentración de 0,5 g·l<sup>-1</sup>. Los tiempos de retención para estos patrones fueron de 9,4 min para acetato sódico, 17 min para fumarato sódico, 21 min para lactato sódico, 28 min para ác. fórmico y 32 min para piruvato sódico. Como estándar interno se utilizó el malato sódico.

Las muestras procedentes de los medios de cultivo, se sometieron previamente a centrifugación, 11.800 x g durante 10 min a 4 °C, para separar las células. Las muestras tomadas de los medios complejos se diluyeron 1:50, mientras que las procedentes de los medios mínimos lo fueron 1:25. El volumen de inyección fue de 20 µl.

#### **7.17. Determinación de los metabolitos procedentes del metabolismo de carnitina.**

Las concentraciones de carnitina total y de crotonobetaina se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución. Para ello se utilizó un equipo de HPLC equipado con dos bombas LC-6A, un detector de fotodiodos SPD-M6A y un sistema de inyección automático SIL 9A (Shimadzu, Kyoto, Japón), así como con una columna Tracer Spherisorb-NH<sub>2</sub> de 3 µm y dimensiones de 25 x 0,46 cm, suministrada por Teknokroma (Barcelona, España). La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM, pH 4,6), 70/30 (v/v) a un flujo isocrático de 1 ml/min. El pH se ajustó con ácido fosfórico al 85 % y la detección se realizó a 205 nm.

Las muestras se diluyeron en tampón fosfato potásico hasta que las concentraciones se encontraran dentro del rango lineal de medida. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l.

La cuantificación de carnitina total y crotonobetaina se realizó por el método del estándar externo. Se obtuvieron las siguientes rectas de calibrado para ambos compuestos:

La recta de calibrado de crotonobetaina fue:

$$\text{Área} = 4604114,0245 [\text{Crotonobetaina (mM)}] - 9,0545, r^2 = 0,9993$$

La recta de calibrado de carnitina fue:

$$\text{Área} = 40577,4 [\text{Carnitina (mM)}] - 8,1450, r^2 = 0,9995$$

La concentración de D(+)-carnitina se calculó mediante la diferencia entre la carnitina total cuantificada mediante HPLC y la L(-)-carnitina determinada mediante ensayo enzimático descrito en 7.14.6.

- Akerlund T., Nordström K. y Bernander R. (1995) Analysis of cell size and DNA content in exponential growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **77**, 6791-6795.
- Amanullah, A., Hewitt, C.J., Nienow, A.W., Lee, C., Chartrain, M., Buckland, B.C., Drew, S. y Woodley, J.M. (2002) Application of multi-parameter flow cytometry using fluorescent probes to study substrate toxicity in the indene bioconversion. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 239-249.
- Amanullah, A., Hewitt, C.J., Nienow, A.W., Lee, C., Chartrain, M., Buckland, B.C., Drew, S. y Woodley, J.M. (2003) Measurement of strain-dependent toxicity in the indene bioconversion using multiparameter flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 405-420.
- Alakomi, H.L., Skyttä, A., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K y Helander, I.M. (2000) Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Env. Microbiol.* **66**, 2001-2005.
- Alvarez-Vasquez, F., Cánovas, M., Iborra, J.L. y Torres, N.V. (2002) Modeling, optimization and experimental assessment of continuous L(-)-carnitine production by *Escherichia coli* cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 794-805.
- Aragozzini, F., Manzoni, M., Cavazzoni, V. y Craveri, R. (1987) D,L-carnitine resolution by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 95-98.
- Ayres, H.M, Furr, J.R y Russell, A.D. (1999) Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Let. Appl. Microbiol.* **28**: 13-16
- Bailey, J.E. (1991) Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-1675.
- Bennett, P.M. y Holms, W.H. (1975) Reversible inactivation of the isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli* ML308 during growth on acetate. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 37-51.
- Betz, J.W., Aretz, W. y Hartel, W. (1984) Use of flow cytometry in industrial microbiology for strain improvement programs. *Cytometry.* **5**, 145-150.
- Bieber, L.L. (1988) Carnitine. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 261-283.
- Boye E. y Løbner-Olesen A. (1991) Bacterial growth control studied by flow cytometry. *Res. Microbiol.* **142**, 131-135.
- Bremer, J. (1983) Carnitine in intermediary metabolism. The biosynthesis of palmitoylcarnitine by cell subfractions. *J. Biol. Chem.* **238**, 2774-2779.

- Brenningstall, G.N. (1990) Carnitine deficiency syndromes. *Pediatr. Neurol.* **6**, 75-81.
- Brown, T.D., Jones-Mortimer, M.C. y Konberg, H.L. (1977) The enzymatic interconversion of acetate y acetyl coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 327-336.
- Boye, E. y Løbner-Olesen. (1990) Flow cytometry: Illuminating microbiology. *New Biol.* **2**, 119-125.
- Buchet, A., Nasser, W., Eichler, K. y Mandrand-Berthelot, M.A. (1999) Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator. *Mol. Microbiol.* **34**, 562-575.
- Button, D.K, y Robertson, B. (2001) Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometr. *Appl. Env. Microbiol.* **67**, 1636-1645.
- Cairney, J., I. R. Booth y C. F. Higgins. (1985) *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J. Bacteriol.* **164**, 1218-223.
- Calvani, M. y Arrigoni-Martelli, E. (1999) Attenuation by octyl-carnitine of neurological damage and metabolical derangements following brain ischemia and perfusion. *Tissue React.* **21**, 1-6.
- Calvani, M., Reda, E. y Arrigoni-Martelli, E. (2000) Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic. Res. Cardiol.* **95**, 75-83.
- Cánovas, M, Maiquez, J.R., Diego, T., Buendía, B., Espinosa, G. e Iborra, J.L. (2001) Production of L(-)-carnitine in membrane reactor systems by *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains. Modelling of the process. En: *Proceedings of Engineering with membranes*. (Luque, S. y Álvarez, J.R. Ed.). Vol. I. pp.23-28. Elsevier. Granada
- Cánovas, M., Maiquez, J.R., Obón, J.M. e Iborra, J.L. (2002) Modelling of the biotransformation of crotonobetaine into L(-)-carnitine by *Escherichia coli* strains. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 764-75.

- Carelli, A. Borghi, A., Carrano, L., Gastaldo, L. y Marinelli, F. (1995) Biotransformation of the lipoglycopeptide antibiotic A40926 by *Actinoplanes teichomyceticus* cells. *J. Ind. Microbiol.* **15**, 429-433.
- Cassey, B., Guest, J.R. y Attwood, M.M. (1998) Environmental control of pyruvate dehydrogenase complex expression in *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **159**, 325-329.
- Castellar M.R., Cánovas M., Kleber H-P. e Iborra J.L. (1998) Biotransformation of D(+)-carnitine by resting cells of *Escherichia coli* O44 K74. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 883-890.
- Castellar, M.R., Obón, J.M., Marin, A., Cánovas, M. e Iborra, J.L. (2001) L(-)-carnitine production using a recombinant *Escherichia coli* strain. *Enzyme. Microb. Technol.* **28**, 785-791.
- Chang, A.C.Y. y Cohen, S.N. (1978) Construction and characterisation of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Chisholm, J.J.jr. (1970) Screening techniques for undue lead exposure in children: Biological and practical consideration. *J. Pediatr.* **79**, 719-738.
- Chohan, S., Izawa, H., Nishihara, H. y Takamura, Y. (1998) Changes in size of intracellular pools of coenzyme A and its thioesters in *Escherichia coli* K-12 cells to various carbon sources and stresses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1122-1128.
- Cole S.T. Colon C., Lemire B.D y Weiner J.H. (1985) Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **811**. 381-403.
- Crissman H.A., Darzynkiewicz Z., Tobey R.A. y Stenkamp J.A. (1985) Correlated measurements of DNA, RNA, and protein in individual cells by flow cytometry. *Science* **288**, 1321-1323.
- Cronan, J.E. y La Porte, D. (1996) Tricarboxylic acid cycle and glyoxilate bypass. En: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. (Neidhardt, R. Curtis, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M.

- Riley, M. Schaechter y H.E. Umbarger 2<sup>nd</sup> ed). Vol I. pp. 206-216. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Csonka, L. M. (1991) Prokariotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569-606.
- Czok, R. y Lamprecht, W. (1974) Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. En: Methods of enzymatic analysis. Vol III. pp. 1446-1451. Academic press, Inc., New York, N. Y.
- Dâmelio, V., G. Russo y D. Ferraro. (1974) The effects of heavy metals on protein synthesis in crustaceans and fish. *Rev. Int. Oceanograph. Med.* **33**, 111-118.
- Davey H.M. y Kell D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* **60**, 641-696.
- De Buysere, M.S. y Olson, M.S. (1983) The analysis of acyl-coenzyme A derivatives by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **133**, 373-379.
- De Graef, M.R., Alexeeva, S., Snoep, J.L. y Teixeira, M.J. (1999) The steady-state internal redox state (NADH/NAD) reflects the external redox state and is correlated with catabolic adaptation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **18**, 2351-2357.
- Denton, R.M. (1976) Hormonal regulation of fatty acid synthesis in adipose tissue through changes in the activities of pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1) and acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2). *Proc. Nutr. Soc.* **34**, 217-224.
- Degelau, A., Freitag, R., Linz, F., Middendorf, C., Scheper, T., Bley, T., Müller, S., Stoll, P. y Reardon, K.F. (1992) Immuno and flow cytometric analytical methods for biotechnological research and process monitoring. *J. Biotechnol.* **25**, 115-144.
- Dixon, G.H. y Konberg, H.L. (1959) Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochemistry* **72**, 3.

- Dropsy, E.P. y Klivanov, A. M. (1984) Cholinesterase-catalysed resolution of D,L-carnitine. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 911-915.
- Eichler, K., Bourgis, F., Buchet, A., Kleber, H-P. y Mandrand-Berthelot, M-A. (1994a) Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **13**, 775-786.
- Eichler, K., Schunck, W-H., Kleber, H-P. y Mandrand-Berthelot, M-A. (1994b) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Escherichia coli* gene encoding carnitine dehydratase. *J. Bacteriol.* **176**, 2970-2975.
- Eichler, K., Buchet, A., Bourgis, F., Kleber, H-P. y Mandrand-Berthelot, M-A. (1995) The *fix* *Escherichia coli* region contains four genes related to carnitine metabolism. *J. Basic. Microbiol.* **35**, 217-227.
- Eichler, K., Buchet, A., Lemke, R., Kleber, H-P. y Mandrand -Berthelot, M-A. (1996) Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcription activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 1248-1257.
- El-Mansi, EMT. (1998) Control of metabolic interconversion of citrate dehydrogenase between the catalytically active and inactive form in *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **166**, 333-339.
- Elssner, T., Preusser, A., Wagner, U. y Kleber, H.P. (1999) Metabolism of L(-)-carnitine by Enterobacteriaceae under aerobic conditions. *FEMS. Microbiol. Lett.* **15**, 295-301.
- Elssner, T., Henning, L., Frauendorf, H., Haferburg, D. y Kleber, H-P. (2000) Isolation, identification and synthesis of butyrobetainyl-CoA and crotonobetainyl-CoA, compounds involved in carnitine metabolism of *E. coli*. *Biochemistry* **39**, 10761-10769.
- Elssner, T., Engemann, C., Baumgart, K. y Kleber, H.P. (2001) Involvement of coenzyme A esters and two new enzymes and enoyl-CoA hydratase and a CoA-transferase, in the hydration of crotonobetaine to L-carnitine by *Escherichia coli*. *Biochemistry* **18**, 11140-48.

- Emmerling, M., Bailey, J.E. y Sauer U. (2000) Altered regulation of pyruvate kinase or co-overexpression of phosphofructokinase increases glycolytic fluxes in resting *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. Biotechnol.* **67**, 623-627.
- Engel, P., Krämer, R., y Uden G. (1992) Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system. *J. Bacteriol.* **174**, 5533-5539.
- Engemann, C., Ellsner, T. y Kleber, H.P. (2001a) Biotransformation of crotonobetaine to L(-)-carnitine in *Proteus sp.* *Arch. Microbiol.* **175**, 353-359.
- Engemann, C. y Kleber, H.P. (2001b) Epigenetic regulation of carnitine metabolising enzymes in *Proteus sp.* under aerobic conditions. *FEMS. Microbiol. Lett.* **1**, 1-6.
- Felix. H. (1982) Permeabilized cells. *Anal Biochem.* **120**, 211-234.
- Fiorini, M. y Valentini, C. (1982) Method for preparing L(-)-carnitine. *Eur. Paten. Appl. EP.* 60595.
- Flores, M.V., Voget, C.E y Ertola, R.J.J. (1994) Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 340-346.
- Fritz, I.B. y Yue, K.T.N. (1963) Long chain acylcarnitine acyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine. *J. Lipid Res.* **4**, 279-288.
- Galabova, D., Tulueva, B. y Spasova, D. (1996) Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 18-22.
- Galindo, E. y Salcedo, G. (1996) Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. *Enzyme. Microb. Technol.* **19**, 145-149.
- García-Ochoa F., Santón V.E. y Alcón A. (1998) Intracellular compound quantification by means of flow cytometry in bacteria: Application to xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 87-94.
- Glassker, E., E.H.M.L., Heuberger, W.N., Konings y B. Polman. (1998) Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (OacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **180**, 5540-5546.

- Gokhale, D.V., Bastawde, K.B., Patil, S.G., Katkote, U.R., Joshi, R.R Ranvindranathan, T., Gaikwad, B.G., Jogdand, V.V. y Nene, S. (1996). Chemoenzymatic synthesis of D(-)-phenylglycine hydantoinase of *Pseudomonas desmolyticum* resting cells. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 353-357.
- Goulas, P. (1988) Purification and properties of carnitine dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta.* **957**, 335-339.
- Hanschmann, H., Doß, A. y Kleber, H.P. (1994) L(-)-carnitine dehydratase in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 371-376.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- Helander, I.M., Alakomi, H., Latva-Kala, K. y Koski, P. (1997) Polyethylenimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiolology* **143**, 3193-3199.
- Helander, I.M., Latva-Kala, K. y Lounatmaa, K. (1998) Permeabilization action of polyethyleneimine on *Salmonella typhimurium* involves disruption of the outer membrane and interactions with lipopolysaccharide. *Microbiology* **144**, 385-390.
- Helander, I.M., y Mattila-Sandholm, T. (2000) Fluorometric assessment of Gram-negative bacterial permeabilization. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 213-219.
- Hewitt, C.J., Boon, L.A., Mc Farlane, C.M. y Nienow A.W. (1998) The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **59**, 612-621.
- Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Nienow, A.W. y Mc Farlane, C.M. (1999a) The use of multiparameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *J. Biotechnol.* **75**, 251-264.
- Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Nienow, A.W. y Mc Farlane, C.M. (1999b) Use of multi-staining flow cytometry to characterise the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 705-711.

- Hewitt, C.J., Nebe-Von Caron, G., Axelsson, B., Mc Farlane, C.M., Nienow A.W. (2000) Studies related to the fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: effect of a changing microenvironment with respect to glucose and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 381-390.
- Hoeks, F.W.J.M.M., Mühle, J., Böhlen, L., y Psenicka, I. (1996) Continuous cell recycle process for L(-)-carnitine production engineering and downstream processing aspects compared with discontinuous processes. *Chem. Eng. J.* **61**, 53-61.
- Hofmeyr, J.H.S. y Cornish-Bowden, A. (1991) Quantitative assessment of regulation in metabolic systems. *Eur. J. Biochem.* **200**, 223-236.
- Jepras, R.L., Carter, J., Pearson, C., Paul, F.E. y Wilkinson, M.J. (1995) Development of a robust flow cytometry assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 2696-27001.
- Jung, K., Jung, H. y Kleber, H-P. (1987) Regulation of L(-)-carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* **27**, 131-137.
- Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1989) Purification and properties of carnitine dehydratase from *Escherichia coli*. A new enzyme of carnitine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1003**, 270-276.
- Jung, H., K. Jung y H.P. Kleber. (1990a) L(-)-carnitine metabolism and osmotic stress response in *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* **30**, 409-413.
- Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1990b) L(-)-carnitine uptake by *Escherichia coli*. *J. Basic. Microbiol.* **30**, 507-514.
- Jung, H. y Kleber, H-P. (1991) Metabolism of D(+)-carnitine by *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 393-395.
- Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44.
- Jung, H., Buchholz, M., Clausen, J., Nietschke, M., Revermann, A., Schmid, R. y Jung, K. (2002) CaiT of *E. coli* is a new transporter catalyzing L-carnitine/ $\gamma$ -butyrobetaine exchange. *J. Biol. Chem.* **277**, 89251-89258.
- Kaiser, M. y Sawers, G. (1994) Pyruvate formate-lyase is not essential for nitrate respiration by *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **117**, 163-168.

- Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. (1992) Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 410-422.
- Kaprelyants, A.S. y Kell, D.B. (1993) Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: Flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Env. Microbiol.* **87**, 3187-3196.
- Karp, P., Diley, M., Saier, M., Paulsen, IT., Paley, S. y Pellegrini-Toole, A. (2002) The EcoCyc database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 56-58.
- Kawamura, M., Akutsu, S., Fukuda, H., Hata, H., Morishita, T., Kano, K. y Nishimori, H. (1987) Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 62, 118, 899. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Kempf, B. y Bremer E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**, 319-30.
- King, M.A. (2000) Detection of dead cells and measurements of cell killing by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **243**, 155-166.
- Kleber, H-P. (1997) Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**, 1-9.
- Kleman, G.L. y Strohl, W.R. (1994) Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high cell density fermentation. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 3952-3958.
- Knappe, J. y Sawers, G. (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**, 383-398.
- Kondo, A., Blanchard, JS. Y Englard, S. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 338. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Koo, S-P., F. Higgins y I.R. Booth. (1991) Regulation of compatible solute accumulation in *S. typhimurium*: evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2617-2625.
- Kröger, A. (1987) Fumarate as terminal acceptor of phosphorylative electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* **505**, 129-145.

- Kumari, S., Tishel, R., Eisenbach, M. y Wolfe, A. (1995) Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 2878-2886.
- Kumari, S., Simel, E., Wolfe, A. (2000a)  $\rho^{70}$  is the principal sigma factor responsible for transcription of *acs*, which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 551-554.
- Kumari, S., Beatty, C.M., Browning, D.F., Busby, S.J., Simel, E.J., Hovel-Miner, G. y Wolfe, A.J. (2000b) Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 4173-4179.
- Lalitha, R.G., Nandita, B. y Santhoor, G.B. (1991) Permeabilization of Bakers' yeast by cetylmethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 154-157.
- Lange, J., Thome, P. y Lynch, N. (1997) Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 1557-1567.
- Lebaron, P. y Joux, F. (1994) Flow cytometry analysis of the cellular DNA content of *Salmonella typhimurium* and *Alteromonas haloplanktis* during starvation and recovery in seawater. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 4345-4350.
- Lee, Y., y Chang, H.N. (1990) High cell density culture of recombinant *E. coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 330-337.
- Lee, Y-H., Chu, W-S. y Hsu, W-H. (1994) Bioconversion of cephalosporin C with D-amino acid oxidase from the yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnol. Lett.* **16**, 467-472.
- Leonardo, M.R., Daylly, Y. y Clark, D.P. (1996) Role of NAD in regulating the *adhE* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 6013-6018.
- Le Rudulier, D., Strom, A.R., Dandekar, A.M., Smith, L.T. y Valentine, R.C. (1984) Molecular biology of osmoregulation. *Science* **244**, 1064-1068.
- Lisle, J.T., Pyle, B.H. y Mcfeters, G.A. (1999) The use of multiple indices of physiological activity to assess viability in chloride disinfected *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microb.* **29**, 42-47.

- Liu, Y., Hama, H., Fujita, Y., Kondo, A., Inoue, Y., Kimura, A. y Fukuda, H. (1999) Production of S-Lactoylglutathione by high activity whole cell biocatalysts prepared by permeabilization of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with alcohols. *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 54-60.
- López-Amorós R., Comas J. y Vives-Rego J. (1995) Flow cytometry assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Appl. Env. Microbiol.* **61**, 2521-2526.
- Lundie, L.L. y Ferry, J.G. (1989) Activation of acetate by *Methanosarcina thermophila*. *J. Biol. Chem.* **264**, 18392-18396.
- MacMillan, S., Alexander, D., Culham, D., Kunte, H., Marshall, E., Rochon D. y Wood, J. (1999) The ion coupling and organic substrate specificities of osmoregulatory transporter ProP in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1420**, 30-44.
- Martinac, B., Alder, M. y Kung, J. (1990) Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* **348**, 261-263.
- Mason, D.J., Allman, R., Stark, J.M. y Lloyd, D. (1994) Rapid estimation of bacterial antibiotic susceptibility with flow cytometry. *J. Microsc.* **176**, 8-16.
- Mason, D.J., López-Amorós R., Allman R., Stark J.M. y Lloyd D. (1995) The ability of membrane potential dyes and calcofluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 309-315.
- Meier, P.J. (1987) D-Carnitin, harmlos? En: *Carnitin in der Medizin*. (Gitzelmann, R. Baerlocher, K. y Steinman, B. Eds.). pp.101-104. Shattauer, Stuttgart, New York.
- Michielsen, M.J.F., Meijer, E.A., Wijffels, R.H., Tramper, J. y Beeftink, H.H. (1998). Kinetics of D-malate production by permeabilized *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 621-628.
- Midgley, M. (1987) An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E. coli*. *Microbiol. Sci.* **4**, 125-128.
- Müller, D.M. y Strack, E. (1972) Razematspaltung von D,L carnitin. *Hoppe-Seyler's. Physiol.* **353**, 618-622.

- Mutafov, S., Angelova, B., Auramova, T., Boyadjieva, L. y Dimova, I. (1997) The inducibility of  $9\alpha$ -steroid hydroxylating activity in resting *Rhodococcus sp.* Cells. *Process Biochem.* **7**, 585-589.
- Naidu, G.S.N., Lee, I.Y., Lee, E.G., Kang, G.H. y Park, Y.H. (2000) Microbial and enzymatic production of L-carnitine. *Bioprocess Eng.* **23**, 627-635.
- Naidu, G.S.N., Lee, I.Y., Cho, O.K. y Park, Y.H. (2001) Conversion of  $\gamma$ -butyrobetaine to L-carnitine by *Achromobacter cycloclast*. *J. Ind. Microbiol.* **26**, 309-315.
- Nakayama, K., Yuki, O., Honda, H., Okta, T. y Ozawa, T. (1989a) *Eur Patent Appl.* EP 319 344. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Nakayama, K., Hamo, H., Ogawa, T. y Ota, T. (1989b) *Jpn. Kokai Tokkyo JP.* 01222796. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Nakayama, K., Honada, H., Ogawa, KY., Ozawa, T. y Tetsuo, O. (1989c) *Jpn. Kokai Tokkyo JP.* 01222797. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Nebe-Von Caron, G. y Badley, R.A. (1995) Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *J. Microsc.* **179**, **1**, 55-66.
- Nebe-Von Caron, G., Stephens, P. y Badley R.A. (1998) Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 988-998.
- Nebe-Von Caron, G., Stephens, P., Hewitt, C.J., Powell, J.R. y Badley, R.A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Methods* **42**, 97-114.
- Newsholme, E.A. y Crabtree, B. (1973) Metabolic aspects of enzyme activity regulation. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **27**, 429-460.
- Obón, J. M., Maiquez, J.R., Cánovas, M., Kleber, H-P. e Iborra, J.L. (1997) L(-)-carnitine production with immobilized *Escherichia coli* cells in continuous reactors. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 531-536.

- Obón, J. M., Maiquez, J.R., Cánovas, M., Kleber, H-P. e Iborra, J.L. (1999) High-density *Escherichia coli* cultures for continuous L(-)-carnitine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 760-764.
- Park, Y-M, Choi, E-S y Rhee, S-K. (1994) Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Lett.* **16**,345-348.
- Peggy, R y Borum. Disturbances in carnitine metabolism (1985) Meeting held at Imperial College, pp. 681-683. London, on 18-20 December.
- Pinder, A.C., Purdy, P.W., Pouldter, S.A.G y Clark, D.C. (1990) Validation of flow cytometry for rapid enumeration of bacterial concentration in pure cultures. *J. Appl. Microbiol.* **69**, 92-100.
- Poolman, B. y Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solutes accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**, 397-407.
- Pore, R.S. (1994) Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**, 613-627.
- Porter J., Edwards C. y Pickud R.W. (1995) Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J. Appl. Bacteriol.* **179**, 399-408.
- Preusser, A., Wagner, U., Elssner, T. y Kleber, H.P. (1999) Crotonobetaine reductase from *Escherichia coli* consists of two proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1431**, 166-178.
- Quail, MA., Haydon, D.J. y Guest, J.R. (1994) The *pdhR-aceEF-ldp* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol. Microbiol.* **2**, 95-104.
- Quail, M.A. y Guest, J.R. (1995) Purification, characterisation and mode of action of PdhR, the transcriptional repressor of the *pdhR-aceEF-ldp* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **15**, 519-529.
- Ramirez, JL. (2002) Análisis del metabolismo primario y secundario de *E. coli* O44 K74 en la biotransformación de compuestos trimetilamonio en L(-)-carnitina. Tesina. Universidad de Murcia.
- Rebouche, C.J. y Paulson, D.J. (1986) Carnitine metabolism and function in humans. *Ann. Rev. Nutr.* **6**, 41-66.

- Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K.F. y Scheper, T. (2001) Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 350-360.
- Riondet, C., Cachon, R., Wache, Y., Alcaraz, G. y Divies, C. (2000) Extracellular oxireduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 620-626.
- Ritz, M., Tholozan, J.L., Federighi, M. y Pilet, M.F. (2001) Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2240-2247.
- Roberson, B.R., Button, D.K. y Koch, A. (1998) Determination of the biomasses of small bacteria at low concentration in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3900-3909.
- Roth, S., Jung, K., Jung, H., Hommel, R.K. y Kleber, H-P. (1994) Crotonobetaine reductase from *Escherichia coli*. A new inducible enzyme of anaerobic metabolism of L-(-)-carnitine. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 63-69.
- Ryan, W. y Parulekar, S. (1991) Immobilization of *Escherichia coli* JM103[pUC8] in *k*-carrageenan coupled with recombinant protein release by in situ cell membrane permeabilization. *Biotechnol. Prog.* **7**, 99-110.
- San, K-Y., Bennett, G., Berrios-Rivera, S., Vadali, R., Yang, Y-T., Horton, E., Rudolph, F., Sariyar, B. Y Blackwood, K. (2002) Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **4**, 182-192.
- Seim, H., Ezold, R., Kleber, H-P. y Strack, E. (1980) Stoffwechsel des L-Carnitins bei Enterobakterien. *Z. Allg. Mikrobiol.* **20**, 591-594.
- Seim, H., Löster, H. y Kleber, H-P. (1982) Reduktiver Stoffwechsel des L-Carnitins und strukturverwandter trimethylammoniumverbindungen in *Escherichia coli*. *Acta Biol. Med. Germ.* **41**, 1009-1018.
- Seim, H. y Kleber, H-P. (1988) Synthesis of L-(-)-carnitine by hydration of crotonobetaine by enterobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 538-544.

- Seim, H., Eichler, K. y Kleber, H-P. (2001) L(-)-carnitine and its precursor,  $\gamma$ -butirotobetaine. *Nutraceuticals in Health and Disease Prevention*. (K., Hoppe, P.L. y Packer, L., eds.). pp, 217-256. Marcel Dekker, Inc., New York Basel.
- Seo, J-H. y Bailey, J.E. (1987) Cell cycle analysis of plasmid-containing *Escherichia coli* HB101 populations with flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 297-305.
- Shi, C. (1984) Verfahren zur herstellung von L-carnitin und zwischenprodukte für das verfahren. Patente D-OS 3344085 A1.
- Shin, S., Song, S.G., Lee, D.S., Pan, J.G. y Park, C. (1997) Involvement of *iclR* and *rpoS* in induction of *acs*, the gene for acetyl coenzyme A synthetase of *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**, 103-108.
- Shurtliff, M.M., Parkin, F.G., Member, ASCE, Weathers, L.J. y Gibson, D.T. (1996) Biotransformation of trichloroethylene by a phenol-induced mixed culture. *J. Env. Engin.* **122**, 581-589.
- Sigiura, A., K. Hirokswaa, K. Nakashima y T. Mizuno. (1994) Signal-sensing mechanisms of the putative osmosensor KdpD in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **14**, 929-938.
- Sih, C. (1985) Verfahren zur herstellung von L-carnitin und zwischenprodukte für das verfahren. *D-OS*, 3344085 A1.
- Snoep, J.L., De Graef, M.R., Westphal, A.H., De Kok, A., Teixeira de Mattos, M.J y Neijssel, O.M. (1993) Differences in sensitivity to NAD of purified pyruvate dehydrogenase complexes of *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*: implications for their activity in vivo. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**, 63-66.
- Soriano, E., Borth, N., Katinger, H. y Mattanovich, D. (1999) Flow cytometry analysis metabolic stress effects due to recombinat plasmids and proteins in *Escherichia coli* production strains. *Metab. Eng.* **1**, 270-274.
- Soriano, E., Borth, N., Katinger, H. Mattanovich, D. (2002) Optimization of recombinant protein expression level in *Escherichia coli* by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 93-98.
- Soupe, J., Haurat, G. Goulas, P. (1987) *Eur. Patent. Appl. EP.* **240**, 423. (Op Cit. Jung, H., Jung, K. y Kleber, H-P. (1993) Synthesis of L(-)-carnitine by

- microorganisms and isolated enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **50**, 21-44).
- Spencer, M.E. y guest, J.R. (1973) Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **114**, 563-570.
- Stephanopoulos, G. (1998) Metabolic engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 119-120.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, P. y Kung. C. (1997) Mechanosensitive channels of *Escherichia coli*: the MscL gene, protein, and activities. *Ann. Rev. Physiol.* **59**, 633-657.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1074-1078.
- Tanke, HJ. y Van der Keur, M. (1993) Selection of defined cell types by flow-cytometric cell sorting. *Trends Biotechnol.* **11**, 55-62.
- Tholozan, J.L., Cappellet, J.M., Tissier, J.M., Delattre, G. y Federighi, M. (1999) Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Env. Microbiol.* **65**, 1110-1116.
- Uden, G. y Trageser, M. (1991) Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein. *Anthonie van Leeuwenhoek* **59**, 65-76.
- Upadhy, R., Nagajyothi, H y Bhat, S.G. (1999) D-Amino acid oxidase and catalase of detergent permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its potential use for the synthesis of  $\alpha$ -keto acids. *Process Biochem.* **35**, 7-13.
- Vaara, M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* **56**, 395-411.
- Van der Waarde, J.J., Kok, R. y Janssen, D.B. (1993) Degradation of 2-chloroallyl alcohol by *a Pseudomonas sp.* *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 528-535.
- Vandecasteele, J.P. y Lemal, J. (1980) Reductive enzymic synthesis of L-carnitine with regeneration of the NADH used. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 528-535.
- Vaz, FM y Wanders, RJ. (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J.* **361**, 417-429.

- Veal D.A., Deere D., Ferrari B., Piper J. y Attfield P.V. (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods*. **243**, 191-210.
- Verheul, A., Rombouts, F.M., Beumer, R.R. y Abee, T. (1995) An ATP-dependent L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes* Scot A is involved in osmoprotection. *J. Bacteriol.* **177**, 3205-3212.
- Verheul, A., Wouters, J.A., Rombouts J.M. y Abee, T. (1998) A possible role of ProP, ProU and CaiT in osmoprotection of *Escherichia coli* by carnitine. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 1036-1046.
- Vessey, D. A. y Kelley, M. (2001) Characterization of reaction mechanism for the XL-I form of bovine liver xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase. *Biochem. J.* **357**, 283-288.
- Vicenti J.V y Hansen, G.J. (1993) Enzymatic oxidation of cephalosporin C using whole cells of the yeast *Triginopsis variabilis* within a "cross-flow filter-reactor". *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 281-285.
- Wagner, T., Hantke, B. y Wagner, F. (1996) Production of L-methionine from D,L-5-(2-methylthioethyl) hydantoin by resting cells of a new mutant strain of *Arthrobacter species* DMSM 7330. *J. Biotechnol.* **46**, 63-68.
- Wahbi, L.P., Gokhale, D., Minter, S. y Stephens, G.M. (1996) Construction and use of recombinant *Escherichia coli* strains for the synthesis of toluene cis-glycol. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 297-306.
- Wieland O.H., Deufel T. y Paetzke-Brunner J. (1985) Free and esterified carnitine. En: *Methods of enzymatic analysis, 3ª ed.* (Bergmeyer H.U. Ed.). vol. 8, pp. 481-488. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Williams, I., Paul, F., Lloyd, D., Jepras, R., Critchley, I., Newman, M., Warrack, J., Giokarini, T., Hayes, A., Randerson, P. y Venables, A. (1999) Flow cytometry and others techniques show that *Staphylococcus aureus* undergoes significant physiological changes in the early stages of surface-attached culture. *Microbiology.* **145**, 1325-1333.
- Walllt, A. y Kahn, M. (2002) The *FixA* and *FixB* genes are necessary for anaerobic carnitine reduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 4044-4047.

- Wood, J. M. (1999) Osmosensing by bacterial: signals and membrane-based sensor. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:230-262.
- Yokozeiki, K., Takahashi, S., Hirose, Y. y Kubota, K. (1988) Asymmetric production of L(-)-carnitine from crotonobetaine by *Proteus mirabilis*. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2415-2421.